

ՀՀ ԿՐԹՈՒԹՅԱՆ ԵՎ ԳԻՏՈՒԹՅԱՆ ՆԱԽԱՐԱՐՈՒԹՅՈՒՆ  
ԵՐԵՎԱՆԻ ՊԵՏԱԿԱՆ ՀԱՄԱԼՍԱՐԱՆ

Ասատուր Ալեքսանդրի Լալայան

**ԼԱԶԵՐԱՅԻՆ ՖԻԶԻԿԱՅԻ ՈՐՈՇ ԿԻՐԱՌՈՒԹՅՈՒՆՆԵՐ  
ԿԵՆՍԱԲԱՆԱԿԱՆ ՀԱՄԱԿԱՐԳԵՐՈՒՄ**

Ա.04.21 – “Լազերային ֆիզիկա” մասնագիտությամբ  
Ֆիզիկամաթեմատիկական գիտությունների դոկտորի  
գիտական աստիճանի հայցման ատենախոսության

**Սեղմագիր**

ԵՐԵՎԱՆ – 2016

---

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

**Лалаян Асатур Александрович**

**НЕКОТОРЫЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЛАЗЕРНОЙ ФИЗИКИ  
В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ**

**Автореферат**

Диссертации на соискание ученой степени  
доктора физико-математических наук  
по специальности 01.04.21 - “Лазерная физика”

ЕРЕВАН – 2016

Ատենախոսության թեման հաստատվել է Երևանի Պետական Համալսարանում

Պաշտոնական ընդդիմախոսներ՝  
Ֆիզ.-մաթ.գիտ. դոկտոր, ՀՀ ԳԱԱ թղթ. -  
անդամ, պրոֆեսոր, Գ. Յու. Կոյունյան  
Ֆիզ.-մաթ. գիտ. դոկտոր, պրոֆեսոր  
Վ. Բ. Առաքելյան  
Ֆիզ.-մաթ. գիտ. դոկտոր Կ. Մ. Ղամբարյան

Առաջատար կազմակերպություն՝  
ՀՀ ԳԱԱ ֆիզիկական  
հետազոտությունների ինստիտուտ

Պաշտպանությունը տեղի կունենա 2016թ. հունիսի 25-ին ժամը 12:00 -ին  
Երևանի Պետական Համալսարանի ֆիզիկայի 049 Մասնագիտացված խորհրդի  
նիստում. Հասցեն 0025, Երևան, Ա. Մանուկյան փ.1  
Ատենախոսությանը կարելի է ծանոթանալ ԵՊՀ գրադարանում:  
Սեղմագիրը առաքվել է 2016թ. մայիսի 22-ին:

Ֆիզիկայի 049 Մասնագիտացված  
խորհրդի գիտական քարտուղար  
 Ֆիզ.-մաթ. գիտ. թեկնածու,  
դոցենտ Վ. Պ. Քալանթարյան

---

Тема диссертации утверждена в Ереванском Государственном Университете

Официальные оппоненты-  
доктор физ.-мат. наук, член-корр.  
НАН РА, профессор Г. Ю. Крючкян  
доктор физ.-мат. наук, профессор  
В. Б. Аракелян  
доктор физ.-мат. наук К. М. Гамбарян

Ведущая организация-  
Институт физических исследований НАН РА

Защита состоится 25-го июня 2016г. в 12:00 часов на заседании  
Специализированного совета по физике 049 при Ереванском  
Государственном Университете по адресу: 0025, Ереван, ул. А.Манукяна, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ЕГУ.  
Автореферат разослан 22-го мая 2016г.

Ученый секретарь  
Специализированного совета 049  
 кандидат физ.-мат. наук,  
доцент В. П. Калантарян

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Роль лазернооптических методов исследований биологических объектов особенно резко возросла в последние годы, что обусловлено существенным прогрессом в области разработок лазерных систем с достаточно удобным управлением различных параметров оптического излучения. Такой прогресс лазерной физики и техники, в свою очередь, привел к формированию биомедицинской оптики, как новой научной дисциплины, которая включила в себя такие направления, как - оптика биологических тканей, низкоинтенсивная оптическая терапия, лазерная хирургия, фотодинамическая терапия злокачественных опухолей, неинвазивная лазерная диагностика различных заболеваний, визуализация в реальном времени биообъектов и т.д.

Среди широкого спектра диагностических методов биомедицинской оптики особенно активно применяется метод лазерного флуоресцентного анализа ввиду высокой чувствительности к малым количествам биоматериала, вплоть до возможности регистрации одной молекулы и хорошей воспроизводимости результатов. В области медицины указанный метод используется для исследования биохимических и биофизических процессов, для оперативного контроля за поступлением и выводом из организма лекарственных препаратов, для диагностики различных заболеваний и т. д .

При исследовании внутриклеточных структур особенно важен уровень пространственного разрешения светового инструмента. В настоящее время разрабатываются схемы ближнеполевой оптической микроскопии высокого пространственного разрешения, а также развиваются альтернативные схемы оптической микроскопии дальнего поля, позволяющие обогнуть дифракционный предел и достигнуть нанометрической шкалы пространственного разрешения [1].

В последние годы в биологических исследованиях и медицинской практике начали широко применяться квантовые точки (КТ), которые принадлежат новому классу люминесцентных биомаркеров [2]. Такие неорганические маркеры не имеют ограничений, обусловленных применением стандартных органических маркеров – люминесцирующих протеинов и начали широко применяться для визуализации и исследования различных биоструктур внутри и снаружи клетки, в условиях “*in vivo*” или “*in vitro*”. Отметим также, возросший интерес к металлическим наночастицам, которые могут быть использованы для осуществления оптического анализа в условиях малого количества биологического материала [3]. Слабые сигналы комбинационного рассеяния или флуоресценции флуорофоров могут быть значительно усилены при расположении в непосредственной близости от наночастиц, находящихся в условиях возбуждения локализованного плазмонного резонанса, когда электроны в наночастицах начи-

нают достаточно интенсивно коллективно осциллировать в отклик на облучение электромагнитным излучением определённой частоты.

Отметим также широкое внедрение в сферу биомедицинских исследований экспериментальных схем с многофотонным возбуждением флуоресценции, что позволяет инициировать новые каналы возбуждения флуоресценции, квантовомеханически запрещенные правилами отбора в режиме однофотонного возбуждения. Данная методика позволяет реализовать схемы высокоселективного взаимодействия и, следовательно, достигается значительное снижение фонового сигнала, регистрируемого от многокомпонентных биологических сред. Здесь новые, перспективные возможности исследования биообъектов открывает использование когерентных эффектов генерации оптических гармоник, нелинейного преобразования частоты. Таким образом, в настоящее время представляется весьма актуальной разработкой и внедрение в практику новых, более информативных лазерных спектроскопических методов исследования свойств биосистем.

**Целью работы** является создание лазерных систем с широким спектром управляемых выходных параметров для проведения спектрально-флуоресцентных и нелинейно-оптических исследований биоткани, в том числе: исследование спектрального состава флуоресценции биотканей: определение вклада натуральных флуорофоров и инжектированных фотосенсибилизаторов, исследование физического механизма процесса тушения флуоресценции пиридиннуклеотидов в биотканях; исследование особенностей генерации второй гармоники в биотканях; разработка методики лазерного синтеза коллоидных наночастиц в жидкой среде и исследование спектральных свойств полупроводниковых квантовых точек; исследование возможности лазерного синтеза гибридных коллоидных полупроводниковых и металлических наночастиц; исследование оптических свойств гибридных наночастиц; разработка комплекса линейно и нелинейно-оптических методов лазерной диагностики и терапии и изучение возможности их клинического применения в биомедицине.

**Научная новизна.** В диссертационной работе:

Разработаны и реализованы новые схемы лазера на красителе с распределенной обратной связью, обеспечивающие непрерывную перестройку пикосекундного излучения в широкой спектральной области.

Предложена и реализована схема лазерного синтеза полупроводниковых и металлических наночастиц методом лазерной абляции в жидкой среде. Выявлены спектральные особенности коллоидных растворов ряда полупроводниковых материалов, зарегистрирован сдвиг спектров в коротковолновую область видимого спектра, обусловленный квантово-размерным эффектом. Показано влияние структуры поперечных мод лазерной генерации на дисперсию размеров наночастиц.

Реализован лазерный синтез гибридных металл-металлических и металл-полупроводниковых коллоидных систем наночастиц. Для гибридных

ных металлических наночастиц зарегистрировано изменение частоты и амплитуды плазмонного резонанса. В коллоидном растворе заряженных металлических и полупроводниковых наночастиц зарегистрировано влияние эффекта Штарка на спектральные свойства квантовых точек Si.

Предложены новые эффективные схемы лазерной хирургии при применении металлических наночастиц и ИК лазерного излучения.

Предложена новая схема комбинированной микроскопии с совмещением особенностей туннельной и оптической микроскопии для достижения нанометрического пространственного разрешения в оптическом диапазоне.

Экспериментально подтверждено наличие неординарных оптических свойств кристалла  $MgF_2$ , обусловленных наличием отрицательной компоненты действительной части диэлектрической проницаемости среды.

Предложена новая схема микроскопии сверхвысокого пространственного разрешения на основе кристалла  $MgF_2$ .

Экспериментально показано наличие аномальной локализации электромагнитной волны в наноразмерной области посредством возбуждения поверхностной волны в схеме двух соприкасающихся металлических поверхностей.

Выявлено различие между спектрами флуоресценции нормальной и опухолевой ткани. Экспериментально продемонстрирована применимость флуоресцентной диагностики злокачественных опухолей человека YAG:Nd лазером.

Выявлены условия процесса тушения автофлуоресценции в биотканях. Показано наличие влияния процесса переноса энергии электронного возбуждения на явление спектрально-однородного снижения уровня автофлуоресценции в фотосенсибилизированных тканях.

Показана возможность лазерной диагностики биоткани на максимальной глубине оптического проникновения при фотосенсибилизаторов второго поколения. Предложен новый многочастотный оптический метод диагностики опухолей с разрешением по глубине.

Экспериментально зарегистрированы нелинейно-оптические явления двухфотонной флуоресценции и фотодиссоциации туморотропных фотосенсибилизаторов в оптически непрозрачных биотканях в поле пикосекундного лазерного излучения.

Впервые получена пикосекундная генерация второй гармоники (ГВГ) в различных мягких тканях животных, и продемонстрирована корреляция эффективности ГВГ с содержанием фибриллярного белка коллагена. Показана возможность нелинейно-оптического метода ГВГ для исследования фазовых (конформационных) переходов спираль-клубок молекул коллагена и определения степени фототермальных повреждений биоткани.

**Научная и практическая ценность** полученных результатов обусловлена важностью внедрения в биомедицинскую практику лазероспектроскопических методов оперативного анализа многокомпонентных

биологических систем, разработкой и внедрением новых биомедицинских технологий с использованием наноразмерных частиц, разработкой и внедрением новых схем оптической микроскопии с наноразрешением.

### **Основные положения и результаты, выносимые на защиту:**

Разработаны и апробированы новые схемы лазера на красителе с рас-пределенной обратной связью, обеспечивающие непрерывную перестройку пикосекундного излучения в широкой спектральной области  $\Delta\lambda = 290\text{нм}$ . На основе исследования спектральных, энергетических и временных параметров излучения выявлены характерные особенности процесса лазерной генерации.

Предложена и реализована схема лазерного синтеза наночастиц методом лазерной абляции в жидкости. Определены люминесцентные свойства коллоидных растворов квантовых точек GaAs и CdS. Зарегистрированы расположенные в синей области видимого диапазона (390-440нм) спектры люминесценции, что обусловлено квантово-размерным эффектом. Из спектральных данных проведена численная оценка размеров КТ, составляющие порядка 2–3нм. Выявлена роль структуры поперечных мод лазерной генерации при синтезе наночастиц GaAs. В случае  $\text{TEM}_{11}$  модовой структуры получен широкополосный спектр с шириной порядка  $\Delta\lambda = 250\text{нм}$ .

Реализован лазерный синтез гибридных металл-металлических и металл-полупроводниковых коллоидных систем наночастиц. Для Au-Ag и Au-Cu наночастиц зарегистрировано изменение частоты и амплитуды плазмонного резонанса. Показано появление фотолюминесценции в коллоидном растворе наночастиц Si-Ni, при смешении раствора наночастиц никеля с нелюминесцирующими кремниевыми КТ. На основе спектральных измерений и теоретического анализа наблюдаемое явление объяснено влиянием эффекта Штарка в стационарном электрическом поле.

Предложены схемы применения металлических наночастиц в лазерной хирургии. Показана возможность эффективного использования ИК лазерного излучения на длине волны 1.06 мкм. Для случая прокрашивания металлическими наночастицами биоткани показано увеличение эффективности лазерной абляции в 3 раза. Предложена и реализована схема точечной лазерной сварки в глубине биоткани.

Предложена новая схема комбинированной микроскопии с совмещением особенностей туннельной и оптической микроскопии для достижения нанометрического пространственного разрешения в оптических исследованиях. Показана возможность реализации такой схемы при регистрации штарковского спектрального сдвига в электрическом поле.

Выявлены особенности отражения излучения от поверхности кристалла  $\text{MgF}_2$ , показано наличие аномально высокого коэффициента отражения  $R \approx 90\%$ , обусловленное наличием отрицательной компоненты действительной части диэлектрической проницаемости среды. Предложена но-

вая схема оптической микроскопии сверхвысокого пространственного разрешения, перекрывающая предел Релея и с величиной разрешения порядка  $\lambda/10$  вдоль оптической оси.

Экспериментально показана возможность аномальной локализации электромагнитной волны в наноразмерной области посредством возбуждения поверхностной волны в схеме двух соприкасающихся металлических поверхностей, с целью разработки схем плазмонно-оптического микроскопии, обладающих сверхвысоким пространственным разрешением.

Выявлены спектральные особенности лазервозбуждаемой флуоресценции биоткани: показано различие между спектрами флуоресценции нормальной и опухолевой ткани при облучении на длине волны  $\lambda = 355$  нм и  $\lambda=440$ нм. Экспериментально продемонстрирована применимость флуоресцентной диагностики злокачественных опухолей человека YAG:Nd лазером, при использовании фотосенсибилизирующего препарата флюоренат.

На основе экспериментального и теоретического анализа выявлены условия процесса тушения автофлуоресценции в биотканях. Показано наличие влияния процесса переноса энергии электронного возбуждения на явление спектрально-однородного снижения уровня автофлуоресценции в фотосенсиблизованных тканях. Показано наличие в биотканях центров одновременной локализации вводимых фотосенсибилизаторов и пиридин-нуклеотидов.

Получены спектры флуоресценции фотосенсибилизаторов второго поколения при возбуждении на длине волны  $\lambda = 660$ нм. Показана возможность диагностики биоткани на максимальной глубине оптического проникновения  $\approx 10$ мм. Предложен новый многочастотный оптический метод диагностики опухолей с разрешением по глубине. Осуществлена апробация метода на экспериментальной модели опухоли при лазерном возбуждении на двух длинах волн ( $\lambda = 355$  и  $\lambda = 660$ нм).

Экспериментально зарегистрированы явления фотодиссоциации и двухфотонной флуоресценции туморотропных фотосенсибилизаторов в оптически непрозрачных биотканях в поле пикосекундного лазерного излучения. Показана возможность генерация второй оптической гармоники в различных мягких тканях животных. Выявлена корреляция эффективности ГВГ с содержанием фибриллярного белка коллагена. Показаны возможности нелинейно-оптического метода ГВГ для исследования фазовых (конформационных) переходов спираль-клубок молекул коллагена и регистрации фототермических повреждений в биотканях.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы обсуждались на семинарах кафедр квантовой электроники, молекулярной физики и общей физики факультета ЕГУ, Центра физики сильных полей ЕГУ, а также представлены на международных конференциях по лазерной физике и нелинейной оптике (Аштарак, Армения 1995, 1996 2004гг.); на между-

народной конференции Laser Applications in Life Sciences, (Люцерн, Швейцария, 2002); на международной конференции Optics Within Life Sciences (Йена, Германия, 1996); на международной конференции Lasers-96 (Портленд, США, 1996), на симпозиуме черноморского региона по прикладному электромагнетизму (Мецово, Греция, 1996); на международных симпозиумах Photonics West (Сан Хосе, США, 1997 и 2002); на седьмом всемирном конгрессе по фотодинамической терапии (Нант, Франция, 1998); на международной конференции Optics Within Life Sciences (Люцерн, Швейцария, 2002); на международном симпозиуме Photonics Europe (Страсбург, Франция, 2004); на 4-ой международной конференции ICPEPA (Лече, Италия, 2004); на 12-ой международной конференции Micro & Nanoscale Technologies for Biosciences, (Монтро, Швейцария, 2008); на международной конференции Ionizing and non-ionizing radiation influence on structure and biophysical properties of living cells (Цахкадзор, Армения, 2015).

Разработанный в диссертации пикосекундный перестраиваемый лазер на красителе "ПикоРОС-2" на всесоюзной юбилейной выставке (Октябрь-70, ВДНХ, 1987) был удостоен золотой медали в составе пикосекундного комплекса для лазерной спектроскопии.

**Публикации.** По теме диссертации опубликовано 45 работ.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация состоит из введения, пяти глав, заключения, списка литературы из 306 наименований. Общий объем диссертации 220 страниц, включая 87 рисунка и 3 таблицы.

## СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

В **введении** дана общая характеристика работы, сделан обзор литературы по теме диссертации, очерчен круг вопросов, рассмотренных в ней, сформулированы основные задачи исследования.

**Первая глава** посвящена экспериментальной технике, в том числе описаны схемы многочастотных и перестраиваемых источников лазерного излучения. В исследованиях, посвященных анализу взаимодействия когерентного лазерного излучения с биологическими системами, и вообще, с молекулярными системами и наноразмерными объектами, нами были применены различные лазерные системы с длительностью импульсов в наносекундном и пикосекундном диапазонах, базирующиеся на твердотельном АИГ:Nd<sup>3+</sup>лазере. Реализованы схемы как одночастотного, так и многочастотного лазерных резонаторов с этим кристаллом. Для исследования режима нелинейного взаимодействия лазерного излучения с биообъектами естественно применение лазеров сверхкороткой длительности, позволяющих достигнуть значительных плотностей мощности возбуждающего излучения без радиационного повреждения образцов. Использование лазерного



излучения пикосекундной длительности позволяет достичь высоких плотностей мощности порядка 3 ГВт/см<sup>2</sup> на основной частоте 1.064 мкм.

В §1.1 приведена схема многочастотного наносекундного YAG:Nd лазера с модуляцией добротности и с дискретным переключением фундаментальных длин волн ( $\tau_n=15$ нс,  $\lambda=1.064, 1.318$  и  $1.338$  мкм) и соответствующих второй и третьей гармоник ( $\lambda=532,660, 670, 440, 355$  нм).

В §1.2 описана схема пикосекундного YAG:Nd лазера с пассивной модуляцией добротности и синхронизацией мод ( $\tau_n=33$ пс,  $\lambda=1.06$ мкм), излучение на фундаментальной длине волны преобразовывалось в нелинейных кристаллах последовательно во вторую и третью гармоники ( $\lambda=0.532$ мкм и  $\lambda=0.355$ мкм).

В §1.3 описаны экспериментально реализованные схемы перестраиваемых лазеров на растворах органических красителей с распределенной обратной связью (РОС). В схемах РОС лазеров, длина волны генерации определяется из условия дифракции Брегга и задается выражением:  $\lambda_2 = n_p \lambda_n / m \sin \theta/2$ , где  $n_p$  - коэффициент преломления активной среды,  $\lambda_n$  - длина волны лазера накачки,  $m$  - порядок дифракции Брегга,  $\theta$  - угол схождения пучков накачки. На Рис.1 показана новая схема РОС лазера с широкой спектральной областью перестройки в видимой и инфракрасной области спектра. Реализована непрерывная перестройка пикосекундного излучения РОС лазера в широком спектральном диапазоне  $\lambda=560-850$ нм с последовательным использованием четырех органических красителей. При этом в новых схемах РОС лазера достигнуто значительное снижение уровня фонового усиленного спонтанного излучения. Рис.2 демонстрирует, что уровень лазерной генерации на два порядка превышает уровень усиленного спонтанного излучения. На основе исследования спектральных и энергетических особенностей лазера на красителе с РОС выявлены характерные особенности пикосекундного режима генерации.

Аналитическое исследование временного поведения лазерной генерации РОС лазера проведено на базе теоретической модели с использованием кинетических балансных уравнений для случая органического красителя, рассмотренной в качестве четырехуровневой активной среды.

Анализ временных свойств РОС лазера на красителе от энергии пикосекундной накачки демонстрирует одноимпульсный и многоимпульсный режимы генерации.

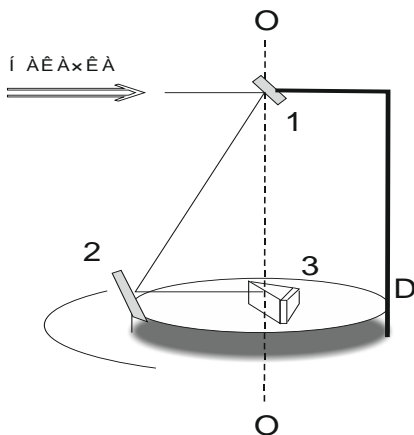


Рис.1. Схема РОС лазера с широкой спектральной областью перестройки. 1 и 2– зеркала, синхронно вращающиеся вокруг оси  $OO'$  диска  $D$ , 3 -РОС кювета с призмным вводом излучения накачки.

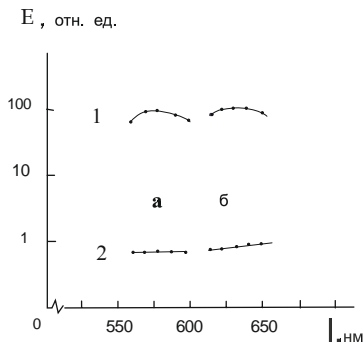


Рис.2. Зависимости энергии генерации (кривая 1), и УСИ (кривая 2) от длины волны для: а) этанольного раствора красителя родамин 6Ж и б) этанольного раствора красителя 6-аминофеноленол.

Показано увеличение числа генерируемых импульсов и сокращение длительности первых генерируемых импульсов с увеличением энергии накачки.

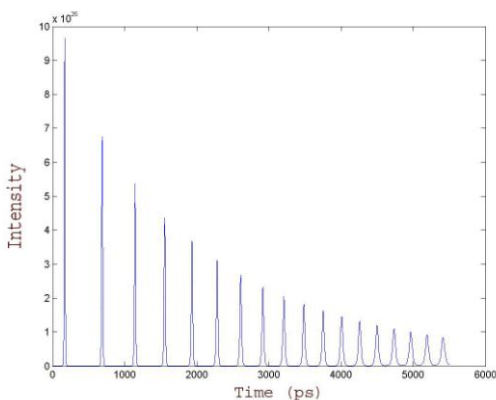


Рис.3. Временной профиль РОС лазера на красителе при  $E_{\text{нак}} = 495$  мкДж. Продолжительность первого импульса  $\Delta\tau = 14$  пс, продолжительность последнего импульса  $\Delta\tau = 74$  пс.

В §1.4 описана схема лазерного источника, плавно перестраиваемого по длине волны с оптической накачкой на длине волны второй гармоники  $\lambda=532$  нм YAG:Nd лазера. Реализована схема с дифракционной решеткой, где глухое диэлектрическое зеркало было заменено на плоскую оптическую решетку работающую в автоколлимационном режиме, по схеме Литтрова. Внутри резонатора также был размещен оптический расширитель пучка.

В §1.5 приведен пример применения перестраиваемых лазеров на красителе в задаче исследования пленения излучения в плотной атомарной среде паров натрия. Исследован процесс девозбуждения электронного состояния методом индуцированного вращения плоскости поляризации. Измерены эффективные времена жизни возбужденных  $3P_{1/2}$ ,  $3P_{3/2}$  состояний натрия, и в температурном интервале 300 - 340<sup>0</sup>С показано наличие эффекта их укорочения от 1650 до 900нс.

**Вторая глава** диссертации посвящена возможности реализации лазерного синтеза коллоидных растворов полупроводниковых и металлических сферических наночастиц методом лазерной абляции в жидкости и применениям их в биомедицинской практике.

В §2.1 предложена и реализована схема лазерного синтеза полупроводниковых сфероидных квантовых точек методом лазерной абляции в жидкости. Исследованы люминесцентные свойства коллоидных растворов КТ GaAs и CdS.

Лл, отн.ед.

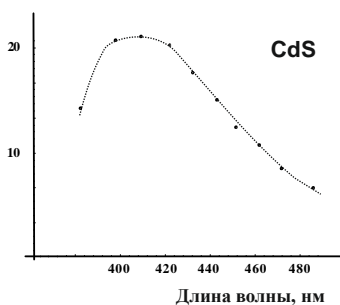


Рис.4.Спектр люминесценции лазеро-синтезированных квантовых CdS.

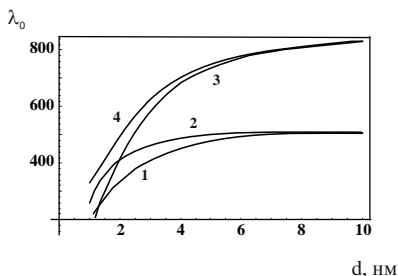


Рис.5. Зависимости длины волны края межзонного поглощения  $\lambda_0(d)$  от радиуса для случаев бесконечного и конечного барьеров для наночастиц CdS (кривые 1и 2) и GaAs (кривые 3 и 4).

Численный анализ показывает, что связанные состояния электрона в квантовых точках GaAs и CdS, находящихся в жидкой среде (с  $U_0 = 5 \text{ эВ}$ ), существуют для значений КТ с радиусом начиная от 2 нм. Теоретический анализ спектральных данных был выполнен на основе квантовомеханического рассмотрения системы электрон-дырка в сферических КТ для модели, как с бесконечным, так и конечным потенциальным барьером на поверхности КТ, в рамках приближения эффективной массы.

Анализ экспериментальных данных указывает на малый размер лазеро-синтезированных КТ, составляющий порядка 2–3 нм.

В §2.2 исследована роль структуры поперечных мод лазерной генерации в случае синтеза коллоидных квантовых точек GaAs. Показано, что в случае  $TEM_{00}$  спектр КТ расположен в голубой области спектра и с малым распределением по размеру порядка 1.5–2.5 нм. В случае  $TEM_{11}$  модовой структуры получен относительно широкополосный спектр с шириной порядка  $\lambda=250 \text{ нм}$ , с пиками на длинах волн  $\lambda=455 \text{ нм}$  (синяя область),  $\lambda=555 \text{ нм}$  (зеленая область) и  $\lambda=640 \text{ нм}$  (красная область), что соответствует распределению по размеру 1.5–4 нм.

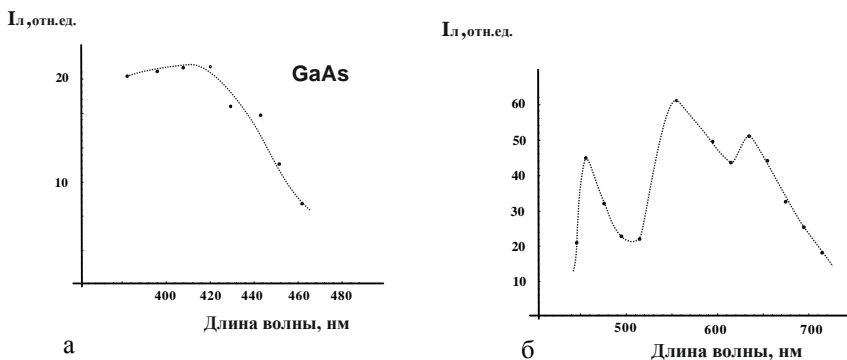
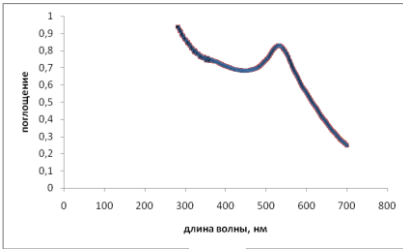
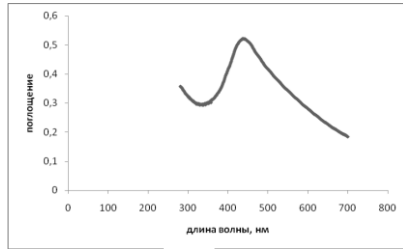


Рис.6. Спектр фотолуминесценции GaAs квантовых точек при а)  $TEM_{00}$  и б)  $TEM_{11}$  структуре поперечной моды лазерного пучка.

В §2.3 реализован лазерный синтез гибридных металл-металлических и металл-полупроводниковых коллоидных систем наночастиц. Для случаев Au-Ag и Au-Cu гибридных металлических наночастиц показана возможность модификации плазмонных свойств: изменение частоты и амплитуды плазмонного резонанса.



а



б

Рис.7. Спектр поглощения водного раствора наночастиц а) золота и б) сплава золота с серебром.

Реализован лазерный синтез и проведено исследование люминесцентных свойств коллоидного раствора смеси кремниевых и никелевых наночастиц (Si-Ni). На Рис.8. приведен спектр фотолюминесценции, появляющейся при смешении коллоидного раствора наночастиц Ni с нелюминесцирующими коллоидными кремниевыми КТ. На основе теоретического анализа наблюдаемое явление объяснено влиянием эффекта Штарка для случая наличия заряженной наночастицы Ni в гибридной системе Si-Ni.

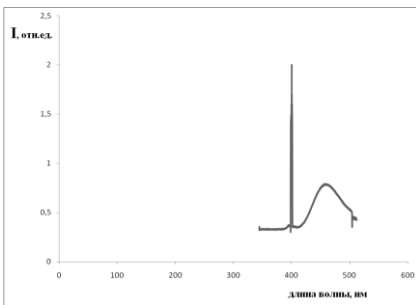


Рис.8. Спектр люминесценции гибридного коллоидного раствора Si - Ni наночастиц.

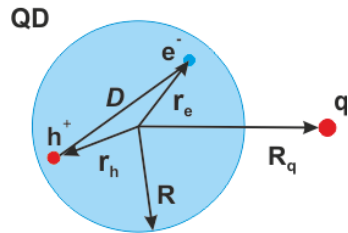


Рис.9. Схема взаимодействия точечного заряда с экситоном на дистанции  $R_q$  от центра КТ.

Сдвиг уровней энергии экситона в кремниевой КТ, вызванный внешним электростатическим полем заряда, может быть оценен с помощью волновой функции  $\psi_0(r_e, r_h)$  для системы электрон-дырка:

$\Delta E = \int dr_e dr_h [\phi(r_h) - \phi(r_e)] \psi_0(r_e, r_h)^2$ . Для вычисления величины  $\Delta E$  можно использовать следующее выражение:

$$\Delta E = \frac{Deq}{R_q^2} \frac{3}{\varepsilon + 2} \left( \frac{\langle z_h \rangle - \langle z_e \rangle}{D} \right) \quad (1)$$

Рассчитанное значение  $\Delta E$  составляет 0.207 эВ, при диаметре кремниевой КТ равной 1.3нм и при минимальной дистанции  $R_q$  от центра КТ до точечного заряда  $q$  с зарядовым числом  $z = 1$ . Такой сдвиг энергии соответствует длинноволновому смещению спектра люминесценции квантовой точки на величину порядка 30нм.

Предложены схемы применения металлических наночастиц в лазерной хирургии. Показана возможность эффективного использования ИК лазерного излучения на длине волны 1.06 мкм. Для случая прокрашивания биоткани наночастицами показано увеличение эффективности лазерной абляции в 3 раза. Предложена и реализована схема точечной лазерной сварки в глубине биоткани.

**Третья глава** посвящена анализу некоторых новых схем оптической микроскопии с наноразмерным пространственным разрешением.

В §3.1 предложена новая схема комбинированной микроскопии с совмещением особенностей туннельной и оптической микроскопии. Так как принцип работы туннельного микроскопа включает в себя механическую манипуляцию заряженным металлическим острием с радиусом

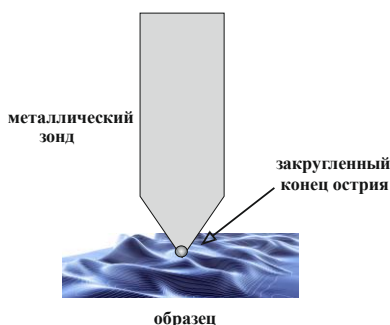


Рис. 9. Металлическая наносфера в качестве острия зонда имеющего радиус кривизны нанометрового масштаба.

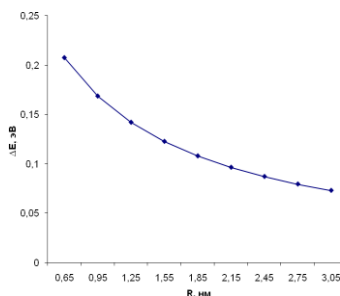


Рис.10. Изменение величины штарковского сдвига при удалении от поверхности образца.

кривизны нанометрового масштаба над поверхностью исследуемого образца, то данная ситуация аналогична взаимодействию металлической наносферы с исследуемой нанолокальной областью образца. В данном случае самый кончик зонда имеет закругленную конфигурацию и фактически играет роль заряженной сферической наночастицы. Влияние этой наночастицы на спектральные свойства близлежащей кремниевой наночастицы вследствие эффекта Штарка можно проанализировать с использованием формулы (1) для вычисления величины  $\Delta E$  при увеличении расстояния от исследуемого образца. Показано, что при удалении от поверхности образца на дистанцию в 1 нм, величина штарковского сдвига уменьшается в два раза и для случая кремниевого материала образца спектральный сдвиг составляет  $\Delta\lambda = 15$  нм. Такое изменение значения величины спектрального сдвига легко детектируется спектральными приборами. Отметим, что выявленная резкая зависимость эффекта Штарка от расстояния позволяет получить пространственное разрешение единиц нанометров, что на порядок превышает разрешение известных схем оптической микроскопии сверхвысокого разрешения. При этом оптические отклики от исследуемой наномасштабной области могут быть линейной и нелинейной природы, такие как сигналы второй и третьей гармоник, сигналы однофотонной и многофотонной флуоресценции, сигналы комбинационного рассеяния.

В §3.2 исследованы неординарные оптические свойства кристалла  $MgF_2$ .

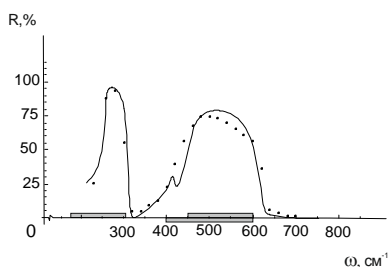


Рис.11. Частотная зависимость коэффициента отражения  $R$  для кристалла при угле падения  $\theta=70^\circ$ . Точками указаны экспериментальные значения, сплошная линия – расчетная кривая. Оптическая ось кристалла перпендикулярна его поверхности.

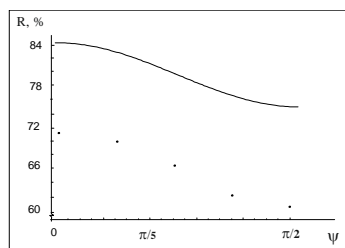


Рис.12. Зависимость коэффициента отражения  $R$  от угла  $\psi$  между оптической осью кристалла (лежащей в плоскости ее границы) и линией пересечения плоскости падения с поверхностью кристалла. Экспериментальные значения указаны точками, сплошная линия – расчетная кривая.

Наблюдающийся в последнее время большой интерес к средам с одновременно отрицательными диэлектрической и магнитной проницаемостями или метаматериалам, имеет как теоретический так и прикладной аспекты. Кристалл  $\text{MgF}_2$ , имеющий разные знаки компонент диэлектрического тензора  $\varepsilon_{ij}$ , обладает рядом неординарных оптических свойств. Особенностью такого кристалла является то обстоятельство, что поверхность волновых векторов (ПВВ) имеет необычный вид и является открытой а не замкнутой поверхностью, а именно, гиперboloидом.

Экспериментально изучены особенности отражения от поверхности кристалла  $\text{MgF}_2$  обусловленные присутствием отрицательной компоненты у действительной части диэлектрической проницаемости среды. Измерения показали наличие аномально высокого коэффициента отражения  $R \approx 90\%$  от поверхности кристалла  $\text{MgF}_2$  в спектральных областях с отрицательной компонентой  $\varepsilon$ . Отметим, что такие высокие значения коэффициента отражения среди природных материалов ранее были известны только у металлов.

В §3.3 рассмотрена возможность реализации оптической микроскопии сверхвысокого разрешения с использованием метаматериалов. В отличие от обычных сред, описываемых эллипсоидом Френеля, в средах с открытой ПВВ можно достигнуть весьма больших значений волнового вектора  $\mathbf{k}$ , в случае когда угол падения  $\alpha$  расположен достаточно близко к касательной гиперболы. Соответственно, длина волны уменьшается, и дифракционные явления в гораздо меньшей степени будут препятствовать реализации качественной фокусировки излучения. На Рис.14 представлена схема фокусировки излучения плоскопараллельной пластиной из кристалла  $\text{MgF}_2$ . Световой источник  $A$  находится на расстоянии  $OA = h_1$  от границы раздела. Точка пересечения  $B$  преломленного луча с нормалью к границе находится на расстоянии  $OB = h_2 = h_1 \operatorname{tg} \alpha / \operatorname{tg} \beta$ . Соотношение  $\operatorname{tg} \alpha / \operatorname{tg} \beta$  можно определить из граничных условий задачи прохождения плоской монохроматической волны через пластинку

$$\frac{\operatorname{tg} \alpha}{\operatorname{tg} \beta} = \left| \frac{\varepsilon_{||}}{\varepsilon_{\perp}} \right| \sqrt{\frac{\varepsilon_{\perp} \left( 1 + \frac{\sin^2 \alpha}{|\varepsilon_{||}|} \right)}{\sqrt{1 - \sin^2 \alpha}}}$$

Это выражение при малых углах  $\alpha$  меняется чрезвычайно мало, и только в значениях четвертого знака после запятой, что иллюстрировано на рис.15.



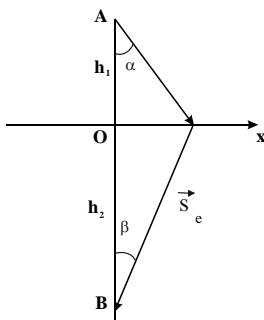


Рис.14. Фокусировка пучка, падающего из точечного источника А на плоскую границу кристалла ОХ.  $\vec{k}$  и  $\vec{S}_e$  – соответственно направления фазовой скорости и распространения энергии в кристалле.

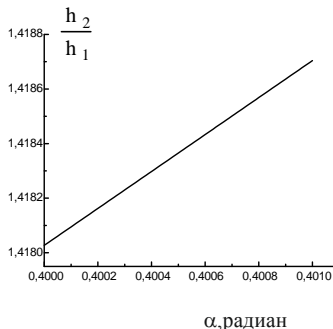


Рис.15. Зависимость отношения  $h_2/h_1$  от угла падения для пластины  $MgF_2$  в случае частоты падающей волны  $\omega = 450\text{см}^{-1}$ .

Из-за такого поведения отношения  $tg\alpha/tg\beta$ , расстояние  $h_2$  до точки В чрезвычайно слабо зависит от  $\alpha$ , и в результате, излучение будет фокусироваться в точке В. Такая особенность среды с открытой ПВВ дает возможность реализовать схему микроскопа сверхвысокого разрешения, используя кольцеобразный пучок и фокусирующую плоскую пластину кристалла  $MgF_2$ . Для формировки кольцеобразного пучка на входную поверхность пластины  $MgF_2$ , можно нанести маску кольцеобразной формы. Качество фокусировки можно оценить из данных Рис.15. При этом отметим, что более качественная фокусировка достигается при малых значениях  $h_1$  и малой расходимости пучка. Численный расчет точности фокусировки вдоль оптической оси схемы показывает, что при значении  $h_1 = 0.5$  см и расходимости пучка 1мрад.,  $\Delta h_2$  составляет 0.5 мкм. Так как в расчетах использована длина волны  $\lambda=5\text{мкм}$ , которая расположена в спектральной области, где одна из компонент тензора диэлектрической проницаемости кристалла  $MgF_2$  отрицательна, то в этом случае точность фокусировки составляет  $\lambda/10$ . Отметим что пространственное разрешение вдоль оптической оси стандартного оптического микроскопа равно 500нм, т.е. в видимой области оно порядка  $\lambda$ .

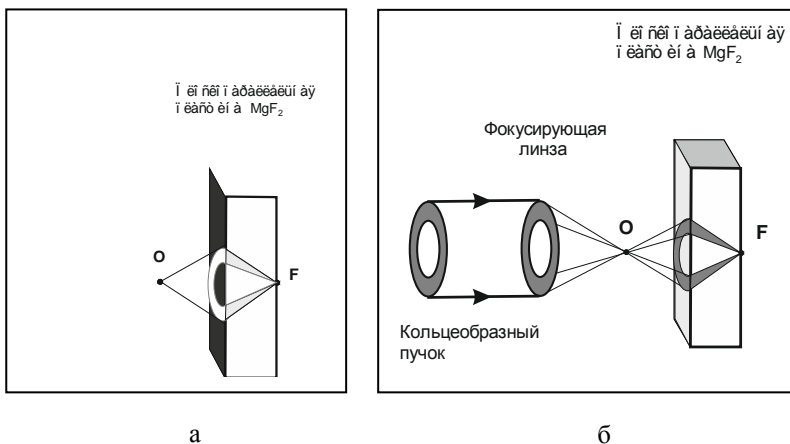


Рис.16. Схемы микроскопа сверхвысокого разрешения с использованием а) точечного источника света и маски кольцеобразной формы, б) пучка с кольцеобразным распределением поля в поперечном сечении.

В §3.4 экспериментально исследована возможность локализации оптического поля в нанометрической области с использованием свойств поверхностных волн. Осуществление такой локализации электромагнитного поля необходимо при реализации современных схем сканирующей оптической микроскопии сверхвысокого разрешения, ввиду необходимости преодоления дифракционного предела. Показана возможность возбуждения поверхностных плазмонов-поляритонов в геометрии, реализуемой при касании двух металлических поверхностей. При проведении экспериментальных исследований было учтено, что между прижатыми друг к другу серебрянными слоями механический контакт осуществляется в отдельных точках. Это является результатом шероховатостей реальных поверхностей, которые в исследуемом нами случае оптически полированных поверхностей имеют нанометрические размеры. В области механического прижима двух серебрянных слоев, лазерный импульс вызывает сильное фотоповреждение образцов. При этом возрастание напряженности волновых полей, вызывающее фотоповреждение, не может быть обусловлено интерференционными эффектами, так как характерный размер неоднородностей между прижатыми друг к другу серебрянными слоями значительно меньше длины волны падающей световой волны. Полученный экспериментальный результат подтверждает возможность возбуждения и нанометрической локализации поверхностной волны для случая рассматриваемой геометрии.

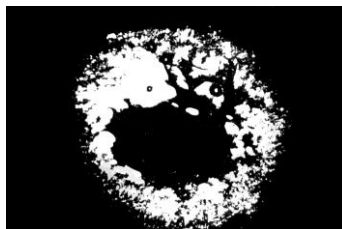
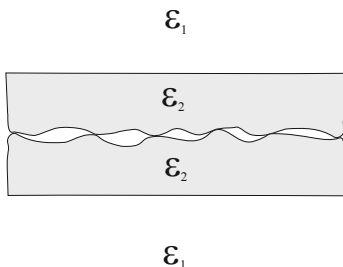


Рис.17.Схематическое представление механического контакта между серебрянными слоями.

Рис.18. Фотографическое изображение фотоповреждения серебрянных слоев в области контакта.

**Четвертая глава** диссертации посвящена исследованию спектральных свойств флуоресценции биотканей. Выявление спектральных особенностей флуоресценции биотканей и биожидкостей в первую очередь инициировано и обусловлено потребностями практической медицины, где основная область применения флуоресцентного анализа - это диагностика патологических процессов в организме.

В §4.1 исследованы спектральные особенности флуоресценции биоткани животных и человека при лазерном возбуждении, с использованием волоконно-оптической системы

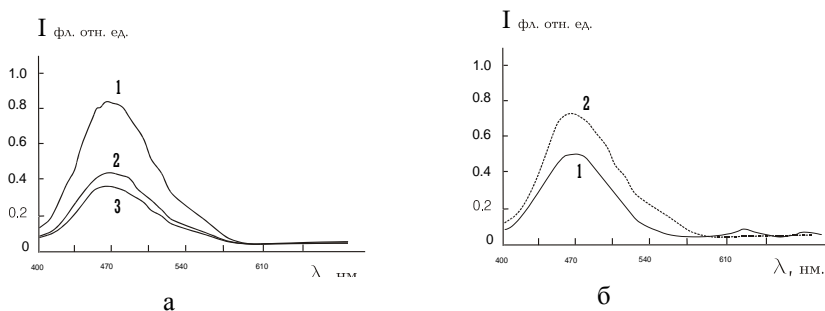


Рис. 19. Спектры автофлуоресценции: а) - кожи (1), селезенки (2), печени (3); б) - нормальной мышечной ткани (2) и саркомы 45 (1) лабораторных крыс в условиях "in vivo". Длина волны лазерного возбуждения  $\lambda = 355\text{нм}$ .

Получены спектры автофлуоресценции различных органов лабораторных крыс и саркомы 45. Показано наличие статистически подтверждаемых характерных различий в спектральном составе тканевой автофлуоресценции при возбуждении третьей гармоникой YAG:Nd<sup>3+</sup> лазера на длине волны  $\lambda=355\text{нм}$ .

В §4.2 с целью увеличения флуоресцентного контраста между нормальной и злокачественной тканями в условиях “*in vivo*” исследованы спектры флуоресценции при фотосенсибилизации организма препаратом флюоренат (динатриевая соль флуоресцеина) внутренних органов лабораторных крыс. С использованием волоконно-оптической системы исследована фармакокинетика препарата в различных здоровых органах и привитой злокачественной опухоли саркома 45. Показано увеличение спектральных различий при контрастно-максимальном накоплении красителя в опухоли и при оптимальном временном интервале между вводом препарата и спектрально-флуоресцентным анализом.

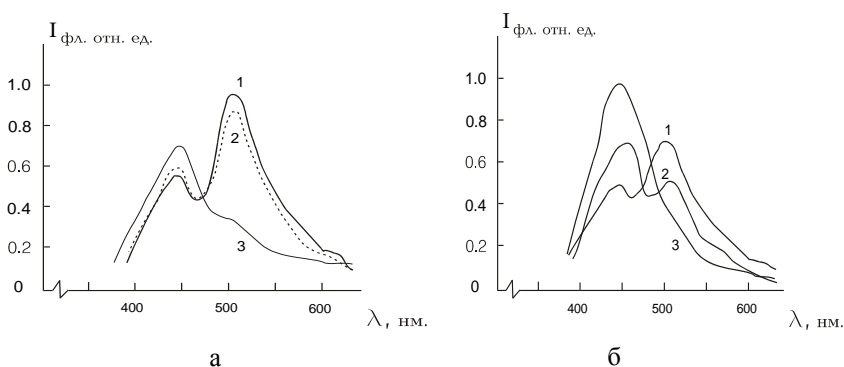


Рис. 20. Спектры флуоресценции а) нормальной и б) опухолевой ткани лабораторных крыс после 4ч (1), 8ч (2) и 32ч (3) от момента инъекции флуоресцеина, в условиях “*in vivo*”. Длина волны лазерного излучения  $\lambda = 355\text{нм}$ .

В §4.3 исследованы особенности и физические механизмы тушения автофлуоресценции в сенсибилизированной туморотропными красителями биоткани. Значительный интерес представляет исследование физического механизма тушения тканевой автофлуоресценции, которая при возбуждении на длине волны  $\lambda = 355\text{нм}$  в основном обусловлена коферментами НАД•Н и НАДФ•Н. Измерены спектры поглощения водных растворов флуоресцеина, хлорина  $e_6$  и флуоресценция водного раствора НАД•Н при длине волны лазерного возбуждения  $\lambda = 355\text{нм}$ . На основе спектральных данных, вычисляя интеграл перекрывания спектров поглощения и флуоресценции получено характеристическое расстояние  $R_0$  переноса энергии

электронного возбуждения для систем НАД•Н – пигмент, которое составило 2 нм для пары НАД•Н - хлорин  $e_6$  и 2.9 нм для пары НАД•Н - флуоресцеин. Результаты исследования по концентрационному тушению флуоресценции водного раствора НАД•Н и сенсibilизированной туморогипночными красителями биоткани показали, что индуктивно-резонансный перенос энергии электронного возбуждения может явиться одним из механизмов для объяснения наблюдаемого в ряде онкологических заболеваний понижения уровня автофлуоресценции в синей области спектра. Экспериментальные результаты по тушению в растворе и биотканях показывают наличие спектрально однородного тушения флуоресценции НАД•Н при низких концентрациях вводимого акцептора. Тушение становится неоднородным, при повышении концентрации акцепторов, то есть с повышением роли радиационного перепоглощения. Спектрально-однородное тушение в биотканях указывает на наличие в ткани центров одновременной локализации на дистанциях  $\leq R_0$  для молекул НАД•Н и вводимых в ткань молекул красителя.

В §4.4 исследованы спектрально-флуоресцентные особенности биотканей человека и продемонстрированы возможности клинической флуоресцентной диагностики злокачественных опухолей человека с применением YAG:Nd<sup>3+</sup> твердотельного лазера и препарата флуоренат.

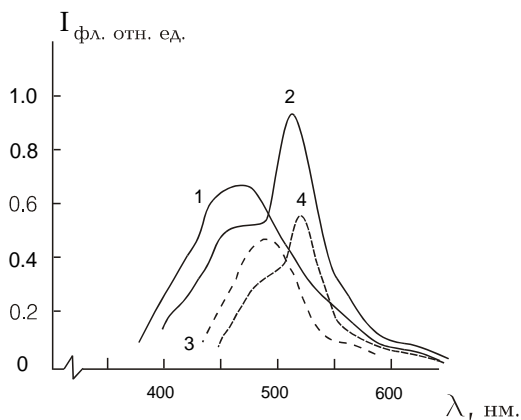


Рис. 21. Спектры флуоресценции нормальной ткани (1), (3) и саркомы верхней части левого легкого (2), (4) человека, после 6ч от момента инъекции флуоресцеина. Длина волны лазерного возбуждения  $\lambda = 355$  нм (1), (2) и  $\lambda = 440$  нм (3), (4).

Диагноз	Число случаев	$\lambda$ нм	К	Т в часах
Опухоль молочной железы	3	440	$1.0 \pm 0.3$	н/и
	3	440	$1.2 \pm 0.3$	6
	5	440	$1.2 \pm 0.3$	12
	2	440	$1.2 \pm 0.4$	18
	3	355	$1.3 \pm 0.4$	н/и
	3	355	$1.3 \pm 0.4$	6
	5	355	$1.4 \pm 0.4$	12
	2	355	$1.3 \pm 0.4$	18
Саркома	4	440	$2.5 \pm 0.6$	6
	5	440	$3.8 \pm 1$	12
	4	355	$2.0 \pm 0.4$	6
	3	355	$2.2 \pm 0.4$	12
Липома	3	440	$1.2 \pm 0.3$	12
Базалиома	2	440	$1.2 \pm 0.4$	12

(н/и – препарат не вводился)

Таблица.1. Зависимость параметра контраста К для различных опухолей и при различном временном интервале Т между вводом туморотропного препарата флуоренат и регистрацией флуоресценции.

На основе спектральных измерений определен оптимальный временной интервал между вводом препарата и флуоресцентным анализом и получены значения параметра флуоресцентного контраста  $K = A_{оп}/A_{норм}$  для опухолей различной локализации при возбуждении на длинах волн 355 и 440нм. Показано, что контрастное накопление красителя не проявляется для исследованных случаев доброкачественных опухолей. В случаях рака молочной железы для основной и контрольной групп величины параметра контраста К близки в пределах ошибки измерений. Так как данная группа пациентов предварительно прошла курс радио или химиотерапии, то этот результат мог быть обусловлен следствиями терапии, то есть наличием фиброза и характерными нарушениями кровоснабжения. Для злокачественных опухолей желудочно-кишечного тракта и саркомы мягких тканей параметр флуоресцентного контраста принимает максимальные значения  $K=3.8$ . Поскольку для участков нормальной ткани  $K = 1$  (с точностью до 25%), то определяемый при флуоресцентном исследовании параметр К может служить достаточно надежным критерием для обнаружения малигнизированных участков.

В §4.5 исследованы спектры флуоресценции фотосенсибилизаторов второго поколения хлорина  $e_6$  и Zn-тетрасульфоталлоцианина. Данные красители характеризуются наличием сильного поглощения в красной и ближней инфракрасной области спектра, что соответствует области минимального поглощения всей совокупности поглощающих компонент биоткани.

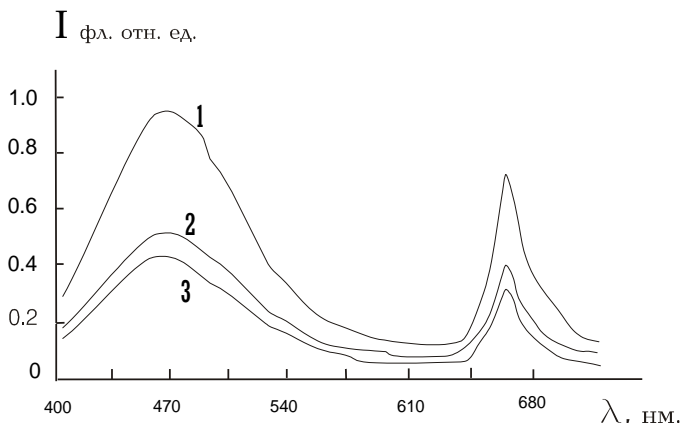


Рис.22. Спектры флуоресценции: кожи (1), печени (2), селезенки (3); на временной дистанции 64 после ввода хлорина  $e_6$  лабораторным крысам, в условиях *in vivo*. Длина волны лазерного возбуждения  $\lambda = 355$  нм.

Выявлена фармакокинетика хлорина  $e_6$  в различных органах лабораторных крыс и привитой саркомы 45. Флуоресцентный контраст, определяемый в виде  $K = A_{\text{оп}} / A_{\text{норм}}$ , где  $A_{\text{оп}}$ ,  $A_{\text{норм}}$  - амплитуды флуоресценции при  $\lambda = 666$  нм для опухоли и нормальных тканей, соответственно, достигал значений  $K \gg 10$ , через временной интервал 18 - 27 часов после ввода красителя.

В §4.6 описан новый лазерный метод определения глубины проникновения опухоли в биоткани. На Рис.23. представлена схема анализа флуоресценции из различных глубин ткани. Фантом опухоли с расположением в различной глубине биоткани создавался изменением расположения покрашенного туморотропным красителем одного слоя ткани среди определенного количества несенсибилизированных идентичных слоев той же толщины. В измерениях применялась волноводная система, где центральное волокно, с диаметром 0.4 мм, использовалось для подвода лазерного излучения к поверхности образца биоткани, а шесть отдельных волокон с диаметром 0.2 мм, которые были симметрично расположены вокруг центрального волокна, использовались для сбора сигнала флуоресценции фотосен-

сенсибилизаторов хлорина  $e_6$  и Zn-тетрасульфоталоцианина. Регистрации флуоресценции производилась на длине волны  $\lambda = 666$  и  $\lambda = 715$  нм, соответственно. Показана возможность флуоресцентной диагностики тканей в области максимальных оптически достигаемых глубин  $\approx 1$  см, при использовании возбуждения на длине волны 660 нм.

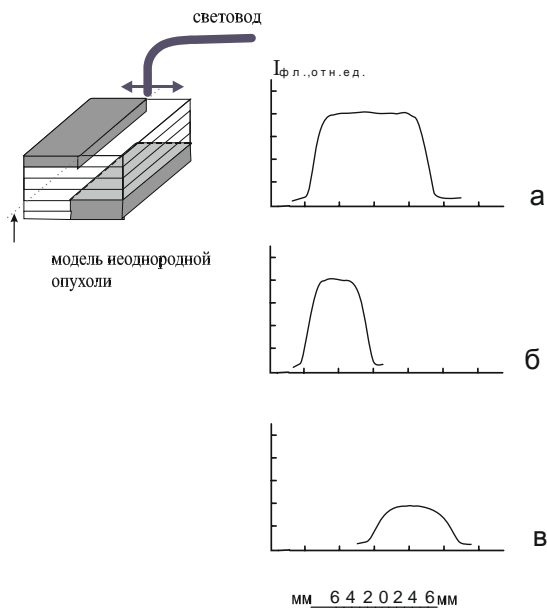


Рис.23. Зависимости интенсивности флуоресценции при сканировании фантома опухоли вдоль оси  $z$ , а) при возбуждении с  $\lambda = 660$  нм, б) с  $\lambda = 355$  нм, в) реконструированный профиль границы опухоли в глубине биоткани (4-10 мм).

На экспериментальной модели опухоли продемонстрирован новый метод диагностирования с разрешением по глубине, с использованием лазерного возбуждения на двух различных длинах волн.

**Пятая глава** посвящена исследованию ряда нелинейных явлений в биотканях и возможности их использования в биомедицинской практике.

В §5.1 исследовано явление двухфотонной фотодиссоциации туморотропных фотосенсибилизаторов в оптически непрозрачных мышечных биотканях.



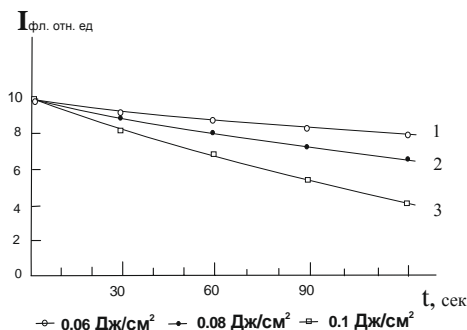


Рис.24. Скорость уменьшения интенсивности флуоресценции хлорина  $e_6$  в тканях в зависимости от интенсивности облучения при  $\lambda = 532\text{нм}$  (частота импульсов 5Гц).

Показано эффективное падение уровня флуоресценции хлорина  $e_6$  в два раза после двух минут облучения (плотности энергии  $0.1 \text{ Дж/см}^2$ ).

В §5.2 исследовано явление двухфотонной флуоресценции опухолевых фотосенсибилизаторов в оптически непрозрачных мышечных биотканях. По сравнению со случаем однофотонного поглощения ( $\sigma \approx 10^{-16} \text{ см}^2$ ), сечение двухфотонного поглощения достаточно мало:  $\sigma \approx 10^{-27} \text{ см}^2$ , при интенсивности  $I = 10 \text{ Мвт/см}^2$  [4], что резко уменьшает возможность фотоповреждающего действия на исследуемые биологические объекты, вызванного поглощением света.

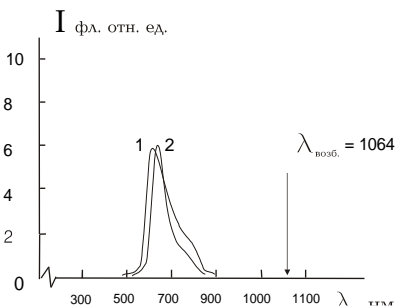


Рис.25. Двухфотонно возбужденные спектры флуоресценции от окрашенных производной гематопорфирина (1) и хлорина  $e_6$  (2) мышечных тканей курицы, при пикосекундном возбуждении.

Использование в двухфотонной схеме лазерного возбуждения, длина волны которого расположена в дальней красной или ближней инфракрасной области спектра, в практических задачах флуоресцентной диагностики ведет к увеличению глубины проникновения в биоткань, что в результате, ведет к увеличению точности и чувствительности оптической диагностики.

В §5.3 показана возможность генерации второй гармоники в биотканях. Экспериментально установлена корреляция эффективности ГВГ с процентным содержанием в биоткани фибриллярного белка коллагена.

	эффективность ГВГ (отн.ед.)	содержание коллагена (%)
дерма	100	20-30
эпидермис	100-150	30-50
мышцы	20-30	5-7
сухожилия	200-300	60-70
фасции	150-200	50-60
хрящи	250-300	60-70
костная ткань	1000	5-10
уровень шумов	3	0

Таблица 2. Эффективность ГВГ в различных типах биотканей.

Так как характерные размеры упорядоченных, анизотропных структур в фибриллярных коллагеновых тканях животных и человека имеют порядок длины когерентного взаимодействия  $L_{\text{ког}} = \lambda_1/4(n_2 - n_1)$ , то в указанных тканях обеспечивается условие для эффективной ГВГ ( $n_1$  и  $n_2$  - показатели преломления среды на частоте основного излучения и на частоте второй гармоники). Показано, что с повышением температуры образца наблюдался резкий спад интенсивности ГВГ до уровня шумов. При охлаждении образца, нагретого свыше  $70^{\circ}\text{C}$ , способность ГВГ не восстанавливалась. При

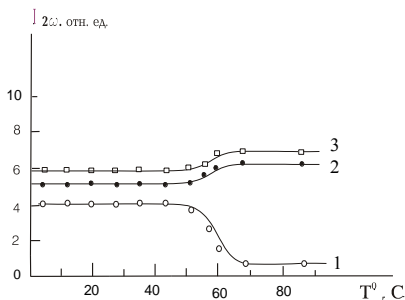
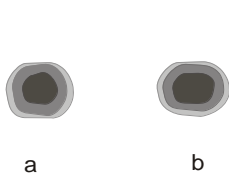


Рис.26. Температурная зависимость интенсивности сигнала второй гармоники  $\lambda = 532\text{нм}$  (кривая 1) и интенсивности рассеяния лазерного излучения на длине волны  $\lambda = 1064\text{нм}$  (кривая 3) и  $\lambda = 532\text{нм}$  (кривая 2), от образца тканей сухожилия.

этом, диапазон температуры, при которых происходил спад интенсивности ГВГ в два раза, находился в интервале 60-64<sup>0</sup>С. В этом диапазоне температур молекула коллагена претерпевает необратимую конформационную перестройку: переход спираль – клубок, то есть превращение жестко упорядочной, двулучепреломляющей структуры в практически изотропную макромолекулу.

В §5.4 исследована поляризационная зависимость сигнала ГВГ в образцах биотканей, имеющих разную структуру. Эксперименты проводились в сравнении с другим нелинейным процессом - двухфотонной флуоресценцией (ДФФ). Для возбуждения сигнала ДФФ с амплитудой, соразмерной с уровнем сигнала ГВГ, образцы сухожилия были прокрашены красителем, обладающих высоким квантовым выходом флуоресценции при двухфотонном возбуждении. Величина сигнала ГВГ была примерно в 2,5 раза больше в случае, когда поляризация лазерного луча была параллельна коллагеновым волокнам, чем в перпендикулярном случае. При этом в отличие от ГВГ, сигнал ДФФ не проявлял какой-либо зависимости от поляризации падающего пучка. Излучение ГВГ при линейно-поляризованном зондирующем пучке было частично поляризовано и степень поляризации составила  $P(2\omega) = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp}) = 0.5$ . Было выявлено, что зависимость рассеяния поляризованного пучка от ориентации фибрилл в упорядоченной биологической ткани является основным механизмом объяснения полученных экспериментальных результатов. Был также исследован случай ГВГ при фототермическом облучении образцов кожи.



- 5
- 10
- 20

Интенсивность ГВГ (отн.ед.)  
 Рис.27. Картина распределения интенсивности ГВГ после лазерного нагрева поверхности в образцах а) фасции и б) сухожилия.

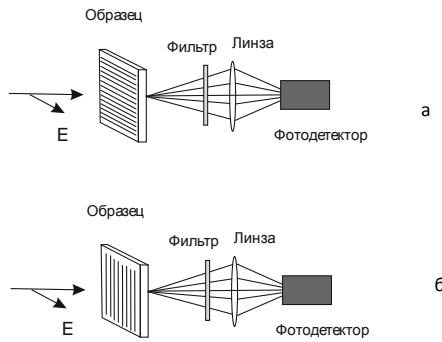


Рис.28. Два случая зондирования образцов: а) поляризация лазерного луча параллельна коллагеновым фибриллам, б) поляризация лазерного луча перпендикулярна коллагеновым фибриллам.

Выявлено изменение интенсивности сигнала ГВГ для случая лазерной абляции участка образца кожи, а также при лазерной сварке двух образцов кожи при сканировании зондирующего пучка.

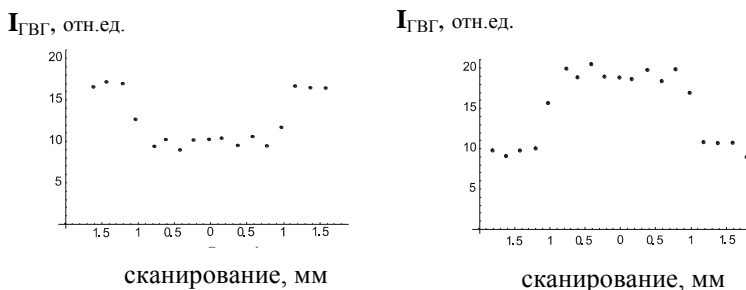


Рис.29. Интенсивность сигнала ГВГ в ходе сканирования зондирующего пикосекундного пучка поперек сварочного шва биоткани (а) и области подвергнутой лазерной абляции (б).

После процедуры лазерной сварки в области шва наблюдается ослабление сигнала ГВГ. В случае же лазерной абляции поверхностного участка кожи наблюдается увеличение интенсивности сигнала ГВГ в два раза, что обусловлено характерной структурой кожной ткани, где коллаген-содержащий слой эластичной ткани расположен относительно глубоко.

#### Литература

1. Choi H.S., Frangioni J.V. Nanoparticles for biomedical imaging: fundamentals of clinical translation. *Mol Imaging*, 2010, V. 9, pp.291-310.
2. Betzig E., Trautman J.K., Harris T.D., Weiner J.S., Kostelak R.L. Breaking the diffraction barrier: optical microscopy on a nanometric scale. *Science*, 1991, V.251, pp.1468-1470.
3. Stuart DA, Haes AJ, Yonzon CR, Hicks EM, Van Duyne RP., Biological applications of localized surface plasmonic phenomena. *IEE Proc Nanobiotechnol*. 2005, V.152, pp.13-22.
4. Тихонов Е.А., Шпак М.Т., Нелинейные оптические процессы в органических соединениях. Киев, "Наукова Думка", 1979.

В заключении сформулированы основные результаты диссертации.

**Результаты диссертации опубликованы в следующих работах:**

1. Арутюнян В.М., Арамян А.Р., Ишханян С.П., Лалаян А.А., Папазян Т.А., Поляриметрическое исследование процессов девозбуждения заселенности резонансных уровней в парах натрия, Труды НИИ ФКС ЕГУ , 1984, стр . 124-134.
2. Лалаян А.А., Папазян Т.А., Саркисян Е.М., Перестраиваемый лазер с динамической распределенной обратной связью, авторское свидетельство о изобретении СССР #1604126 (1986).
3. Папазян Т.А., Саркисян С.М., Погосян Э.М., Лалаян А.А., Манасян Г.С., Перестраиваемый лазер с динамической распределенной обратной связью, авторское свидетельство о изобретении СССР #1507164 (1987).
4. Арутюнян В.М., Арамян А.Р., Ишханян С.П., Лалаян А.А., Папазян Т.А., Исследование времен релаксации возбужденных  $3P_{1,2,3/2}$  уровней в плотных парах атомарного поляриметрическим методом, Изв. АН. Арм. ССР, Физика, 1986, т. 21, В2, стр. 101-103.
5. Лалаян А.А., Папазян Т.А., Манасян Г.С., Погосян Э.М., Саркисян С.М., Снгрян Е.А., Перестраиваемый пикосекундный лазер на красителе "Пико - РОС-2", Квантовая Электроника, 1989, Т.16, В1, стр.175-176.
6. Лалаян А.А., Папазян Т.А., Саркисян С.М., Пикосекундный РОС лазер с широкой областью перестройки", Изв. АН. Арм. ССР, Физика, 1991, т. 26, В1, стр. 27-32.
7. Оганесян В.А., Лалаян А.А., Айдинян Л.Э., Механизмы тушения автофлуоресценции тканей сенсibilизированных туморотропными красителями, Биофизика, 1995, Т.40, В.6, стр. 1308-1312.
8. Лалаян А.А., Оганесян В.А., Применение нелинейно-возбуждаемых флуоресценции и фоторазрушения тканей в диагностике и терапии опухолей. Сборник трудов конференции "Лазерная физика-95", Аштарак, 1995, стр.120-124.
9. Hovanesian V.A., Lalaian A.A., Investigation of Second harmonic generation Peculiarities in Tissues, Proc. of Int. Conference "Lasers -95", Ashtarak, 1995, pp.124-126.
10. Айдинян Л.Э., Галстян А.М., Лалаян А.А., Оганесян В.А., Саакян А.М., Спектрально- флуоресцентные исследования злокачественных опухолей молочной железы и желудочно-кишечного тракта. Медицинская наука Армении, 1996, В. 3-4, стр. 98-103.
11. Hovanesian V.A., Lalaian A.A., Gyolkhandanian G., Laser fluorescence investigation of chlorin e6 pharmacokinetics, SPIE Proc., Bellingham, 1996, v. 2924, pp. 125-129.

12. Yova D., Halkiotis K.N., Ouzunoglou N.K., Hovanessian V.A., Lalaian A.A., Laser- induced fluorescence of tissue by tumor- seeking dyes, Proc. of Int. Conference Lasers -96, Ashtarak, 1996, pp. 41-49.
13. Hovanessian V.A., Lalaian A.A., Second harmonic generation in biofiber-containing tissues, Proc. of Int. Conference Lasers -96, Portland, 1996, pp. 107-109.
14. Hovanessian V.A., Lalaian A.A., Application of multifrequency solid state laser for biomedicine", Proc. of Trans Black Sea Region Symposium on Applied Electromagnetism, Metsovo, 1996, p. BISI4: (1).
15. Lalaian A.A., Hovanessian V.A., Laser system with chlorin e6 for fluorescence diagnosis and photodynamic therapy of tumors, Proc. of Trans Black Sea Region Symposium on Applied Electromagnetism, Metsovo, 1996, p. BISI5: (1).
16. Hovanessian V.A., Lalayan A.A., Second harmonic generation in biological tissues, 6 Int. conference on lasers application in life sciences, Jena, Germany, 1996, Book of Abstracts, p. TL7-3: (1).
17. Hovanessian V.A., Lalayan A.A., Nonlinear decompositions and two-photon fluorescence of molecules in sensitized tissue, Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy VI, Thomas Dougherty Ed., SPIE, 1997, v. 2972, p. 179-182.
18. Aidinian L.E., Lalayan A.A., Galstian, H.M., Multifrequency Nd:YAG Laser for fluorescence diagnosis of human cancer, Proc. SPIE, 1998, v. 3414, pp. 11-16.
19. Lalayan A.A., Aidinian L.E., Fluorescent Sensitizers Detection in Different Depth of Tissue, 7th Congress of International Photodynamic Association, Book of Abstracts, Nantes, France, 1998, p. RC205: (1).
20. Lalayan A.A., Harutyunyan S. G., Depth-resolved tumor phantom detection by second-generation photosensitizers, Proc. SPIE, 1999, v. 3568, pp.19-23.
21. Lalayan A.A., Harutyunyan I.G, Laser Fluorescence Diagnosis of Cancer in Optical Depth by Metallophthalocyanines, International Conference 5th ISABC, Book of Abstracts, Ionnina, Greece, 1999, p.308.
22. Nerkararyan Kh.V., Lalayan A.A., Petrosyan P.G., Superfocusing of Plasmon polariton on rough surface of metal: theory and experiment, ISTC International Seminar, Book of Abstracts, Yerevan, 2000, p. 38.
23. Lalayan A.A., Nonlinear optical phenomena in turbid media of living tissue, Int. Conference ICONO'5, Conference Proceedings, Davos, Switzerland, 2000, v. A10, pp. (1)-(2).
24. Lalayan A.A., Bagdasaryan K.S., Petrosyan P.G., Nerkararyan Kh.V., Ketterson J.B., Anomalous field enhancement from the superfocusing of surface plasmons at contacting silver surfaces, Journal of Applied Physics, 2002, v.91, pp.2965-2068.
25. Lalayan A.A., Janunts E.A, Two-photon fluorescence and second harmonic generation phenomena in the ordered tissue, Proc. SPIE, 2002, v. 4633, pp. 69-73.

26. Lalayan A.A., Janunts E.A., Aydinyan L.E, In real time monitoring of biotissue heating by second harmonic generation technique. OSA Biomedical Topical Meetings), OSA Proceedings, Florida, USA, 2002, pp.TuD 18: (1)- (3).
27. Lalayan A.A., Janunts E.A., Aydinyan L.E, Second harmonic generation and two-photon fluorescence phenomena in ordered biotissue. OWLS Proceedings, Lucerne, Switzerland, 2002, p.76.
28. Lalayan A.A., Nonlinear-optical spectroscopy for tissue diagnostics: application to laser ablation of skin tissue. Proceedings of SPIE, 2004, v. 5463, pp.127-132.
29. Аракелян О.М., Ерицяң О.С., Костанян Р.Б., Лалаян А.А., Геворкян Э.Г., Особенности отражения света от поверхности кристаллов  $MgF_2$  в ИК области спектра. Сборник трудов конференции "Лазерная физика-2004", Аштарак, 2004, стр. 72-75.
30. Lalayan A.A., Nonlinear-optical diagnostics for laser ablation and photo-heating of biotissue, Applied Surface Science, 2005, v. 248, pp. 24-27.
31. Lalayan A.A., Formation of colloidal GaAs and CdS quantum dots by laser ablation in liquid media, Applied Surface Science, 2005, v. 248, pp.209-212.
32. Lalayan A., Avetisyan A. , Djotyan A., The luminescence properties of the colloidal GaAs and CdS semiconductor quantum dots, Laser Phys. Lett., 2005, v.2, pp.12 -15.
33. Eritsyanyan H.S., Papoyan A.A., Lalayan A.A., Arakelyan H.M., Kostanyan R.B., Light reflection and focusing by a plane-parallel plate of a uniaxial crystal with open surface of wave vectors, Journal of Contemporary Physics, 2006, v.41, pp. 14-18.
34. Азарян М.Г., Лалаян А.А., Арзуманян Г.М., Белушкин А.В., Арутюнян В.М., К созданию зондового микроскопа сверхвысокого оптического разрешения. в книге "Ядерная физика и нанотехнологии ядерно – физические аспекты формирования, изучения и применения наноструктур, под ред. А.Н. Сисакяна, Дубна, 2008, стр. 190-197.
35. Lalayan A.A., Laser synthesis of nanoparticles and its application in laser medicine. Proceedings of 12<sup>th</sup> Annual European Conference on Micro & Nanoscale Technologies for Biosciences, Montreux, Switzerland, 2008, pp 100-101.
36. Азарян М.Г., Лалаян А.А., Саркисян Р.В., Арзуманян Г.М., Белушкин А.В., Реализация виртуального обеспечения обратной связи в лабораторном туннельно-токовом стенде, Сборник трудов международной конференции Инженерные, научные и образовательные приложения на базе технологий, NATIONAL INSTRUMENTS, Москва, 2008, стр.76-80.
37. Ерицяң О.С., Лалаян А.А., Аракелян О.М., Папоян А.А., Костанян Р.Б., Кристаллы с открытой поверхностью волновых векторов: особенности отражения и возможности создания плоских линз, Кристаллография, 2010, т. 55 (6), стр. 997–1002.

38. Lalayan A.A., Picosecond distributed feedback laser in infrared -visible spectral range, *Armenian Journal of Physics*, 2010, v. 3 (1), pp. 23-32.
39. Eritsyanyan O.S., Lalayan A.A., Arakelyan O.M., Papoyan A.A., Kostanyan R.B., Crystals with an Open Wave Vector Surface: Peculiarities of Reflection and Possibilities of Designing Flat Lenses *Crystallography Reports*, 2010, v. 55, No. 6, pp. 938–943.
40. Азарян М.Г., Лалаян А.А., Мовсесян О.А., Исследовательский стенд импульсно-лазерной спектроскопии, Сборник трудов X международной конференции Инженерные, научные и образовательные приложения на базе технологий, NATIONAL INSTRUMENTS, Москва, 2011, стр.494-497.
41. Lalayan A.A., Influence of laser beam structure on luminescence properties of laser-synthesized GaAs quantum dots, *Armenian Journal of Physics*, 2014, v.7(3), pp.122-126.
42. Lalayan A.A., Israelyan S.S., Movsesyan H.A., Luminescence properties of the hybrid Si-Ni nanoparticles system, 2015, *Cond-mat.mes-hall*, v. 1, 1339558: (1)-(8).
43. Lalayan A.A., Israelyan S.S., IR-Laser Welding and Ablation of Biotissue Stained with Metal Nanoparticles, 2015, *Physics.bio-ph*, v.1, 1509.04625:(1)-(6).
44. Lalayan A.A., Israelyan S.S., Movsesyan H.A., Formation of hybrid Si-Ni nanoparticles by laser ablation and luminescence properties of such nanosystem, *J. Nanophoton*, 2016, v. 10(1), pp. 012523: (1)-(6).
45. Lalayan A. A., Israelyan S. S., Metal nanoparticles and IR laser applications in medicine for biotissue ablation and welding, *Laser Physics*, 2016, v. 26, pp. 055605: (1)-(5).



## ԱՄՓՈՓՈՒՄ

Ատենտիստությունը նվիրված է կենսաբանական համակարգերում ոչ-գծային օպտիկական որոշ երևույթների և լազերային սպեկտրասկոպիայի, ինչպես նաև նանոսկոպիայի նոր մեթոդների ուսումնասիրությանը՝ ուղղված կենսահյուսվածքների կառուցվածքային պարզաբանմանը և ժամանակակից նանոբժշկության մեթոդների զարգացմանը:

Ստացվել են հետևյալ հիմնական արդյունքները.

Մշակվել և իրականացվել են բաշխված հետադարձ կապով ներկանյութային լազերի նոր սխեմաներ, որոնք ապահովում են պիկովայրկյանային ճառագայթի վերալարումը լայն սպեկտրալ տիրույթում:

Առաջարկվել և իրականացվել է մետաղական և կիսահաղորդչային նանոմասնիկների սինթեզի սխեմա՝ հեղուկ միջավայրում լազերային արյացիայի միջոցով: Պարզաբանվել են մի քանի նանոմետր չափերով կիսահաղորդչային քվանտային կետերի պարունակությամբ կոլլոիդ լուծույթների լյումինեսցենցիոն հատկությունները, գրանցվել է սպեկտրի շեղում դեպի կարճ ալիքի երկարությունների տիրույթ, որը պայմանավորված է չափային քվանտացման էֆեկտով:

Ցույց է տրված լազերային գեներացիայի տարածական կառուցվածքի ազդեցությունը նանոմասնիկների չափային դիսպերսիայի վրա:

Իրականացվել են մետաղ-մետաղ և մետաղ-կիսահաղորդչային կոլլոիդ նանոմասնիկների հիբրիդ համակարգերի սինթեզի սխեմաներ: Հիբրիդային մետաղական նանոմասնիկների դեպքում գրանցվել է պլազմոնային ռեզոնանսի հաճախականության և ամպլիտուդի փոփոխություն: Լիցքավորված մետաղական և կիսահաղորդչային նանոմասնիկների լուծույթում հայտնաբերվել է Շտարկի էֆեկտի ազդեցությունը Si քվանտային կետերի սպեկտրալ հատկությունների վրա:

Առաջարկվել են լազերային վիրաբուժության մեջ նոր արդյունավետ սխեմաներ՝ մետաղական նանոմասնիկների և ինֆրակարմիր լազերային ճառագայթման համատեղ կիրառման դեպքում:

Առաջարկվել է նանոմետրական լուծողականությամբ թունելային-օպտիկական միկրոսկոպի /նանոսկոպի/ սխեմա: Ցույց է տրվել մշակված սխեմայի իրականացման հնարավորությունը էլեկտրական դաշտում շտարկյան սպեկտրալ շեղման միջոցով:

Փորձարարական հետազոտությամբ բացահայտվել են  $MgF_2$  բյուրեղի ինքնատիպ առանձնահատկություններ, որոնք պայմանավորված են

իրական դիվելոպմենտի հաստատունի բացասական բաղադրիչի առկայությամբ, հաշվարկվել և առաջարկվել է այսպիսի բյուրեղի վրա հիմնված օպտիկական միկրոսկոպի նոր սխեմա՝ օժտված գերբարձր տարածական լուծողականությամբ:

Փորձարարական հետազոտությամբ ցույց է տրվել էլեկտրոմագնիսական ալիքների անոմալ լոկալիզացիայի հնարավորությունը նանոչափային տիրույթներում մակերևութային ալիքի գրգռման միջոցով, օգտագործելով երկու հավող մետաղական մակերևութային նոր սխեմա:

Ցույց է տրվել YAG:Nd լազերային գրգռման դեպքում ֆյուլորեցենցիայի սպեկտրների տարբերությունը մարդու և կենդանիների նորմալ ու չարորակ կենսահյուսվածքների համար: Ֆոտոզգայուն ներկանյութերով սենսիբիլիզացման դեպքում ցույց է տրվել YAG:Nd լազերային գրգռմամբ ֆյուլորեցենցիայի մեթոդի կլինիկական կիրառության հնարավորությունը չարորակ նորագոյացությունների ախտորոշման համար:

Ցույց է տրվել ֆիզիկական մեխանիզմով ինքնաֆյուլորեցենցիան հանգցնելու հնարավորությունը սենսիբիլիզացված հյուսվածքներում:

Մշակվել է ուռուցքների դիագնոստիկայի նոր մեթոդաբանություն՝ պայմանավորված ուռուցքի ըստ խորության վերլուծությամբ:

Փորձարարական հետազոտությամբ ցույց է տրվել կասկադային ֆոտոդիսցրման և երկֆոտոն ֆյուլորեցենցիայի բազմաֆոտոն պրոցեսների առկայությունը թյումորոտրոպ /քաղցքեղային հակվածությամբ/ ներկանյութերով սենսիբիլիզացված հյուսվածքներում, պիկովայրկյանային ճառագայթահարման պայմաններում:

Գրանցվել է կենսահյուսվածքում օպտիկական երկրորդ հարմունիկի գեներացիայի երևույթի առկայությունը տարբեր ոչ թափանցիկ կենդանական հյուսվածքներում, ցույց է տրված, որ երկրորդ հարմունիկի գեներացիայի արդյունավետությունը կախված է կոլագեն սպիտակուցների քանակից:

Մշակվել և առաջարկվել է կոլագենի մակրոմոլեկուլի սպիրալ-կծիկ կոնֆորմացիոն անցման դինամիկայի ուսումնասիրության մեթոդաբանությունը: Դիտարկվել է երկրորդ հարմունիկի գեներացիայի մեթոդի կլինիկական կիրառության հնարավորությունը հյուսվածքների լազերային ճառագայթահարման ընթացքում ֆոտոզերմային ազդեցության աստիճանի որոշման համար:

## **Asatur Lalayan**

### **Some Applications of Laser Physics in Biological Systems**

#### **SUMMARY**

This work is devoted to experimental investigation of some optical phenomena in biological systems and development of new methods of laser spectroscopy and high resolution microscopy (nanoscopy) towards the fluorescence diagnostics, determination of biotissue structure and applications in nanomedicine.

The following main results have been obtained:

For realization of research tasks proposed in the current thesis the new schemes of distributed feedback dye laser (DFDL) that provides continuous tuning of wavelength of picosecond laser generation in a wide spectral range have been proposed and implemented.

The scheme of laser synthesis of diverse semiconductor and metallic nanoparticles by laser ablation in liquid medium has been proposed and realized.

The spectral properties of nanoparticles' colloidal solutions of several semiconductor materials have been revealed. Blue spectral shift in the area of the visible spectrum due to quantum-size effect has been registered. The influence of laser beam transverse mode structure on the size distribution of laser synthesized colloidal nanoparticles has been revealed. Laser synthesis of colloidal hybrid metal-metal and metal-semiconductor nanoparticles' systems has been accomplished. The change in wavelength and amplitude of the plasmon resonance for hybrid metal nanoparticles has been revealed. Influence of the Stark effect on the spectral properties of Si quantum dots in the colloidal solution of semiconductor and charged metal nanoparticles has been revealed.

New effective schemes of laser surgery with application of metal nanoparticles and infrared laser radiation have been proposed.

New scheme of combined microscopy with jointed features of scanning tunneling and optical microscopy aimed to achieve nanometer spatial resolution in the optical range has been proposed.

The extraordinary optical properties of  $\text{MgF}_2$  crystal because of existence of negative component of the real part of the dielectric constant of the medium have been experimentally confirmed.

New scheme of ultra-high spatial resolution microscopy on the basis of the plane-parallel plate of  $\text{MgF}_2$  crystal has been proposed.

The possibility of an abnormal localization of electromagnetic wave in the nanoscale region through the excitation of a surface wave in the scheme of two contacting metal surfaces has been experimentally demonstrated.

The difference between the fluorescence spectra of normal and tumor tissue has been revealed. The applicability of the fluorescence diagnosis of malignant human tumors with YAG: Nd laser has been experimentally demonstrated.

The peculiarities of autofluorescence quenching process in biological tissues have been revealed. The influence of the electronic excitation energy transfer effect on the phenomenon of the spectrally homogeneous reduction of autofluorescence in photosensitized tissues has been determined.

The possibility of laser diagnostics of biological tissues at the maximum depth of optical penetration with the second generation photosensitizers has been demonstrated. A new multi-frequency method for optical diagnosis of tumors with a depth resolution has been proposed.

Nonlinear optical phenomena of the two-photon fluorescence and cascade photodissociation of tumor-seeking photosensitizers in optically nontransparent biological tissues at the picosecond laser irradiation have been registered.

Second harmonic generation (SHG) in a variety of soft tissues of animals has been registered for the first time. Correlation of SHG efficiency on the amount of collagen fibrillar protein in the tissue has been demonstrated. The possibilities of the SHG nonlinear-optical method for the investigation of helix-coil phase transition of collagen molecules and determination of photothermal damage of biological tissue have been demonstrated.

