

УДК 534:535

ИЗМЕРИТЕЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС ДЛЯ ЛАЗЕРНОЙ ДИАГНОСТИКИ БИООБЪЕКТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОЧАСТИЦ НА БАЗЕ LIMO 100

Старченко Ирина Борисовна, доктор технических наук, профессор, Южный федеральный университет, 347922, Российская Федерация, г. Таганрог, ул. Шевченко, 2, e-mail: star@sfedu.ru

Малюков Сергей Павлович, доктор технических наук, профессор, Южный федеральный университет, 347922, Российская Федерация, г. Таганрог, ул. Шевченко, 2, e-mail: malyukov@fep.tti.sfedu.ru

Орда-Жигулина Дина Владимировна, аспирант, Южный федеральный университет, 347922, Российская Федерация, г. Таганрог, ул. Шевченко, 2, e-mail: dina@fep.tti.sfedu.ru

Саенко Александр Викторович, аспирант, Южный федеральный университет, 347922, Российская Федерация, г. Таганрог, ул. Шевченко, 2, e-mail: alex_rus.07@mail.ru

Наночастицы в аналитических измерениях в сфере биомедицины используются в качестве контрастных агентов, поскольку, будучи иммобилизованными определёнными белками, обладают адгезией к больным клеткам и бактериям. Регистрация ультразвукового сигнала, возникающего при облучении лазером тока крови с введенными в нее наночастицами, позволяет осуществлять обнаружение и оценку количества больных клеток. Разработана структурная схема аналитических исследований, обоснованы ее основные метрологические характеристики. Комплекс «ЛИМО» позволяет проводить широкий спектр исследований по воздействию лазерным излучением на объекты. Обоснованы выбор рабочих длин волн и мощности лазера. Исследования проводятся в центрах коллективного пользования Южного федерального университета «Нанотехнологии» и «Лазерные технологии», оснащенных современным уникальным нанотехнологическим оборудованием.

Ключевые слова: лазер, биообъект, наночастицы, мощность, инфракрасный диапазон, диагностика, длина волны лазера, позиционирование, сканирование лучом, ультразвук

MEASURING SYSTEM FOR THE LASER DIAGNOSTICS OF BIOLOGICAL OBJECTS USING NANOPARTICLES BASED ON LIMO COMPLEX

Starchenko Irina B., D.Sc. (Engineering), Professor, Southern Federal University, 2 Shevchenko St., Taganrog, 347922, Russian Federation, e-mail: star@sfedu.ru

Malyukov Sergey P., D.Sc. (Engineering), Professor, Southern Federal University, 2 Shevchenko St., Taganrog, 347922, Russian Federation, e-mail: malyukov@fep.tti.sfedu.ru

Orda-Zhigulina Dina V., post-graduate student, Southern Federal University, 2 Shevchenko St., Taganrog, 347922, Russian Federation, e-mail: dina@fep.tti.sfedu.ru

Saenko Alexandr V., post-graduate student, Southern Federal University, 2 Shevchenko St., Taganrog, 347922, Russian Federation, e-mail: alex_rus.07@mail.ru

Nanoparticles in biomedical analytical measurements are used as contrast agents, since, being immobilized to specific proteins with adhesion to the diseased cells and bacteria. Registration of ultrasonic signal produced by laser emission of blood flow with entered nanoparticles allows the detection and enumeration of diseased cells. The block diagram of analytical studies was designed to prove its basic metrological characteristics. Complex "LIMO" allows a wide range of studies on the effects laser radiation on the objects. The choice of the working wavelength and laser power was justified. Research is conducted in the Centers for collective use of the Southern Federal University "Nanotechnology" and "Laser Technology", equipped with modern and unique nanotechnology research equipment.

Keywords: laser, biological object, nanoparticles, power, infrared, diagnostics, laser wavelength, positioning, beam scanning, ultrasound

С развитием нанобиотехнологий и внедрением их в медицинскую практику открываются новые горизонты в исследованиях крови как *in vivo*, так и *in vitro*. Это связано с тем, что современные технологии позволяют работать с веществом в микрометровых и даже нанометровых масштабах. Именно такие размеры характерны для основных биологических структур – клеток, их составных частей (органелл) и молекул. Одной из ключевых возможностей наноматериалов применительно к биологии и медицине является то, что они могут легко поглощаться клетками и поэтому могут выступать в роли переносчиков различных молекул, необходимых для лечения и диагностики. Также углеродные нанобъекты имеют свойство адгезии к бактериальным клеткам, но не к здоровым клеткам живого организма.

Поэтому для решения диагностических задач исследования биологических структур целесообразно использовать оптоакустические (ОА) методы с применением наноразмерных объектов. Оптоакустика – область научных знаний, охватывающая эффекты возбуждения звука лазерным импульсом или модулированным по интенсивности световым пучком [1].

«*In vivo* оптоакустической цитометрией потока крови» называют методику, при которой вследствие ОА-эффекта генерируется звуковое поле, регистрируемое ультразвуковым преобразователем. Достоинством оптоакустического метода с использованием наноразмерных объектов является возможность потенциального обнаружения единичной бактерии или раковой клетки в кровотоке, что потенциально позволяет получить новые качественные и количественные результаты в исследованиях жидких сред организма, в отличие от существующих в настоящее время аналогов. Подобные исследования проводились В. Жаровым и др. (Университет медицинских наук, Арканзас, Литл-Рок) [5].

Экспериментальные исследования формирования ОА-полей при облучении пробы, содержащей наноразмерные частицы, были выполнены в Центре коллективного пользования «Лазерные технологии» Южного федерального университета [4]. В рамках экспериментов ОА импульсы регистрировались в растворах с различной концентрацией нанобъектов, а также в чистом растворе желатина.

На рис. 1 представлена структурная схема экспериментальной установки. Сгенерированный лазером ОА сигнал детектировался ультразвуковым преобразователем, который прикреплялся к стенке кюветы. Кювета наполнялась раствором, содержащим углеродные нанотрубки в различных концентрациях. Расстояние от лазерного пятна до ультразвукового приемника составляло 0,5–1 см. Сигнал от этого приемника усиливался и регистрировался цифровым осциллографом. Полученные данные сохранялись в файл на ПК и затем обрабатывались отдельно.

Интегральная установка была построена, как описано ранее [2, 3], с использованием ИК лазера, модель LIMO 100-532/1064-U на основе Nd:YAG лазера с фиксированной длиной волны 1064 нм, длительностью импульса 45 нс и энергией в импульсе, которая могла задаваться программно в диапазоне 0,1 до 100 Вт. Значение частоты следования импульсов (ЧСИ) f_{rep} лазера – 10 кГц. Облучение раствора углеродных нанотрубок (УНТ) лазером выполнялось с помощью настраиваемой цилиндрической линзы, формировавшей линейный луч лазера диаметром от 3,5 мм. Для контроля энергии в лазерном импульсе использовался энергометр.

Рассмотрим подробнее основные узлы установки. К достоинствам лазерного комплекса LIMO 100-532/1064-U можно отнести длину лазерной линии (60 мм) и высокую степень однородности лазерного пучка в пределах линии, погрешность величины которой составляет не более 1,5 % (при работе прибора в рекомендованных условиях окружающей среды).

На рис. 2. представлены основные узлы системы.

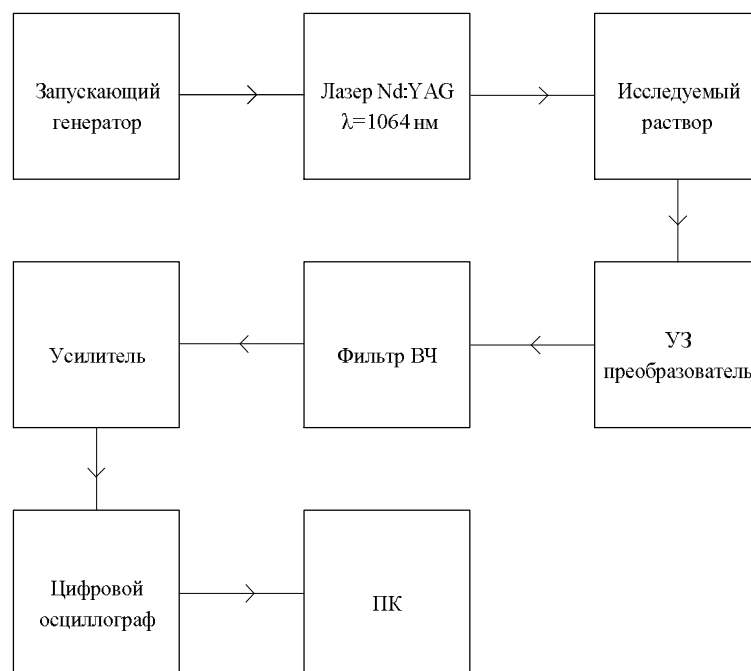


Рис. 1. Структурная схема экспериментальной установки для *in vitro* исследований суспензий УНТ в пробирке

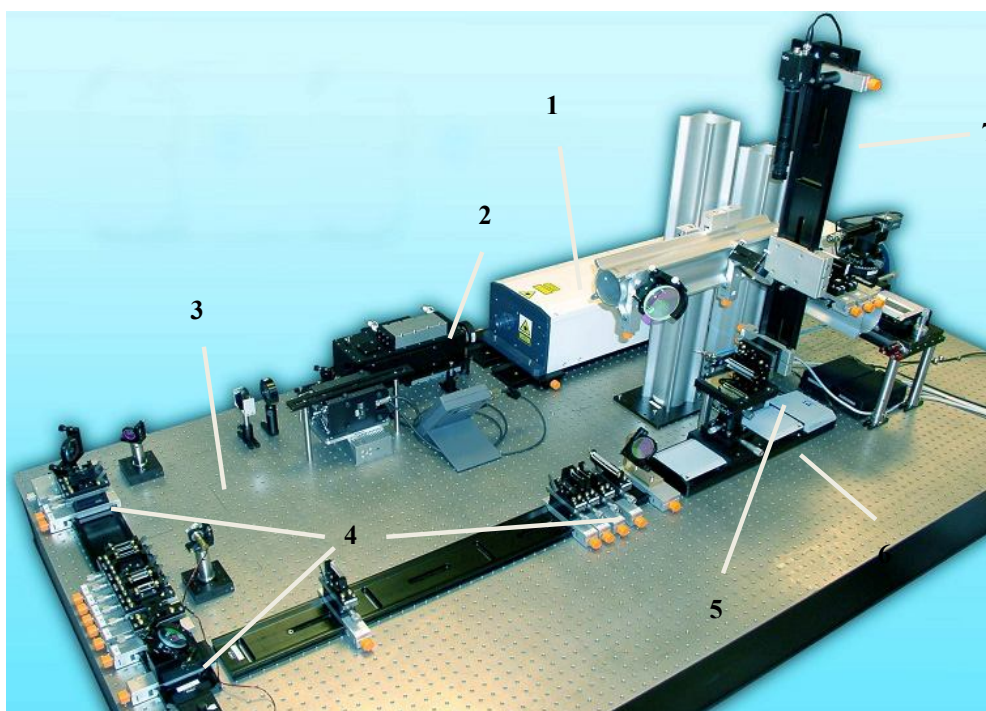


Рис. 2. Основные узлы системы: 1 – диодный лазер; 2 – аттенуатор; 3 – оптический стол; 4 – элементы оптической системы; 5 – столик для подложек; 6 – система приводов столика; 7 – видеокамера

Кроме сложной оптической системы, предназначенной для преобразования лазерного луча круглого сечения в луч линейного сечения, в состав лазерного генератора LIMO входят следующие основные модули табл. 1 [1]:

- управляемый шаговым двигателем аттенюатор, предназначенный для регулировки выходной мощности лазера (диапазон регулировки выходной мощности – от 96 до 1 % с шагом 1 %);
- движущийся столик для подложек (с помощью которого осуществляется сканирование), управляемый шаговыми двигателями;
- система управления фокусом лазерного пучка, включающая в себя ПЗС-камеру и обеспечивающая очень точную настройку пучка для прецизионного сканирования;
- измеритель мощности, который устанавливается по ходу луча вместо одного из элементов оптической системы;
- два персональных компьютера для программного управления лазером и сканирующей системой.

Таблица 1

Основные характеристики лазерного комплекса LIMO 100-532/1064-4

Рабочая длина волны, нм	532–1064
Длина лазерной линии, мм	60
Ширина лазерной линии, мкм	10
Максимальная мощность лазера, Вт	140
Рабочая частота импульсов, кГц	100
Длительность импульса, нс	45
Однородность пучка лазерного излучения по длине линии	Не менее 98,5 %

На рис. 3 представлена схема блоков подсистемы «красная линия» (1064 нм).

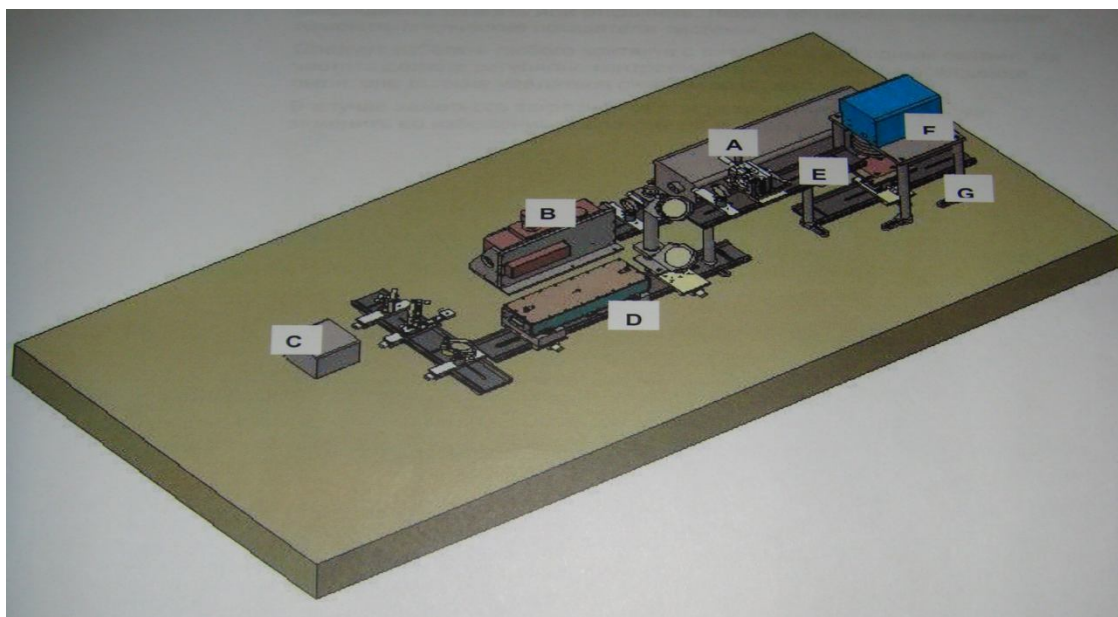


Рис. 3. Блоки подсистемы 1064 нм

Необходимая мощность лазера, регулируемая через аттенуатор, зависит от материала образцов и от технологического процесса исследований. Измеритель мощности необходим для контроля ослабления мощности лазера. В процессе регулировки ослабления мощности в оптический путь с использованием подвижной ступени (С) необходимо установить зеркало (В) с целью отклонения лазерного пучка в направлении рабочей головки измерителя мощности. После регулировки мощности лазера зеркало из оптического пути пучка необходимо удалить. Блок позиционирования масок (А) установлен между линзой полевого позиционирования (В) и сканером (С). Точное положение образца может регулироваться в вертикальном и горизонтальном направлениях с точностью до 10 мкм.

Блок позиционирования установлен на магнитной панели с фиксацией положения, поэтому позиция образца не меняется при временном удалении и новой установке блока.

Рассчитаем мощность и энергию в лазерном импульсе, требуемые для проведения исследований оптоакустического эффекта в модельных биожидкостях.

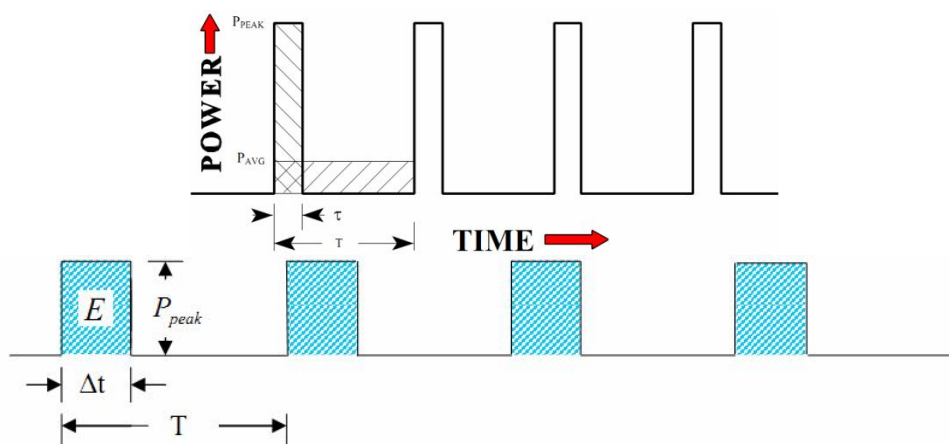


Рис. 4. Средняя и пиковая мощность в лазерном импульсе

Пиковая мощность соответствует мощности каждого отдельного лазерного импульса и определяется по формуле

$$P_{peak} = \frac{E}{\tau}, \quad (1)$$

где E – энергия в импульсе; τ (или Δt) – длительность импульса.

Средняя мощность соответствует усреднённой мощности по одному полному периоду между импульсами и определяется по формуле

$$P_{avg} = Ef_{rep} = \frac{E}{T}, \quad (2)$$

где f_{rep} – частота следования импульсов; T – период импульсов.

Длительность импульса может быть очень маленькой (пикосекунды или фемтосекунды), что приводит к очень большой пиковой мощности и относительно низкой энергии импульса, или может быть очень большой (миллисекунды), что приводит к низкой пиковой мощности и высокой энергии импульса при одинаковых средних мощностях.

Экимерный лазер может иметь длительность импульса 10 нс, энергию в импульсе 10 мДж и рабочую частоту следования импульсов 10 импульсов в секунду (Гц). Этот лазер будет иметь пиковую мощность 1 МВт и среднюю мощность 100 мВт.

Приравняв выражения (1) и (2), получим:

$$P_{peak}\tau = \frac{P_{avg}}{f_{rep}}, \quad (3)$$

$$P_{peak} = \frac{P_{avg}}{f_{rep}\tau}. \quad (4)$$

Преобразовав выражения (3) и (4), получим величину коэффициента заполнения $D_{DutyCycle}$ для последовательности импульсов (величина, обратная скважности), т.е. отношение длительности импульса к интервалу между соседними импульсами (периоду импульсов) или отношение средней мощности лазера к его пиковой мощности:

$$D_{DutyCycle} = \frac{\Delta t}{T} = \frac{P_{peak}}{P_{avg}}. \quad (5)$$

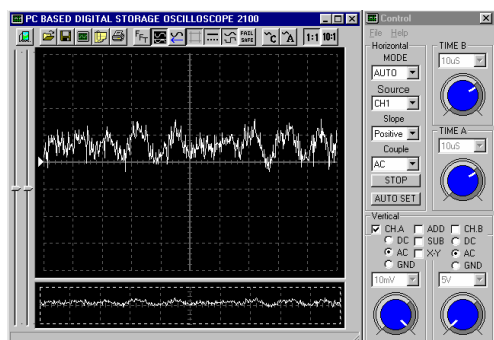
При $f_{rep} = 1000$ Гц и длительности импульса $\Delta t = 1$ мкс величина $D_{DutyCycle} = 0,001$ (табл. 2).

Таблица 2

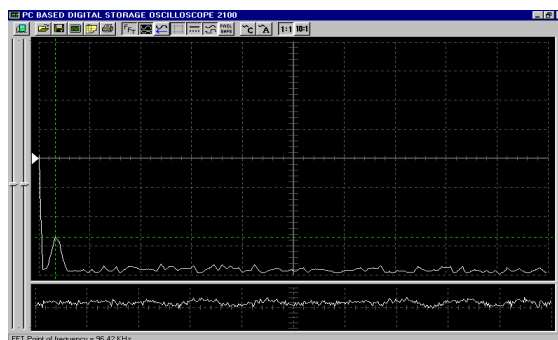
Расчётные параметры экспериментальной установки

Длина волны лазерного излучения, λ	1064 нм
Частота следования импульсов, f_{rep}	10 кГц
Энергия в импульсе, E	11 мДж
Длительность импульса, τ	45 нс
Диаметр луча, d	3,5 мм
Средняя мощность, P_{avg}	110 (99,3) Вт
Пиковая мощность, P_{peak}	170 кВт

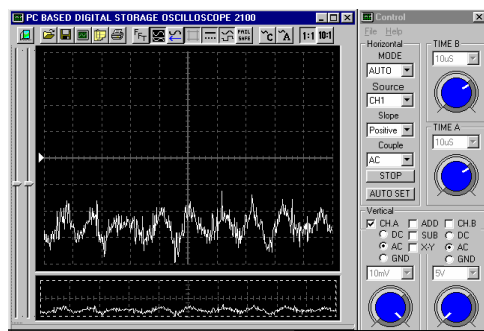
На рис. 5 изображены осциллограммы соответствующих ОА сигналов без и при наличии УНТ. Схема обеспечивает возможное обнаружение сигналов *in vitro* от малых отдельных агрегатов нанотрубок размером 300 нм и более. Более мелкие частицы не влияют на уровень ОА сигнала.



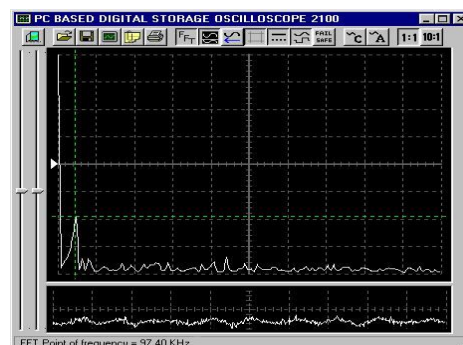
ОА сигнал в 10% растворе желатина



Спектр ОА сигнала
Частота основного ОА сигнала 10 кГц;
амплитуда максимума спектра 11 мВ



ОА сигнал в 10% растворе желатина
с УНТ



Спектр ОА сигнала
Частота основного ОА сигнала 10 кГц;
амплитуда максимума спектра 19 мВ

Рис. 5. Результаты экспериментов по генерации ОА-сигнала в растворах с УНТ и без

Таким образом, разработана и реализована на практике установка для экспериментальных исследований генерации оптоакустических волн в различных суспензиях с использованием комплекса ЛМО. Были подготовлены и исследованы суспензии с различными концентрациями УНТ. Проведен анализ базы записей ОА сигналов, выявлено возрастание амплитуды основной гармоники ОА сигнала в присутствии УНТ.

Список литературы

1. Бондаренко А. Н. Лазерные методы возбуждения и регистрации акустических сигналов / А. Н. Бондаренко. – Москва : Изд-во стандартов, 1989. – 115 с.
2. Джуплина Г. Ю. Оптоакустический цитомер для диагностики тканей / Г. Ю. Джуплина // Инновации и перспективы медицинских информационных систем : тез. тр. I Всерос. молодеж. школы-семинара. – Таганрог : Изд-во ТТИ ЮФУ, 2010. – С. 112-113.
3. Джуплина Г. Ю. Оптоакустический цитомер для подсчета бактериальных клеток / Г. Ю. Джуплина, И. С. Собоитникий, М. С. Шашкин // Ползуновский альманах. – 2009. – № 3. – С. 11-12.
4. Джуплина Г. Ю. Экспериментальные исследования оптоакустического эффекта в модельных суспензиях нанотрубок и нановолокон / Г. Ю. Джуплина, В. А. Закарян, Г. В. Калашников, А. В. Саенко, И. Б. Старченко // Известия ЮФУ. Сер. Технические науки. – 2011. – № 9. – С. 131-135.
5. Zharov V. P. Photothermal image flow cytometry in vivo / V. P. Zharov, E. I. Galanzha, V. V. Tuchin // Opt. Lett. – 2005. – № 30. – P. 628-630.

References

1. Bondarenko A. N. *Lazernye metody vzbuzhdeniya i registratsii akusticheskikh signalov* [Laser methods of acoustic signals for excitation and detection]. Moscow, Publishing House of Standards, 1989. 115 p.
2. Dzhuplina G. Yu. Optoakusticheskiy tsitomer dlya diagnostiki tkaney [Optoacoustic cytometer for tissue diagnostics]. *Innovatsii i perspektivy meditsinskiykh informatsionnykh sistem: tez. tr. I Vseros. molodezh. shkoly-seminara* [Innovations and prospects of medical information systems: proceedings of the First All-Russian Youth School-Seminar]. Taganrog, Technological Institute of Southern Federal University Publishing House, 2010, pp. 112–113.
3. Dzhuplina G. Yu., Sobotnitskiy I. S., Shashkin M. S. Optoakusticheskiy tsitomer dlya podscheta bakterialnykh kletok [Optoacoustic cytometer for counting bacterial cells]. *Polzunovskiy almanakh* [Polzunov's Almanac], 2009, no. 3, pp. 11–12.
4. Dzhuplina G. Yu., Zakaryan V. A., Kalashnikov G. V., Saenko A. V., Starchenko I. B. Eksperimentalnye issledovaniya optoakusticheskogo effekta v modelnykh suspenziyakh nanotrubok i nanovolokon [Experimental researches of optoacoustic effect in model suspensions of nanotubes and nanofibers]. *Izvestiya YuFU. Ser. Tekhnicheskie nauki* [News of Southern Federal University. Series Engineering Sciences]. Taganrog, Technological Institute of Southern Federal University Publishing House, 2011, no. 9, pp. 131–135.
5. Zharov V. P., Galanzha E. I., Tuchin V. V. Photothermal image flow cytometry in vivo. *Opt. Lett.*, 2005, no. 30, pp. 628–630.