



УДК 535: 53.06

КОНТРАСТИРОВАНИЕ ИЗОБРАЖЕНИЙ В ОПТИЧЕСКОЙ КОГЕРЕНТНОЙ ТОМОГРАФИИ ПЕЧЕНИ С ПОМОЩЬЮ НАНОЧАСТИЦ

Э. А. Генина, С. А. Киндер, А. Н. Башкатов, В. В. Тучин

Саратовский государственный университет
E-mail: eagenina@yandex.ru

Рассматривается возможность улучшения визуализации внутренней структуры печени на оптических когерентных томограммах путем повышения их контрастности с помощью введения наночастиц диоксида титана в различных суспензиях и при различных методах доставки частиц в биоткань. Получены значения контраста внутренних структур печени *in vitro*.

Ключевые слова: оптическая когерентная томография, наночастицы, контраст, печень.

Contrasting in Optical Coherence Tomography Imaging of Liver by Nanoparticles

E. A. Genina, S. A. Kinder, A. N. Bashkatov, V. V. Tuchin

Possibility of improvement of inner liver structure visualization in optical coherent tomograms by increasing their contrast due to administration of titanium dioxide nanoparticles in various suspensions and at various methods of delivering of the particles into the tissue is considered. Values of contrast of inner liver structures *in vitro* are obtained.

Key words: optical coherent tomography, nanoparticles, contrast, liver.

Введение

За последнее время в ходе исследований было доказано эффективное применение оптической когерентной томографии (ОКТ) в таких направлениях клинической практики, как гинекология, гастроэнтерология, урология, дерматология, офтальмология, отоларингология, стоматология и т.д. [1–3]. ОКТ представляет собой неинвазивный метод визуализации внутренней структуры оптически неоднородных объектов, основанный на принципах низкокогерентной интерферометрии, использующей свет ближнего инфракрасного (ИК) диапазона (0.75–1.3 мкм) [1,2]. ОКТ позволяет изучать внутреннюю микроструктуру покровных тканей организма: кожи и слизистых оболочек на глубину до 2 мм с пространственным разрешением 10–15 мкм без нарушения целостности биотканей [1–5]. В то же время в результате оптической неоднородности биологических тканей происходит многократное рассеяние зондирующего излучения, что в значительной степени ограничивает глубину зондирования и контрастирование отдельных структур [6, 7]. В настоящее время для решения этой проблемы ши-



роко используются такие приемы, как компрессия мягких тканей [5, 8] и оптическое просветление. При оптическом просветлении в биоткань вводятся вещества, которые снижают светорассеяние в биотканях в результате согласования показателей преломления структурных элементов тканей и окружающей их среды. К таким веществам относятся некоторые иммерсионные жидкости: глицерин, пропиленгликоль, концентрированные растворы глюкозы, благодаря которым достигается оптическое просветление биотканей [5,9–13].

Помимо иммерсионных жидкостей для изменения оптических свойств биологических тканей в последнее время стали применяться наноразмерные частицы, например: золотые наноболочки, наностержни, нанокубики, а также наночастицы серебра, диоксида титана и другие [14–19].

Использование контрастирующих наночастиц приводит к усилению ОКТ-сигнала от внутренних неоднородностей биологических тканей за счёт рассеяния зондирующего излучения назад [14–16].

В данной работе были рассмотрены контрастирующие свойства наночастиц диоксида титана в различных суспензиях и при различных методах доставки частиц в ткань печени.

1. Методы и материалы

В работе использовался нанопорошок TiO_2 (634662-100G, Sigma-Aldrich Co., США), состоящий из смеси рутильной и анатазной форм диоксида титана с размером наночастиц <100 нм. Для улучшения проникновения частиц в ткань печени использовались суспензии наночастиц в физиологическом растворе (водный 0.9 мг/мл раствор NaCl) и полиэтиленгликоле с молекулярным весом 300 (ПЭГ-300) (202371-250G, Sigma-Aldrich Co., США). Концентрация наночастиц в суспензии составляла 0.5 г/мл.

Для усиления проницаемости тканей печени применялось ультразвуковое (УЗ) воздействие. В качестве источника ультразвука использовался УЗ излучатель Dinatron 125 (Dinatronics, США).



Частота УЗ – 1 МГц, плотность мощности – 1.5 Вт/см² в непрерывном режиме. Время облучения составляло 5 и 10 мин.

Образцы биоткани размером 3×3×1 см³ вырезались из интактной говяжьей печени. Верхняя плотная оболочка удалялась. Образцы помещались в чашки Петри и смачивались физиологическим раствором для предотвращения высыхания в процессе исследования. Образцы разделялись на четыре серии по четыре образца в каждой: 1) интактные образцы; 2) образцы, на поверхность которых тонким слоем наносилась суспензия TiO₂ в физиологическом растворе и проводилась обработка УЗ последовательно в течение 5 мин, а затем, после удаления суспензии, еще 5 мин; 3) образцы, на поверхность которых тонким слоем наносилась суспензия TiO₂ в ПЭГ-300 на 30 мин; 4) образцы, на поверхность которых тонким слоем наносилась суспензия TiO₂ в ПЭГ-300 и проводилась обработка УЗ аналогично серии 2.

Контроль за транспортом наночастиц в ткани печени осуществлялся с помощью оптического когерентного томографа Thorlabs Spectral Radar OCT (OСR930, Thorlabs, США) на длине волны 930 нм. ОКТ сканирование проводилось до обработки, после 5-минутного и после 10-минутного облучения УЗ образцов из 2–5 серий.

Контраст изображения неоднородностей на рисунке оценивался по формуле

$$\text{contrast} = \frac{R_1 - R_2}{R_1 + R_2}, \quad (1)$$

где R_1 и R_2 – соответственно амплитуды ОКТ сигнала на А-скане в области неоднородности на ее верхней и нижней границах (рис. 1).

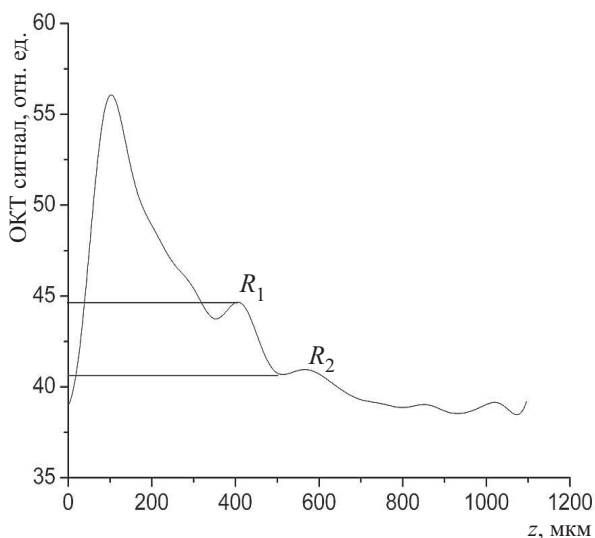


Рис. 1. А-скан ОКТ изображения биоткани. R_1 и R_2 – амплитуды ОКТ сигнала на границах неоднородности

2. Результаты и их обсуждение

В серии рис. 2–5 представлены результаты ОКТ сканирования образца интактной печени (рис. 2), образцов, обработанных суспензиями TiO₂ в физиологическом растворе (рис. 3) и ПЭГ-300 (рис. 4, 5) На рисунках вертикальная и горизонтальная черты соответствуют 500 мкм.

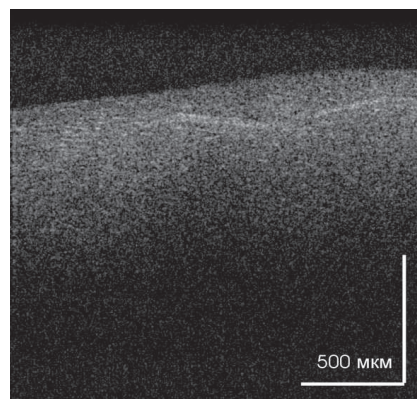


Рис. 2. ОКТ изображение образца интактной печени (образец из серии 1)

Структура ткани печени на ОКТ изображении (рис. 2) достаточно однородна. Неразличимость внутренней структуры образца на изображении связана с тем, что показатели преломления ткани печени (1.39 [20]) и стенок сосудов, пронизывающих печень (1.36–1.38 [20]) в диапазоне длин волн, на котором происходит сканирование, достаточно близки. Глубина зондирования биоткани составляет порядка 300–400 мкм. В верхней части изображения наблюдается небольшое повышение интенсивности сигнала, соответствующее, по-видимому, уплотнению ткани. Однако контрастность этой неоднородности на изображении интактной ткани невелика. Результат оценки контраста, рассчитанного по формуле (1), представлен в таблице.

Контраст изображения неоднородностей на А-сканах ОКТ изображений печени и глубина зондирования при использовании в качестве контрастирующего вещества наночастиц диоксида титана

№ серии	Контраст изображения	Глубина зондирования, мкм
1	0.11±0.01	350±50
2	<i>a</i>	0.18±0.01
	<i>б</i>	0.17±0.03
3	0.15±0.02	500±50
4	<i>a</i>	0.17±0.01
	<i>б</i>	0.18±0.02

Примечание. Воздействие УЗ: *a* – 5-минутное; *б* – 10-минутное.

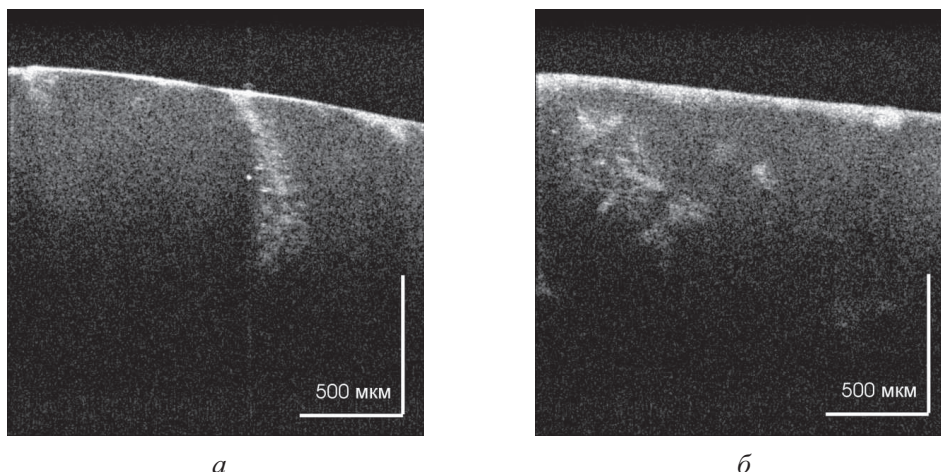


Рис. 3. ОКТ изображения образцов печени после 5-минутного (*a*) и 10- минутного (*б*) воздействия УЗ на поверхность биоткани, покрытую суспензией наночастиц TiO_2 в физиологическом растворе (образцы из серии 2)

На рис. 3 хорошо видно, что наночастицы TiO_2 проникли в ткань печени, о чем свидетельствует увеличение сигнала от более глубоких слоев биоткани. Показатель преломления TiO_2 составляет в среднем 2.7 [21]. Таким образом, свет отражается от границы раздела биоткань-частица, что дает возможность наблюдать их изображения более четко. На рис. 3, *a* хорошо видны неоднородности внутри ткани печени. За счет воздействия УЗ наблюдается проникновение наночастицы TiO_2 в кровеносные сосуды и движение их по сосудам в глубь биоткани. Глубина зондирования в этом случае достигает ~ 600 мкм. Значительно повышается контраст изображения (см. таблицу).

По сравнению с изображениями образцов печени на рис. 3, *a*, на рис. 3, *б* наблюдается более равномерное распределение наночастиц в биоткани. Это связано с дополнительным воздействием УЗ. Глубина зондирования при этом не увеличивается, контраст также остается приблизительно на том же уровне (см. таблицу).

Использование ПЭГ-300 в качестве основы суспензии позволяет повысить глубину зондирования биоткани по сравнению с интактным состоянием. В случае, когда суспензия использовалась без дополнительной обработки УЗ, глубина зондирования составила ~ 500 мкм (рис. 4, таблица). При 10-минутном воздействии УЗ она достигла 800 мкм (рис. 5, таблица). Увеличение глубины зондирования связано с просветляющим действием ПЭГ-300, поскольку он является иммерсионным агентом с показателем преломления $n = 1.41$. Проникая во внутритканевое пространство печени и смешиваясь с внутритканевой жидкостью ($n = 1.35$ [20]) и кровью ($n = 1.4$ [20]), он выравнивает показатели различных компонентов

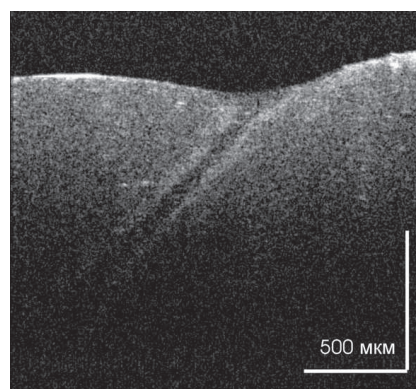


Рис. 4. ОКТ изображение образца печени после ее взаимодействия с суспензией наночастиц TiO_2 в ПЭГ-300 в течение 30 мин (образец из серии 3)

биоткани, что приводит к снижению рассеяния поверхностных слоев биоткани и повышает уровень сигнала, отраженного от более глубоких слоев. Таким образом, использование ПЭГ-300 способствует оптическому просветлению биоткани, что наряду с использованием УЗ позволяет более точно локализовать структурные неоднородности внутри образцов печени (см. рис. 5, *a*, *б*).

Исходя из анализа полученных результатов, можно утверждать, что введение наночастиц диоксида титана в ткань печени позволяет существенно увеличить контраст изображения неоднородностей внутри биоткани и глубину детектирования их локализации. Небольшие колебания значений контраста, по-видимому, связаны с различиями в структуре неоднородностей, выбранных для анализа. Однако на представленных рисунках хорошо видно, что контраст изображений объектов, находящихся на большей глубине, увеличивается при ис-

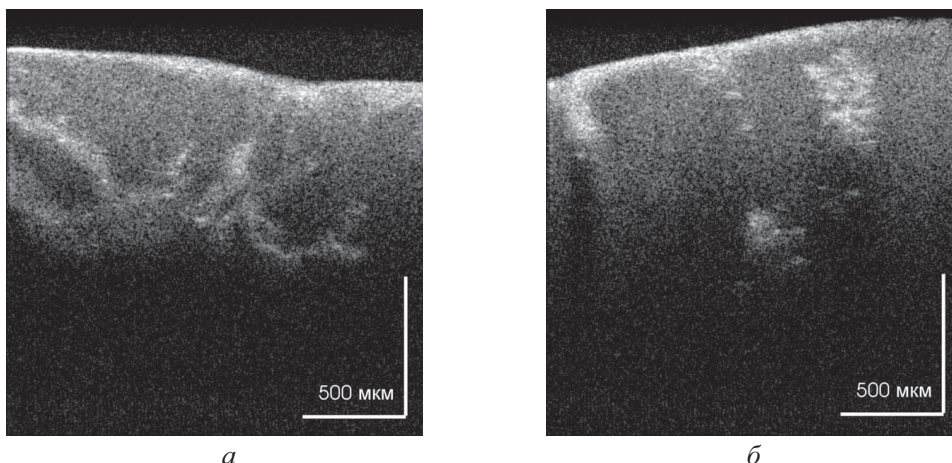


Рис. 5. ОСТ изображения образцов печени после 5- (а) и 10-минутного (б) воздействия УЗ на поверхность биоткани, покрытую суспензией наночастиц TiO_2 в ПЭГ-300 (образцы из серии 4)

пользовании ПЭГ-300 в качестве носителя наночастиц по сравнению с физиологическим раствором. В то же время комбинированное воздействие УЗ и ПЭГ-300 на транспорт наночастиц TiO_2 приводит к увеличению глубины зондирования ткани печени и еще большему увеличению контраста изображения неоднородностей внутри биоткани.

Заключение

В данной работе было проведено сравнение контрастирующих свойств различных суспензий наночастиц TiO_2 , а также способов их доставки внутрь тканей печени. При использовании суспензий наночастиц диоксида титана контрастность изображений увеличивается в 1.6 ± 0.06 раз. При этом глубины зондирования биоткани существенно различаются в зависимости от основы суспензии (физиологический раствор или ПЭГ-300). При использовании в качестве основы суспензии физиологического раствора глубина, на которой достаточно отчетливо наблюдаются структурные неоднородности, составляет ~ 600 мкм, в то время как при использовании ПЭГ-300 она достигает ~ 800 мкм, что существенно при зондировании биологических объектов.

Результаты данного исследования могут быть использованы при разработке новых и оптимизации существующих методов диагностики и терапии новообразований в печени с использованием наночастиц.

Исследование проведено при финансовой поддержке Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 годы (гос. контракты № 02.740.11.0484, 02.740.11.0879), Седьмой ра-

мочной программы Комиссии Европейского Союза PHOTONICS4LIFE (грант № 224014 Network of Excellence for Biophotonics).

Список литературы

1. Optical Coherence Tomography : Technology and Applications / eds. W. Drexler, J. G. Fujimoto. Berlin ; Heidelberg : Springer-Verlag, 2008. 1330 p.
2. Fercher A. F., Drexler W., Hitzenberger C. K., Lasser T. Optical coherence tomography – principles and applications // Rep. Prog. Phys. 2003. Vol. 66. P. 239–303.
3. Sergeev A. M., Dolin L. S., Reitze D. N. Optical tomography of biotissues past, present, and future // Optics & Photonics News. 2001. Vol. 12. P. 28–35.
4. Wang R. K., Tuchin V. V. Optical coherence tomography – light scattering and imaging enhancement // Coherent-Domain Optical Methods : Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science. 2 vols. / ed. V. V. Tuchin. Vol. 2. Boston : Kluwer Academic Publishers, 2004. P. 3–60.
5. Руководство по оптической когерентной томографии / под ред. Н. Д. Гладковой, Н. М. Шаховой, А. М. Сергеева. М. : Физматлит, Медкнига, 2007. 296 с.
6. Fedosseeva M. S., Kirillin M. Yu., Priezzhev A. V., Myllyla R. Estimation of contribution of multiple scattering into the optical coherence tomography signal from layers of different biological tissues // Proc. SPIE. 2005. Vol. 5771. P. 283–290.
7. Schmitt J. M. Optical coherence tomography: a review // IEEE J. Select Topics Quant. Electron. 1999. Vol. 5. P. 1205–1215.
8. Аэрба П. Д., Кириллин М. Ю., Абелевич А. И., Загайнова Е. В., Каменский В. А. Компрессия как метод повышения информативности оптической когерентной томографии биотканей // Опт. и спектр. 2009. Т. 107, № 6. С. 901–906.
9. Tuchin V. V., Xu X., Wang R. K. Dynamic optical coherence tomography in studies of optical clearing, sedimentation,



- and aggregation of immersed blood // *Appl. Opt.* 2002. Vol. 41, № 1. P. 258–271.
10. Wang R. K., Elder J. B. Propylene glycol as a contrasting agent for optical coherence tomography to image gastrointestinal tissues // *Lasers Surg. Med.* 2002. Vol. 30. P. 201–208.
 11. Genina E. A., Bashkatov A. N., Tuchin V. V. Tissue optical immersion clearing // *Expert Rev. Med. Devices.* 2010. Vol. 7, № 6. P. 825–842.
 12. Ghosn M. G., Carbajal E. F., Befruj N. A., Tellez A., Granada J. F., Larin K. V. Permeability of hyperosmotic agent in normal and atherosclerotic vascular tissues // *J. Biomed. Opt.* 2008. Vol. 13, № 1. P. 010505.
 13. Ghosn M. G., Sudheendran N., Wendt M., Glasser A., Tuchin V. V., Larin K. V. Monitoring of glucose permeability in monkey skin *in vivo* using optical coherence tomography // *J. Biophotonics.* 2010. Vol. 3, № 1–2. P. 25–33.
 14. Kirillin M., Shirmanova M., Sirotkina M., Bugrova M., Khlebtsov B., Zagaynova E. Contrasting properties of gold nanoshells and titanium dioxide nanoparticles for optical coherence tomography imaging of skin : Monte Carlo simulations and *in vivo* study // *J. Biomed. Opt.* 2009. Vol. 14, № 2. P. 021017.
 15. Zagaynova E. V., Shirmanova M. V., Kirillin M. Yu., Khlebtsov B. N., Orlova A. G., Balalaeva I. V., Sirotkina M. A., Bugrova M. L., Agrba P. D., Kamensky V. A. Contrasting properties of gold nanoparticles for optical coherence tomography: phantom, *in vivo* studies and Monte Carlo simulation // *Phys. Med. Biol.* 2008. Vol. 53. P. 4995–5009.
 16. Kim C. S., Wilder-Smith P., Ahn Y.-C., Liaw L.-H., Chen Z., Kwon Y. J. Enhanced detection of early-stage oral cancer *in vivo* by optical coherence tomography using multimodal delivery of gold nanoparticles // *J. Biomed. Opt.* 2009. Vol. 14, № 3. P. 034008.
 17. Генина Э. А., Долотов Л. Е., Терентюк Г. С., Баикатов А. Н., Маслякова Г. Н., Тучин В. В., Ярославский И. В., Альтшулер Г. Б. Фракционная лазерная микроабляция кожи для усиления ее проницаемости для наночастиц // *Квант. электроника.* 2011. Т. 41, № 5. С. 396–401.
 18. Billaud P., Huntzinger J.-R., Cottancin E., Lerme J., Pellarin M., Arnaud L., Broyer M., Del Fatti N., Valee F. Optical extinction spectroscopy of single silver nanoparticles // *Eur. Phys. J. D.* 2007. Vol. 43. P. 271–274.
 19. Попов А. П., Приезжев А. В., Ладеман Ю., Мюлльер Р. Влияние многократного рассеяния света на наночастицах диоксида титана, имплантированных в приповерхностный слой кожи, на пропускание излучения в разных диапазонах длин волн // *Квант. электроника.* 2007. Т. 37, № 1. С. 17–21.
 20. Тучин В. В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. М.: Физматлит, 2010. 488 с.
 21. URL: Refractive index database: <http://refractiveindex.info/?group=CRYSTALS&material=TiO2> (дата обращения: 28.11.2011).

УДК 535.4

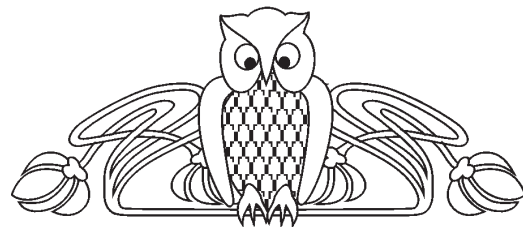
ИССЛЕДОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ МИКРОЦИРКУЛЯЦИИ КРОВИ В ОБЛАСТИ НОГТЕВОГО ЛОЖА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДА ЛАЗЕРНОЙ СПЕКЛ-ВИЗУАЛИЗАЦИИ

Д. Н. Агафонов, П. А. Тимошина, М. А. Виленский,
И. В. Федосов, В. В. Тучин

Саратовский государственный университет
E-mail: aga@optics.sgu.ru

Рассмотрена применимость метода анализа пространственного контраста лазерных спеклов для исследования параметров микроциркуляции в ногтевом ложе, а также их динамики с использованием градуировочных данных, полученных в измерениях на фантоме биоткани. С данной целью проведены исследования оптимальных условий формирования и регистрации спекл-изображений и создано программное обеспечение, реализующее адаптивный алгоритм. Данные микроскопических исследований капилляров ногтевого ложа были использованы для контроля результатов спекл-визуализации.

Ключевые слова: контраст лазерных спеклов, LASCA, капилляроскопия, фантом.



The Study of Nail Bed Microcirculation by Laser Speckle-Imaging Technique

D. N. Agafonov, P. A. Timoshina, M. A. Vilensky,
I. V. Fedosov, V. V. Tuchin

The applicability of laser speckle contrast analysis technique for study of nail bed microcirculation parameters was investigated. Parameters and their dynamics were considered using calibration data obtained with biotissue phantom. Optimal conditions of formation and registration of speckle images were discussed and program for adaptive operation and processing was presented. The data of microscopic observations of nail bed capillary network was used to verify the results of speckle visualization.

Key words: laser speckle contrast, LASCA, capillaroscopy, phantom.