

Создание и свойства фантомов биологической ткани, содержащих наночастицы

*А.Х.М.. Мохаммед, С.О. Усталков, Е.А. Сагайдачная, В.И. Кочубей,
А.А. Скацов*

*Саратовский национальный исследовательский государственный университет им.
Н.Г. Чернышевского*

Аннотация: Фантомы представляют собой имитацию биологической ткани. С помощью фантомов можно моделировать распространение света в биологической ткани. При проведении любых биофизических экспериментов существует необходимость в постоянстве начальных условий эксперимента. Использование твердых фантомов, не деградирующих с течением времени и при воздействии внешних факторов, является фундаментом для получения надежных результатов и повторяемости эксперимента. Создание фантомов биологической ткани, содержащих флуоресцентные наночастицы или наночастицы с большим поглощением, а также которые соответствуют конкретным механическим или оптическим свойствам, является актуальной задачей. В работе описана разработка, изготовление и измерение параметров твердых фантомов биологической ткани, содержащих золотые и апконверсионные наночастицы. Проведены исследования оптических и механических свойств фантомов. Выявлены интервал температур, пригодный для применения образцов, в качестве фантомов биологической ткани для задач лазерного термолиза.

Ключевые слова: фантом, золотые наностержни, люминесценция, квантовые точки, термогравиметрический анализ.

Введение

Как правило, когда говорят о нанотехнологиях, основное внимание уделяют их освоению в медицинских приборах и диагностике [1]. При разработке новых методов диагностики и лечения рака перед использованием в клинической практике необходимо проведение испытаний. Использование природных биологических тканей вместо тканей человека животного не целесообразно по нескольким причинам. Оптические свойства биологических тканей зависят от температуры [2, 3] и степени денатурации [4, 5], а также могут варьироваться в зависимости от материала, способны изменяться при различных условиях и деградировать с течением времени [6]. Таким образом, главная задача данной работы заключается в разработке метода создания фантомов биологической ткани с определенными

оптическими свойствами, которые можно было бы использовать в качестве экспериментальных образцов.

Несмотря на наличие большого количества жидких и твердых фантомов, при проведении экспериментальной работы предпочтение отдается твердым фантомам, то есть созданным неоднородным сплошным материалам, состоящим из двух или более компонентов [7, 8]. Твердые фантомы состоят из твердого прозрачного полимерного эластичного материала с рассеивающими и поглощающими частицами, равномерно распределенными в материале. При создании фантомов требуются методы управления оптическими свойствами фантома непосредственно во время изготовления [9]. Задание коэффициентов рассеяния и поглощения и коэффициента анизотропии рассеяния фантома обеспечивается за счет регулирования концентрации и размеров рассеивающих частиц, таких как TiO_2 , ZnO [10]. Таким образом, можно создать фантом, диффузия света в котором идентична диффузии света в биологической ткани.

При проведении исследований терапевтического теплового воздействия лазерного излучения на биологическую ткань и плазмонной фототермической терапии [11] требуется полная совпадаемость оптических свойств фантома и биологической ткани и эквивалентность тепловых свойств [12]. Однако следует упомянуть, что тепловые свойства фантомов несколько отличаются от тепловых свойств реальной кожи: теплопроводность эпидермиса человека составляет $0,209 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$, для дермы же $0,293\text{-}0,322 \text{ Вт}\cdot\text{м}^{-1}\cdot\text{К}^{-1}$ [13-15].

В фантомных поверхностях даны адиабатические граничные условия, которые описывают предположение о незначительных потерях из-за естественной конвекции во время эксперимента. Отметим, что через изменение тепловых параметров фантомов и диаметра лазерного луча для заданного распределения поглощенной мощности, функция в моделировании

приводит к получению семейства температурных распределений [16]. Полученные зависимости максимальной температуры от диаметра лазерного луча, теплопроводности и удельная теплоемкость фантомного материала под действием лазерного излучения, проникая в образец, испытывает многократное рассеяние и поглощение. Будем считать, что золотые наностержни, содержащиеся в фантоме биологической ткани, являются элементарными источниками тепла, причем плотность поглощенной энергии будет уменьшаться с увеличением глубины проникновения излучения в образец.

Цель этой статьи заключается в описании способа создания фантома биологической ткани, содержащего различные наноструктуры, такие как золотые наностержни (AuNR), апконверсионные наночастицы (UCNP) $\text{NaYF}_4: \text{Yb}, \text{Er}$, а также в изучении оптических и механических свойств, характеристик и пригодности образцов для термолиза.

Материалы и методы

Материалы и оборудование

Для синтеза наночастиц использовались: дигидрат тринатрийцитрата (реактив ОСЧ, $\geq 99,0\%$), HAuCl_4 (реактив ОСЧ, $\geq 99,0\%$), гексадецилтриметиламмонийбромид (ЦТАБ) (реактив ОСЧ, $\geq 99,0\%$), NaNH_4 (реактив ОСЧ, $\geq 99,0\%$), раствор поливинилпирролидона (ПВП) (10 кДа, реактив ОСЧ, $\geq 99,0\%$), изопропиловый спирт, водный раствор аммиака (25%), тетраэтоксисилан (ТЭОС) (реактив ОСЧ, $\geq 99,0\%$).

Для определения свойств фантома и содержащихся в нем наночастиц использовалось следующее оборудование: спектрометр Ocean QEPro (Ocean Optics, США), лабораторная центрифуга (Eppendorf 5804, Германия), термоанализатор Q500 (TA instruments, США), сканирующий электронный микроскоп (Mira II LMU, Tescan, Великобритания), наноиндентор (Nanovea, США).

Синтез наночастиц

Синтез $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$

Наночастицы $\text{NaYF}_4:\text{Yb}, \text{Er}$ синтезировались гидротермальным методом с использованием тринатрийцитрата в качестве герметизирующего агента. Соотношение концентраций Er и Yb составляло 30 мол.% Yb и 5 мол.% Er. Синтезированные частицы промывались несколько раз разбавленным раствором тринатрийцитрата. После промывания частицы грелись в течение 1 ч при температуре 500 °С.

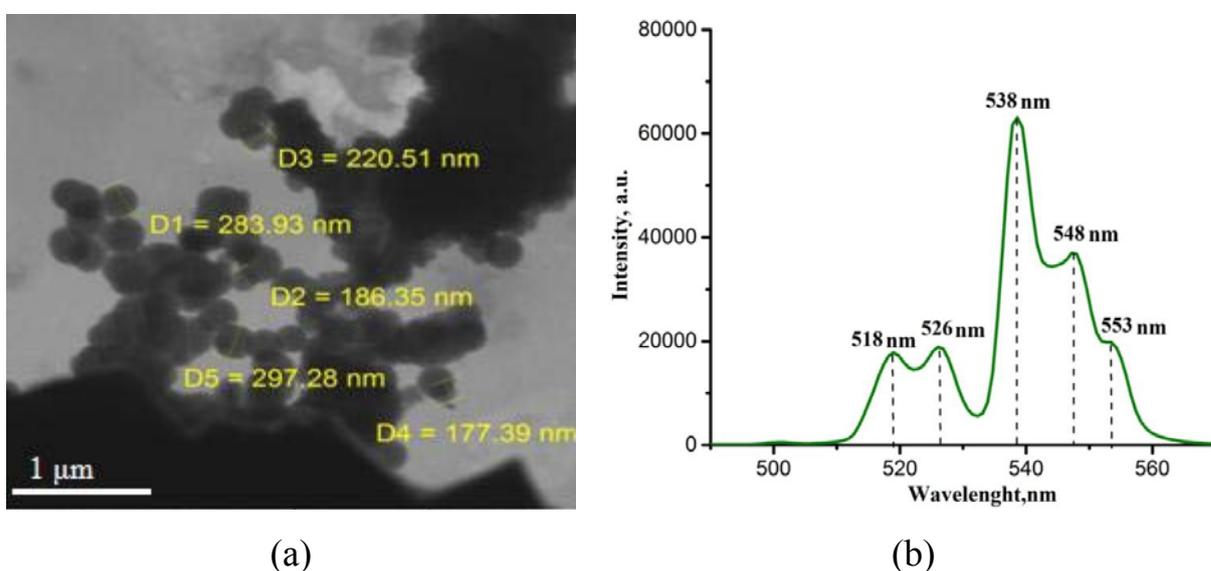
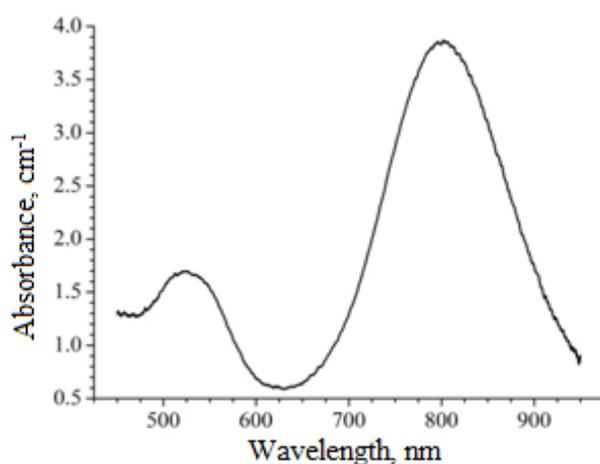


Рис. 1. (a) – Снимок SEM апконверсионных наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$;
(b) – спектр флуоресценции апконверсионных наночастиц $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$
(длина волны возбуждения – 980 нм, размер лазерного луча 1x3 мм,
температура 25°C)

Синтез золотых наностержней

Синтез AuNR выполнялся в соответствии с протоколом, описанным в [17]. На рис.2 изображены спектр поглощения и снимок ТЕМ раствора AuNR.



(a)

(b)

Рис. 2. (a) – спектр поглощения раствора золотых наностержней,
(b) – снимок ТЕМ золотых наностержней

Покрывание золотых наностержней

Наночастицы будут равномерно распределены в фантоме только в том случае, если эти наночастицы стабильны в растворе ацетона, для чего необходимо покрыть AuNR силикатной оболочкой. Исходный раствор наностержней (50 мл) центрифугировался в течение 60 мин при относительном ускорении центрифуги 12000g. Верхняя часть удалялась, оставлялся только остаток (1,5 мл). На 50 мл AuNR получается 30 мг раствор PVP. Раствор PVP добавляется к осадку в виде наностержней до объема 100 мл, после чего в течение 12 мин идет реакция. Затем раствор центрифугируется в течение 60 мин при относительном ускорении центрифуги 12000g. После центрифугирования оставляется только остаток (4,5 мл).

Серийным разбавлением приготавливается пять растворов ПВП (концентрация 8, 4, 2, 0,5 и 0,25 мг к 3 г изопропилового спирта). В каждый раствор добавляется 0,75 мл концентрированного водного раствора наностержней, покрытых PVP, и 0,5 мл аммиака. Через 5 мин после

добавления аммиака добавляется 0,25 мл ТЭОС, затем раствор выдерживается в течение 40 мин. С течением времени раствор обесцвечивался, после чего он центрифугируется в течение 5 мин при относительном ускорении центрифуги 5000g и растворяется в этаноле. Затем центрифугируется в течение 2 мин при относительном ускорении центрифуги 2000g, снова растворяется в этаноле и центрифугируется в течение 1 мин при относительном ускорении центрифуги 1000g. После этого выполняется два цикла центрифугирования: 1 мин при относительном ускорении центрифуги 2000g и 2 мин при относительном ускорении центрифуги 2000g. В результате получался раствор этанола с покрытыми золотом наностержнями.

Создание фантомов биологической ткани

При создании фантомов использовались: оптические эпоксидные компаунды (ПЭО-90, Лаборатория физики полимеров, Санкт-Петербург, Россия), ацетон, изопропиловый спирт, водные растворы наночастиц.

Способ создания заключался в следующем. Вначале смешиваются 0,2 мл ацетона и 1,2 мл эпоксидной смолы, полученное нагревается до 55 °С. Далее добавляется 0,2 мл изопропилового спирта, после чего добавляется 0,3 мл загустителя. Затем добавляется 0,2 мл водного раствора наночастиц. После добавления каждого нового компонента полученный раствор перемешивается магнитной мешалкой. Наконец, раствор нагревается до 75 °С и выдерживается в течении суток. Если наночастицы стабильны в ацетоне, тогда их распределение в фантоме будет равномерным.



Рис. 3. – Процесс приготовления фантомов ткани, содержащих наночастицы

Результаты и обсуждения

Были получены люминесцентные свойства образцов. У образца без наночастиц имеется собственный слабый спектр люминесценции, максимум находится на длине волны 450 нм.

Спектр поглощения AuNR и спектра люминесценции UCNPs показан на рис.4. Ссылаясь на эти результаты, можно сделать вывод, что AuNR искажают истинный спектр люминесценции апконверсионных наночастиц.

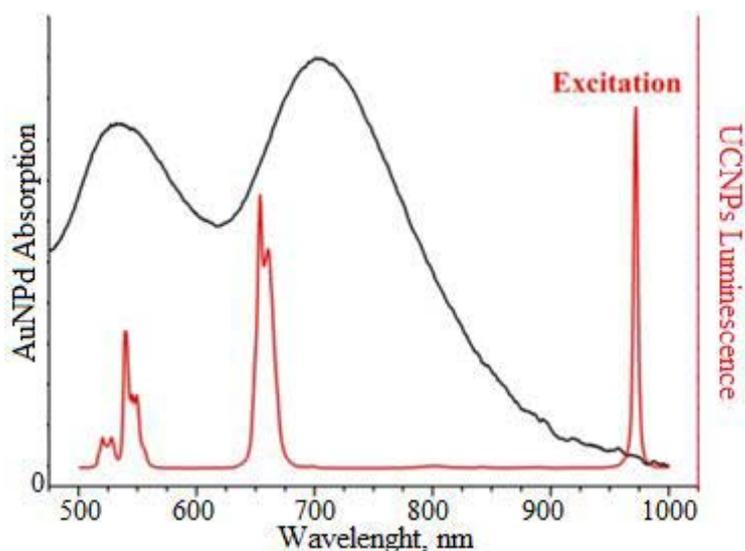


Рис. 4. – Спектр поглощения золотых наностержней и спектр люминесценции апконверсионных наночастиц

Также были получены результаты по температурной устойчивости фантомов. Образец с золотыми наностержнями подвергся термогравиметрическому анализу (TGA). Образец нагревался до 450°C с шагом 1°C в мин. Получена температура фазового перехода в газовое состояние.

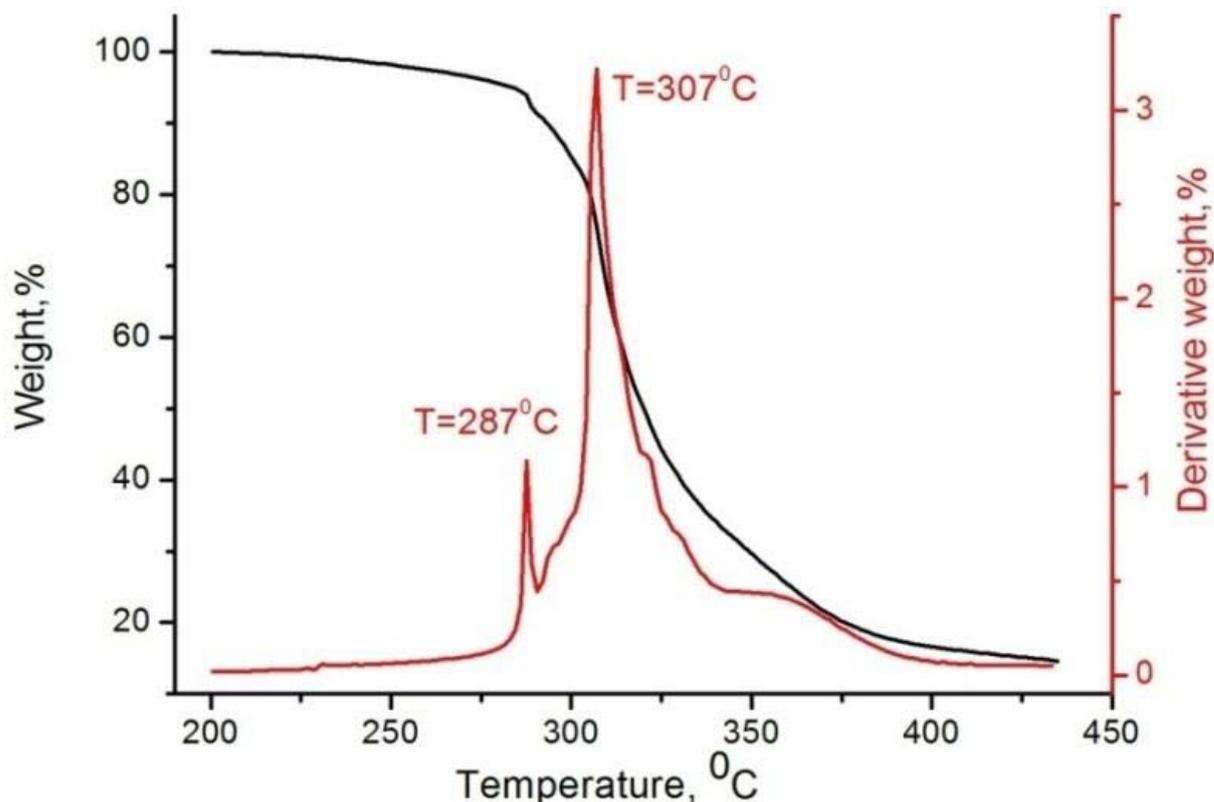


Рис. 5. – Данные, полученные при помощи TGA, для фантома с золотыми наностержнями

Были проведены исследования механических свойств образцов. С помощью метода наноиндентирования. Условия испытаний были следующие: четырехгранный индентер Берковича, максимальная нагрузка 1 мН, скорость нагрузки 2мН/мин, время выдержки под нагрузкой 30с. В результате испытаний были получены средние значение твердости равное $19,7 \pm 5,2$ МПа, и модуля упругости $458 \pm 105,6$ МПа. Полученные результаты лежат в пределах значений твердости и модуля эластичности для Коллегановых волокон [18].

Выводы и заключение

Использование твердых фантомов обеспечивает повторяемость исходных условий эксперимента, статистическую достоверность результатов и отсутствие деградации испытательной системы в результате влияния внешних факторов. В совокупности эти преимущества позволяют провести серию экспериментов на одном образце. Оптические свойства фантомов можно легко подобрать для любого типа биологической ткани, варьируя концентрацию рассеивающих частиц. Тепловые и механические свойства фантомов играют ключевую роль при проведении экспериментов по лазерному термолизу.

Согласно результатам экспериментов, фантом обладает собственной слабой люминесценцией, что вызывает небольшие искажения спектров. Фантомы, содержащие золотые и апконверсионные наночастицы, хорошо подходят для проведения экспериментов по лазерному термолизу. Полученные фантомы имеют высокую температуру деградации и устойчивы к тепловым воздействиям, а также механические свойства близкие к волокнам коллагена. Исходя из всего вышесказанного, эти образцы могут быть использованы в качестве фантомов биологической ткани для экспериментов по лазерному термолизу.

Литература

1. Фиговский О.Л. Что ещё ждать от нанотехнологий! (Обзор новых достижений) // Инженерный вестник Дона. – 2011, №4. URL: ivdon.ru/ru/magazine/archive/n4y2011/528
2. Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Rubtsov V.S., Kolesnikova E.A., Tuchin V.V. Optical properties of human colon tissues in the 350-2500 nm spectral range. // Quant. Electron. 2014. Vol. 44. pp. 779-7842.

3. Bashkatov A.N., Genina E.A., Kozintseva M.D., Kochubey V.I., Gorodkov S.Yu., Tuchin V.V. Optical properties of peritoneal biological tissues in the spectral range of 350-2500 nm. // Opt. Spectrosc. 2016. Vol. 120. pp. 1-8.
 4. Konyukhova J., Skaptsov A., Volkova E, Galushka V., Kochubey V. ZnCdS nanoparticles as nanobiosensors to determine denaturation of tissue. // Proc. SPIE. 2014. 9031. 9030L.
 5. Lazareva E.N., Tuchin V.V. The temperature dependence of refractive index of hemoglobin at the wavelengths 930 and 1100 nm. // Proc. SPIE. 2016. 9917. 99170U.
 6. Tuchina D.K., Genin V.D., Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. Optical clearing of skin tissue ex vivo with polyethylene glycol. // Opt. Spectrosc. 2016. Vol. 120. pp. 28-37.
 7. Pogue B.W., Patterson M.S. Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry. // J. Biomed. Opt. 2006. 11, 041102.
 8. Кудрявцев П.Г., Фиговский О.Л. Нанокompозитные органоминеральные гибридные материалы // Инженерный вестник Дона. – 2014, №2. URL: ivdon.ru/ru/magazine/archive/n2y2014/2476
 9. Wróbel M.S., Popov A.P., Bykov A.V., Kinnunen M., Jędrzejewska-Szczerska M., Tuchin V.V. Measurements of fundamental properties of homogeneous tissue phantoms. // J. Biomed. Opt. 2015. 20, 045004.
 10. Wróbel M.S., Popov A.P., Bykov A.V., Kinnunen M., Jędrzejewska-Szczerska M., Tuchin V.V. Multilayered tissue head phantoms for noninvasive optical diagnostics. // J. Innov. Opt. Health Sci. 2015. 8, 1541005.
 11. Huang X., Jain P.K., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles. // Lasers Med. Sci. 2008. Vol. 23. pp. 217-228.
-

12. Jędrzejewska-Szczerska M., Wróbel M.S., Galla S., Popov A.P., Bykov A.V., Tuchin V.V., Cenian A. Investigation of photothermolysis therapy of human skin diseases using optical phantoms. // Proc. SPIE. 2015. 9447, 944715.
13. Cohen M.L. Measurement of the thermal properties of human skin: a review. // J. Invest. Dermatol. 1977. Vol. 69. pp. 333-338.
14. Skaptsov A.A., Novikova A.S., Galushka V.V., Markin A.V., Kochubey V.I., Goryacheva I.Yu. Red and blue shifts of spectral luminescence band of CuInS₂ nanothermometers. // Proc. of SPIE. 2016. 9917, 991711.
15. Skaptsov A.A., Gofman V.V., Galushka V.V., Markin A.V., Kochubey V.I., Goryacheva I.Yu. Thermosensitivity of nanothermometer: CdSe/ZnS vs. CuInS₂/ZnS. // Proc. of SPIE. 2016. 9917, 991712.
16. Wróbel M.S., Bashkatov A.N., Yakuni A.N., Avetisyan Yu.A., Genina E.A., Galla S., Sękowska A., Truchanowicz D., Cenian A., Jędrzejewska-Szczerska M., Tuchin V.V. Model of optical phantoms thermal response upon irradiation with 975 nm dermatological laser // Proc. of SPIE Vol. 10716 1071604-1.
17. Nikoobakht B., El-Sayed M.A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. // Chem. Mater. 2013. Vol. 15. pp. 1957-1962.
18. Биофизические характеристики тканей человека. Справочник / Березовский В.А., Колотилов Н.Н.: Отв.ред. и авт. предисл. Костюк Г.П. – Киев: Наук. думка, 1990. – 224 с.

References

1. Figovsky O.L. Inzhenernyj vestnik Dona (Rus), 2011, №4, URL: ivdon.ru/ru/magazine/archive/n4y2011/528
2. Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Rubtsov V.S., Kolesnikova E.A., Tuchin V.V. Quant. Electron. 2014. Vol. 44. pp. 779-7842.

3. Bashkatov A.N., Genina E.A., Kozintseva M.D., Kochubey V.I., Gorodkov S.Yu., Tuchin V.V. *Opt. Spectrosc.* 2016. Vol. 120. pp. 1-8.
 4. Konyukhova J., Skaptsov A., Volkova E, Galushka V., Kochubey V. *Proc. SPIE.* 2014. 9031. 9030L.
 5. Lazareva E.N., Tuchin V.V. *Proc. SPIE.* 2016. 9917. 99170U.
 6. Tuchina D.K., Genin V.D., Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V. *Opt. Spectrosc.* 2016. Vol. 120. pp. 28-37.
 7. Pogue B.W., Patterson M.S. *J. Biomed. Opt.* 2006. 11, 041102.
 8. Kudryavtsev P.G., Figovsky O.L. *Inženernyj vestnik Dona (Rus)*, 2014, №2. URL: ivdon.ru/ru/magazine/archive/n2y2014/2476
 9. Wróbel M.S., Popov A.P., Bykov A.V., Kinnunen M., Jędrzejewska-Szczerska M., Tuchin V.V. *J. Biomed. Opt.* 2015. 20, 045004.
 10. Wróbel M.S., Popov A.P., Bykov A.V., Kinnunen M., Jędrzejewska-Szczerska M., Tuchin V.V. *J. Innov. Opt. Health Sci.* 2015. 8, 1541005.
 11. Huang X., Jain P.K., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A. *Lasers Med. Sci.* 2008. Vol. 23. pp. 217-228.
 12. Jędrzejewska-Szczerska M., Wróbel M.S., Galla S., Popov A.P., Bykov A.V., Tuchin V.V., Cenian A. *Proc. SPIE.* 2015. 9447, 944715.
 13. Cohen M.L. *J. Invest. Dermatol.* 1977. Vol. 69. pp. 333-338.
 14. Skaptsov A.A., Novikova A.S., Galushka V.V., Markin A.V., Kochubey V.I., Goryacheva I.Yu. *Proc. SPIE.* 2016. 9917, 991711.
 15. Skaptsov A.A., Gofman V.V., Galushka V.V., Markin A.V., Kochubey V.I., Goryacheva I.Yu. *Proc. SPIE.* 2016. 9917, 991712.
 16. Wróbel M.S., Bashkatov A.N., Yakuni A.N., Avetisyan Yu.A., Genina E.A., Galla S., Sękowska A., Truchanowicz D., Cenian A., Jędrzejewska-Szczerska M., Tuchin V.V. *Proc. SPIE.* Vol. 10716 1071604-1.
 17. Nikoobakht B., El-Sayed M.A. *Chem. Mater.* 2013. Vol. 15. pp. 1957-1962.
-



18. Biofizicheskie harakteristiki tkanej cheloveka [Biophysical characteristics of human tissues]. Handbook. Berezovsky V.A., Kolotilov N.N.: Ed. Kostyuk G.P. Kiev, Nauk. dumka, 1990. pp. 224.