

# **АПКОНВЕРТИРУЮЩИЕ НАНОФОСФОРЫ – ОСНОВА ГЛУБОКОЙ ОПТИЧЕСКОЙ ВИЗУАЛИЗАЦИИ БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЕЙ.**

Ю.В. Лысак, Е.В. Хайдуков, В.И. Соколов, А.В. Семчишен

*Отделение перспективных лазерных технологий Федерального государственного учреждения науки Институт проблем лазерных и информационных технологий Российской академии наук*

[lysakyulia@yandex.ru](mailto:lysakyulia@yandex.ru)

Одним из приоритетных направлений развития диагностики новообразований является разработка оптических методов зондирования биологических тканей. Известные на данный момент оптические методы позволяют проводить зондирование на глубину не более 4-5 мм. Цель наших исследований - разработка метода оптического зондирования биотканей на большую глубину, до 10-15 мм. Метод основан на применении кристаллов апконвертирующих нанофосфоров (НАФ). Легированные трех валентными редкоземельными ионами, они идеально подходят для биомедицинских применений в качестве биомаркеров при оптической визуализации патологий в глубине биологической ткани [1-3]. В отличие от квантовых точек [4,5], НАФ нетоксичны, имеют стабильную узкополосную эмиссию [6] при возбуждении в ближнем ИК диапазоне [7,8]. Способность нанофосфоров к антистоксовой люминесценции – основа использования их в качестве контрастных агентов в диффузионной оптической томографии для детектирования и визуализации биологических процессов в реальном времени. Регистрация сигнала в более коротковолновой части спектра, по сравнению с длиной волны возбуждения, позволяет исключить вклад автолюминесценции биоткани [9-10], а использование спектральных фильтров существенно снижает вклад засветки от лазера накачки. НАФ представляет собой кристаллы  $\text{NaYF}_4$ , легированные редкоземельными элементами  $\text{Yb}^{3+}$ ,  $\text{Er}^{3+}$ ,  $\text{Tm}^{3+}$ . Мы использовали НАФ, легированный тулием, химическая формула  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}\text{Tm}^{3+}$ . С помощью сканирующего электронного микроскопа получены изображения НАФ. Показано, что они имеют размер от 20 до 250 нм и находятся в  $\beta$ -фазе, которая характеризуется более высокой интенсивностью ФЛ по сравнению с  $\alpha$ -фазой. Коэффициент конверсии наночастиц, т.е. процентное отношение поглощённой к излученной мощности, который составил 2%. НАФ составляет 2-3%, благодаря чему возможно регистрировать излучение ФЛ от НАФ с больших глубин.

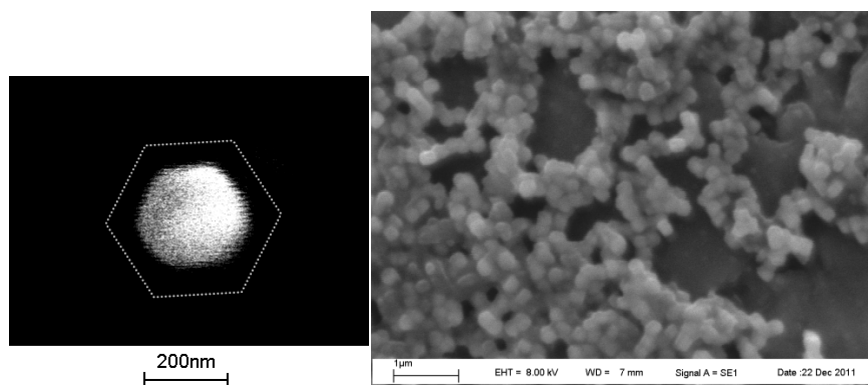


Рис. 1. а) Фотография отдельной частицы НАФ б) Обзорная SEM фотография образца НАФ  $\beta$  -  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Tm}^{3+}$ .

Для визуализации наномаркеров, локализованных в раковой опухоли в глубине биоткани, необходимо как можно глубже проникнуть в ткань излучением, возбуждающим фотолюминесценцию, но и сама фотолюминесценция должна попадать в окно прозрачности биоткани. Окно оптической прозрачности биологической ткани находится в диапазоне 750-1000 нм. Поэтому для целей глубокого оптического зондирования необходимо выбрать НАФ с сильной линией люминесценции в ближнем инфракрасном диапазоне. Кристаллы НАФ  $\beta$  -  $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Tm}^{3+}$  имеют линию люминесценции на длине волны 800 нм при возбуждении излучением полупроводникового лазера 975 нм [11-12]. Регистрация нелинейно зависящей от интенсивности накачки антистоксовой люминесценции позволяет пространственно разрешать более близко расположенные фосфоры [13]. Таким образом, разрешающая способность метода определяется глубиной залегания НАФ в рассеивающей среде.

Для наблюдения сигнала фотолюминесценции от НАФ через биологическую ткань создана экспериментальная установка, представленная на рис. 2.

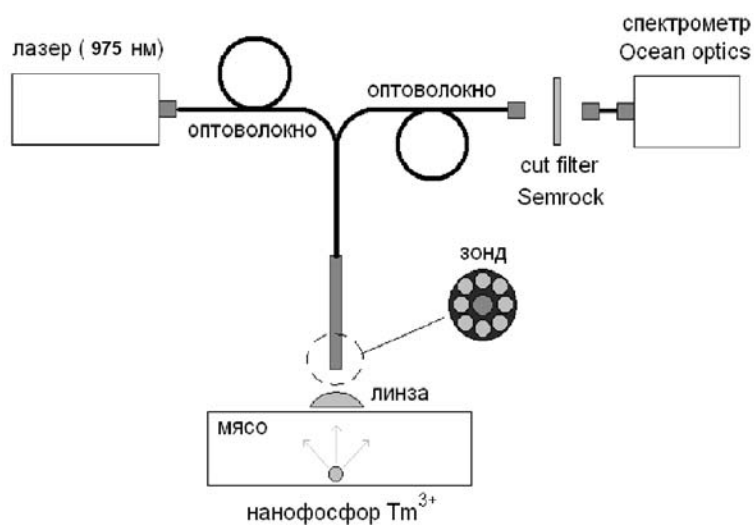


Рис.2. Схема установки регистрации сигнала фотолюминесценции от НАФ через биологическую ткань.

Для сбора сигнала ФЛ использовался многожильный волоконно-оптический зонд, состоящий из восьми оптических волокон, из которых центральная световедущая жила используется для возбуждения сигнала, а семь оптических волокон, расположенных по периметру, используются для регистрации сигнала фотолюминесценции НАФ. Такая конструкция позволяет в режиме реального времени определять локализацию маркированной НАФ области в рассеивающей биоткани простым перемещением зонда в плоскости поверхности биоткани. Оптические волокна, используемые для регистрации сигнала фотолюминесценции НАФ, подключалась к коллиматору, в котором устанавливался светофильтр Semrock, отсекающий сигнал накачки на длине волны 975 нм. Для записи сигнала от маркера на длине волны 800 нм использовался спектрометр Ocean Optics.. Установка позволяет определять положение образца с НАФ под слоем биоткани путем перемещения зонда по ее поверхности. В работе для имитации маркированной патологии мы использовали пластины диаметром 2 мм. Образец представлял собой полимерную пленку толщиной 100 мкм, состоящую из композиции мономера, прозрачного в диапазоне длин волн от 400 до 1000 нм, и наночастиц  $\beta$ - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Tm}^{3+}$ . Полимерный маркер, содержащий НАФ, помещался внутрь куска мяса на глубину от 4 до 14 мм или внутрь фантома.

Спектр фотолюминесценции и зависимость интенсивности ФЛ от мощности накачки наночастиц  $\beta$ - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Tm}^{3+}$  при возбуждении излучением полупроводникового лазера на длине волны 975 нм, представлены на рис.3. Таким образом продемонстрирована визуализация НАФ из-под слоя биологической ткани толщиной до 12 мм.

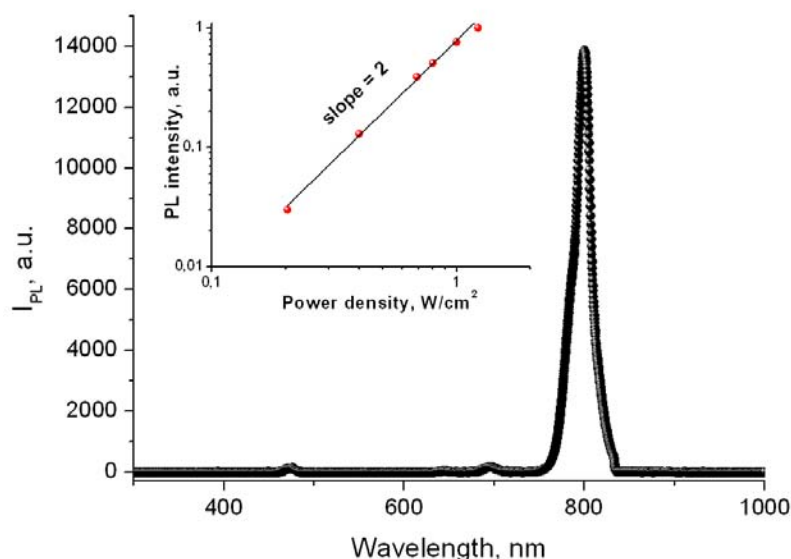
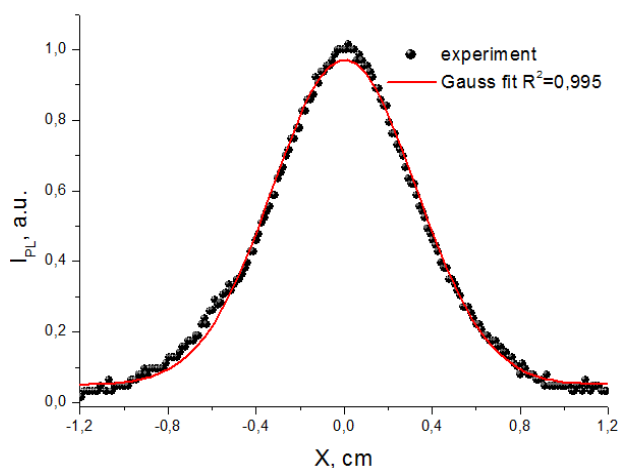


Рис.3. Спектр фотолюминесценции антистоксовых нанофосфоров  $\beta$ - $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Tm}^{3+}$  при возбуждении на длине волны 975 нм. Вставка - зависимость интенсивности ФЛ НАФ от мощности возбуждения.

Важно отметить, что использование спектрометра в схеме регистрации позволяет проводить измерения оптическим томографом при естественном освещении.

Предлагаемый нами метод позволяет повысить точность определения размеров и глубины залегания НАФ по сравнению с методом регистрации изображения люминесценции на поверхности образца с помощью CCD камеры. Накачка НАФ в этом случае осуществляется коллимированным лазерным пучком, а регистрация сигнала люминесценции осуществляется CCD камерой, фокус которой настроен на поверхность образца. На рисунке 4а представлено распределение энергии в пятне люминесценции на поверхности фантома от НАФ, расположенного внутри фантома на глубине 5 мм, после обработки видеоизображения зарегистрированного CCD камерой. На рис. 4б приведена зависимость амплитуды люминесцентного сигнала при сканировании зонда вдоль поверхности фантома. Пространственное разрешение метода регистрации ФЛ НАФ расположенных на глубине 5мм с помощью CCD камеры составляет 1 м.

а)



б)

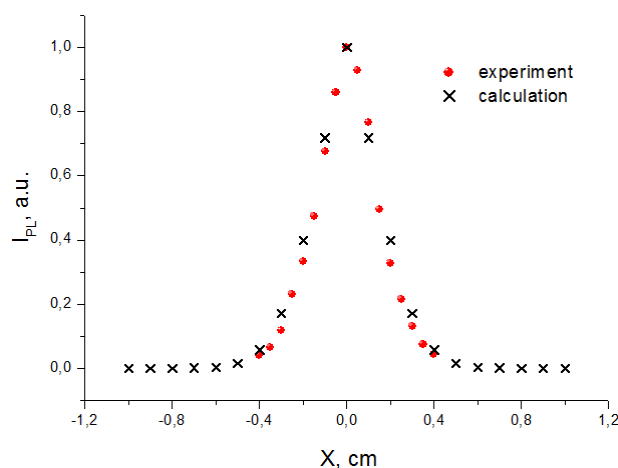


Рис.4. а) Распределение интенсивности в пятне люминесценции НАФ на поверхности фантома, полученное CCD камерой. Черные точки результат обработки видеоизображения, красная кривая - аппроксимация Гауссом, б) Зависимость сигнала люминесценции НАФ при сканировании зонда вдоль поверхности фантома. Красные точки – эксперимент. Крестики - результаты расчета.

Как видно из рис. 4б, совмещение в одном наконечнике оптоволоконных каналов возбуждения и сбора сигнала люминесценции позволило повысить более чем в 2 раза, по сравнению с известными методами регистрации ССД видеокамерой, пространственное разрешение диффузионного оптического томографа.

## Литература

1. H.S.Mader, P.Kele, S. M. Saleh, O.S. Wolfbeis “ Upconverting luminescence nanoparticles for use in bioconjugating and bioimaging” *Current Opinion in chemical Biology*, 14. 582-596, (2010)
2. X.Yi, M. Li, M. Xie, L. Chen, Y. Li, Q. Wang Dopant-controlled synthesis of water-soluble hexagonal NaYF<sub>4</sub> nanorods with efficient upconversion fluorescence for multicolor bioimaging” *Nano Res*, 3, 51-60, (2010)
3. J.K. Jaiswal and S.M. Simon. *Trends Cell Biol.*, 2004, 12, 497-504. A.M. Derfus, W.C. W. Chan and S.N. Bhatia, *Nano Lett.*, 2004, 4, 11-18.
- 4,5. C.T. XU, N. Svensson, J. Axelsson, P. Svenmarker, G. Somesfalean, G.Y. Chen, H.J. Liang, H.C. Liu, Z.G. Zhang and S. Andersson-Engels, *Appl. Phys. Lett.*, 2008, 93, 171103.
6. M. Nirmal, B.O. Dabbousi, M.G. Bawendi, J.J. Macklin, J.K. Trautman, T.D. Harris and L.E. Brus, *Nature*, 1996, 383, 802-804.
- 7,8. W.M. Yen and M.J. Weber, *Inorganic phosphoros: compositions, preparation and optical properties*, CRC Press, Florida, 2004. G Blasse and B.C. Grabmaier, *Luminescent Materials*, Springer, Berlin, 1994.
- 9,10. C.T. Xu, J. Axelsson and S. Andersson-Engels, *Appl. Phys. Lett.*, 2009, 94, 251107. H.C. Liu, C.T. Xu and S. Andersson-Engels, *Opt. Lett.*, 2010, 35, 718-720.
11. N. Dong, F. Sanz-Rodriguez, et al “NIR-to-NIR Two-Photon Excited CaF<sub>2</sub>:Tm<sup>3+</sup>, Yb<sup>3+</sup> Nanoparticles: Multifunctional Nanoprobes for Highly Penetrating Fluorescence Bioimaging” *ACS Nano*, vol.5, 11, 8665-8671 (2011).
12. G. Chen, T. Ochulchanskyy, R. Kumar, at al. “ Ultrasmall Monodisperse NaYF<sub>4</sub>:Yb<sup>3+</sup>/Tm<sup>3+</sup> Nanocrystals with Enhanced Near-Infrared to Near-infrared Upconversion Photoluminescence” *ACS Nano*, Vol 4, 6, 3163-3168 (2010).
13. F. Leblond, S.C. Davis, P.A. Valdes, B.W. Pogue “ Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: Review of instruments, methods and applications” *J Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 98, 77-94 (2010).