

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РЕСПУБЛИКИ АРМЕНИЯ  
ЕРЕВАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ЦЕНТР ФИЗИКИ СИЛЬНЫХ ПОЛЕЙ

На правах рукописи

Лалаян Асатур Александрович

**НЕКОТОРЫЕ ПРИМЕНЕНИЯ ЛАЗЕРНОЙ ФИЗИКИ  
В БИОЛОГИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ**

01.04.21 – “Лазерная физика”

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора

физико-математических наук

Ереван – 2016

## СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
ГЛАВА 1. РАЗРАБОТКА ПРИМЕНЕННЫХ ИСТОЧНИКОВ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ	
§1.1. Многочастотный наносекундный твердотельный лазер. ....	14
§1.2. Пикосекундный твердотельный лазер .....	17
§1.3. Перестраиваемый по длине волны лазер на красителе с распределенной обратной связью.....	20
§1.4. Наносекундный перестраиваемый лазер на красителе.....	38
§1.5. Применение перестраиваемых лазеров на красителе в задаче исследования временной релаксации заселенности резонансных уровней в парах натрия.....	40
Выводы главы 1 .....	49
ГЛАВА 2. ЛАЗЕРНЫЙ СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ, ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ВОЗМОЖНЫЕ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ	
§2.1. Люминесцентные свойства полупроводниковых наночастиц –квантовых точек, полученных методом лазерного синтеза .....	54
§2.2. Оптические свойства металлических наночастиц полученных методом лазерного синтеза .....	64
§2.3. Лазерный синтез гибридных наночастиц и исследование их оптических свойств ..	68
§2.4. Некоторые возможности применения наночастиц в биомедицине: лазерная абляция и сварка биотканей .....	79
Выводы главы 2 .....	84
ГЛАВА 3. ВОЗМОЖНОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ НАНОМЕТРИЧЕСКОГО РАЗРЕШЕНИЯ	
§3.1. Схема реализации комбинированного зондового микроскопа сверхвысокого оптического разрешения .....	89
§3.2. Неординарные оптические свойства кристалла $MgF_2$ как метаматериала .....	98
§3.3. Возможности микроскопии сверхвысокого оптического разрешения	

с использованием кристалла $MgF_2$ .....	105
§3.4. Возможности локализации оптического излучения с использованием поверхностных электромагнитных волн.....	112
Выводы главы 3 .....	121
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ЛАЗЕРОВОЗБУЖДАЕМОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БИОТКАНИ. ПРИМЕНЕНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ	
§4.1. Спектральные особенности флуоресценции биоткани при лазерном возбуждении	124
§4.2. Флуоресценция биоткани sensibilizированной туморотропными красителями ...	130
§4.3. Особенности и физические механизмы тушения автофлуоресценции в sensibilizированной биоткани.....	134
§4.4. Возможности использования лазервозбуждаемой флуоресценции в онкологической диагностике.....	142
§4.5. Спектральные свойства флуоресценции фотосенсибилизаторов второго поколения хлорина $e_6$ и z- тетрасульфоталацианина в биотканях при лазерном возбуждении...	146
§4.6. Апробация на модели опухоли нового лазерного метода определения глубины проникновения опухоли в биоткани.....	153
Выводы главы 4 .....	158
ГЛАВА 5. НЕЛИНЕЙНЫЕ ОПТИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ В БИОТКАНИ	
§5.1. Фотодеградация туморотропных красителей в sensibilizированной биоткани при наносекундном лазерном облучении .....	161
§5.2. Двухфотонная флуоресценция туморотропных красителей в биоткани при пикосекундном лазерном облучении .....	172
§5.3. Определение роли коллагеновых макромолекул в эффекте генерации оптической второй гармоники в биоткани .....	177
§5.4. Применение метода ГВГ в диагностике фототермальных повреждений биоткани...	185
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	196
ЛИТЕРАТУРА.....	220

## ВВЕДЕНИЕ

Роль лазерооптических методов исследований биологических объектов особенно резко возросла в последние годы, что обусловлено существенным прогрессом в области разработок надежных коммерческих лазерных систем с достаточно удобным управлением различных параметров оптического излучения [1-3]. 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.

Благодаря оперативности, простоте, хорошей воспроизводимости результатов и, что особенно важно, высокой чувствительности к малым количествам биоматериала, вплоть до возможности регистрации одной молекулы [4], среди широкого спектра диагностических методов биомедицинской оптики в последнее время стал активно применяться метод лазерного флуоресцентного анализа. Кроме того, данный метод активно применяется для решения широкого круга задач в области молекулярной биологии, цитологии, вирусологии, иммунологии, биофизики и биохимии мембран [5-7]. В области биомедицины указанный метод используется для контроля важнейших физиологических процессов, для осуществления оперативного наблюдения за поступлением, превращением и выводом из организма лекарственных препаратов, для диагностики различного типа заболеваний, для контроля качества пищевых продуктов и чистоты окружающей среды и т. д [8-10].

Изначально, интерес к развитию метода лазерного флуоресцентного анализа был обусловлен тем фактом, что в составе многих важных биологических объектов входят различные флуоресцирующие компоненты – флуорофоры, и таким образом, их можно оптически характеризовать посредством спектрального анализа испускаемой ими флуоресценции. Так, около 90% всей флуоресценции белков обусловлено наличием в них ароматической аминокислоты триптофана [11,12]. Белки поглощают свет вблизи 280 нм, а наиболее сильно флуоресцируют в области 300 - 350 нм. Время жизни флуоресценции триптофана в белках зависит от типа белка и его третичной структуры. Также флуоресцируют в белках такие аминокислоты, как тирозин, фенилаланин, цистеин и цистин. Собственной флуоресценцией в УФ диапазоне обладает сократительный аппарат, митохондрии и некоторые другие внутриклеточные структуры, причем интенсивность их

флуоресценции зависит от физиологического состояния клеток и меняется при различных воздействиях на клетки.

Полоса поглощения нуклеиновых кислот расположена в спектральной области  $\Delta\lambda = 230 - 270$  нм и определяется входящими в их состав пуриновыми и пиримидиновыми основаниями. Известно что нуклеиновые кислоты в обычных условиях флуоресцируют очень слабо (квантовый выход флуоресценции ДНК при комнатной температуре и при обычных значениях рН составляет порядка  $10^{-4}$ ). При больших концентрациях водных растворов нуклеиновых кислот и их оснований возникает поглощение при  $\lambda = 350$  нм и при обычных температурных условиях и рН наблюдается интенсивная люминесценция вблизи  $\lambda = 450$  нм [13]. Эта фотолюминесценция обусловлена образованием комплексов между основаниями нуклеиновых кислот. Отметим также, что в видимой и ближней УФ частях спектра интенсивно флуоресцируют искусственно выращенные кристаллы оснований нуклеиновых кислот. В областях спектра  $\Delta\lambda = 440 - 480$  нм) [14] флуоресцируют восстановленные пиридиннуклеотиды НАД•Н и НАДФ•Н и окисленные флавопротеиды ФП ( $\Delta\lambda = 10 - 540$  нм). Эти вещества участвуют в таких важнейших внутриклеточных дыхательных процессах как цикл Кребса и анаэробное дыхание- гликолиз. Поэтому, практически незначительные сдвиги в клеточном метаболизме отображаются на динамике свойств НАД•Н и НАДФ•Н и ФП, что, в свою очередь, спектрально может быть выявлено при флуоресцентном анализе живых клеток и тканей. Наличие флуоресценции в красной области спектра обусловлено синтезом в живых клетках производных порфина - порфиринов [15], имеющих у углеродных атомов вместо водорода различные заместители. У ряда животных биологически активными порфиринами являются металлопорфирины – комплексы с железом или медью (гемоглобин, миоглобин, цитохромы). Среди спектральных свойств порфиринов отметим наличие четырех полос поглощения в видимой области спектра и интенсивной полосы Core с максимумом около  $\lambda = 400$  нм. При этом, спектры флуоресценции обычно имеют две полосы - в спектральной области около 630 нм и более длиноволновую, но менее интенсивную - около 660 нм. Собственной флуоресценцией обладают также другие кофакторы, ферменты, витамины, стероиды и гормоны.

Ценную информацию о исследуемых биологических объектах дает то обстоятельство, что в ряде случаев флуоресценция частично поляризована. Анализируя поляризацию флуоресценции можно получить информацию о поведении молекул между поглощением и испусканием фотонов, об ориентации молекул, их подвижности и взаимодействия с окружением. Определение вышеупомянутых закономерностей стимулировало методы исследования биосистем, основанные на поляризационном анализе флуоресценции [16,17].

Существующий временной интервал между поглощением излучения и его испусканием достаточен для протекания целого ряда процессов, каждый из которых ведет к изменению наблюдаемых свойств флуоресценции. К таким процессам можно отнести столкновения с тушителями флуоресценции (например, с молекулами кислорода), вращательная и поступательная диффузия, образование комплексов с растворителем или с растворенными веществами и т. д. Анализ спектральных данных, времен жизни, квантовых выходов а также анизотропии флуоресценции дает большую информацию о таких динамических процессах. Так, в работе [18]. получена картина распределения ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в отдельной клетке, при этом кинетическим индикатором локальной концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  были молекулы флуорофора *Quin-2*, длительность флуоресценции которых возрастает при связывании с ионами  $\text{Ca}^{2+}$  с 1 до 10 нс.

Хорошо известно, что при исследовании внутриклеточных структур пространственное применение традиционных схем оптической микроскопии ограничено, так как пространственное разрешение светового инструмента ограничивается дифракционным пределом. В связи с этим отметим, что в последние годы развитие оптической микроскопии в нанометрических размерах позволило выйти за пределы дифракционного ограничения. Так, в работе [19] наблюдалась кинетика флуоресценции шести молекул хлорофилла, находящихся в области с линейными размерами  $\leq 100\text{нм}$  в светособирающем комплексе фотосинтезирующей мембраны. Фотовозбуждение флуоресценция проводилось пикосекундными импульсами квазинепрерывного лазера на красителе при использовании заостренного световода диаметром  $\approx 100\text{нм}$ , расположенного на расстоянии в 10нм от исследуемого объекта. Величина пространственного разрешения по вертикали используемого ближнеполевого микроскопа была на два порядка меньше длины волны лазерного излучения.

Помимо схем ближнеполевой микроскопии, в последние годы интенсивно развиваются альтернативные схемы оптической микроскопии дальнего поля, позволяющие обогнуть дифракционный предел и достигнуть нанометрического пространственного разрешения. Значительные успехи в визуализации со сверхвысоким разрешением были достигнуты благодаря методикам, которые используют временное или пространственное модулирование перехода между двумя различными состояниями исследуемого биообъекта (например, переключение между безызлучательным и излучательным состояниями).

Среди подобных методов, самыми распространенными являются STED (тушение возбужденного состояния стимулированным излучением [20-22] и SSIM [23] (микроскопия насыщенного структурированного освещения).

В методе SSIM используется нелинейная зависимость скорости излучения флуорофоров от интенсивности лазерного возбуждения. При формировании синусоидального пространственного распределения освещенности с пиковой интенсивностью, близкой к интенсивности насыщения перехода флуорофора из основного состояния в возбужденное, получается муаровая картина, содержащая полосы. Компьютерные методы анализа такой картины позволяют извлечь информацию с высокой пространственной детализацией изображения. В итоге достигается нанометрическое разрешение изображения. При реализации метода SSIM несколько раз проводится сдвиг шаблона освещения, фактически ограничивая временное разрешение этого метода. Кроме того, существует необходимость очень фотостабильных фотосенсибилизаторов, так как процедура получения изображения проводится в условиях насыщения поглощения, к тому же подобные условия возбуждения флуоресценции могут привести к фотоповреждению образца.

Разрабатываются также схемы, основанные на детекции и точной локализации единичных молекул, такие как микроскопия стохастической оптической реконструкции (STORM) и фотоактивируемая локализационная микроскопия (PALM) [24-29].

Методы STORM и PALM основаны на сборе большого количества изображений, получаемых с помощью флуоресцентного микроскопа, содержащих только несколько активных изолированных флуорофоров. Наличие последовательности изображений, полученных для многих излучательных циклов, необходимо для осуществления стохастической активации каждого флуорофора из неизлучательного (или слабоизлучательного) состояния в ярко излучательное состояние и обратно. В течение каждого цикла активации-деактивации плотность активированных молекул поддерживается на достаточно низком уровне, так, чтобы оптические изображения отдельных флуорофоров не перекрывались.

Проведение многочисленных и весьма интенсивных исследовательских работ в данной области дает основание предположить, что в в ближайшие годы разрешение оптической микроскопии достигнет уровня единиц нанометров.

В последние годы в биологических исследованиях и медицинских применениях начали широко применяться квантовые точки (КТ), которые принадлежат новому классу неорганических люминесцентных биомаркеров. Такие неорганические маркеры не имеют ограничений, обусловленных применением стандартных органических маркеров – люминесцирующих протеинов и широко используются для визуализации и исследования различных биоструктур внутри и снаружи клетки, в условиях “*in vivo*” или “*in vitro*”.

Маркеры-наночастицы обычно состоят из неорганического ядра или нанооболочки; они могут быть покрыты органическим слоем и стабилизированы в водном растворе [30]. Такие КТ широко используются в задачах биовизуализации, а также флуоресцентной детекции клеток злокачественных опухолей [31-33].

Существуют методы сопряжения КТ с некоторыми белками или антителами, которые позволяют прикрепить наночастицу к определенному вирусу, бактерии, или локализоваться в опухолевой клетке внутри организма. Излучающие в инфракрасной области спектра КТ могут быть использованы в биотканях для уменьшения уровня собственной флуоресценции [34]. Такие КТ в основном используются для визуализации лимфатических узлов и опухолей [35]. Один из самых перспективных применений таких наночастиц -это фотодинамическая терапия рака, в которой осуществляется сопряжение КТ со специфическими фотосенсибилизаторами, с целью селективного повреждения и гибели злокачественных клеток [36]. Использование коллоидных золотых наночастиц является альтернативой применениям КТ в терапии и диагностике некоторых заболеваний, включая рак. Эти наночастицы уже допущены для лечения заболеваний человека, к примеру, для лечения ревматоидного артрита [37].

С другой стороны, как показали исследования последних лет, золотые или серебряные наночастицы могут быть использованы для осуществления оптического анализа в условиях малого количества биологического материала [38-40]. 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 начинают достаточно интенсивно коллективно осциллировать в отклик на облучение электромагнитным излучением определённой частоты.

В работах [41,42] была показана возможность 10–100 кратного увеличения интенсивности флуоресценции для комплекса органический краситель родамин бж – серебряная наночастица размером  $\approx 14$  нм. При этом, в данных работах показано, что возможно сужение спектра флуоресценции, уменьшение времени релаксации из возбужденного состояния в основное, а также увеличение стабильности органического флуорофора, находящегося вблизи металлической наночастицы. В работе [43] показана возможность самотушения флуоресценции при высоких концентрациях флуорофора вблизи серебряной наночастицы.

Значительные достижения последних лет в области создания лазерных источников сверхкороткой длительности и развитие на их базе новых исследовательских методик,



анализирующих дополнительные каналы взаимодействия высокоинтенсивного лазерного излучения с биологическими системами, открыло новые экспериментальные возможности для исследователей [44,45].

Отметим результаты по тушению молекулярной флуоресценции светом, которое происходит при взаимодействии возбужденных молекул с интенсивным лазерным излучением и обусловлено конкуренцией между вынужденным и спонтанным испусканием фотонов. Тушение флуоресценции флуорофоров с введенными в биосистемы молекулами тушителями является одним из основных методов флуоресцентных исследований. Действие тушителей на характеристики флуоресценции используется, например, при изучении сегментальной подвижности триптофановых остатков в белках [46], пространственно затрудненных движений флуоресцентных меток в липидных бислоях [47], проницаемости макромолекул для полярных и неполярных молекул-тушителей [48]. Поскольку тушение при столкновениях требует высокой концентрации тушителей, то такие исследования осложнены поглощением возбуждающего света тушителями, а также возможным изменением структуры макромолекул при введении тушителей. Эти трудности отсутствуют при использовании в качестве тушителя света [49,50]. Важно, что световое тушение определяется сечением вынужденного испускания, взаимной ориентацией дипольного момента перехода и поляризацией тушащего света на частоте тушения, что позволяет использовать его для спектральной и ориентационной селекции возбужденных молекул.

В последние годы получило широкое развитие использование экспериментальных схем с многофотонным возбуждением флуоресценции [51,52], что позволяет инициировать новые каналы возбуждения флуоресценции, квантовомеханически запрещенные правилами отбора в режиме линейного взаимодействия по интенсивности поля. Данная методика позволяет реализовать схемы высокоселективного взаимодействия, а также позволяет достигать высоких степеней локализации светового поля в исследуемой области пространства и, следовательно, достигается значительное снижение фонового сигнала. Также становится возможным подбор режима минимального поглощения среды за счет оптимального выбора длины волны зондирующего светового поля.

Совершенно уникальные возможности исследований биообъектов в режиме нелинейного взаимодействия открывает использование в оптическом анализе когерентных эффектов генерации оптических гармоник, нелинейного преобразования частоты и т. д. Эти методы позволяют, например, экспериментально исследовать такое свойство живой природы как хиральность [53,54], то есть преимущественный выбор одного: либо левого либо правого из двух возможных зеркальных изомеров одной и той же биомолекулы. Оптические явления

трехфотонного смешения и генерации второй гармоники, обусловленные хиральностью среды, наблюдались в оптически активном растворе арабинозы [55,56]. Использование метода генерации второй гармоники широко распространено для исследования физико-химических свойств молекул, образующих ориентированные макроструктуры на поверхностной границе двух сред [57-59], и дало хорошие результаты в применении к таким специфическим биосистемам, как электрически ориентированные пурпурные мембранные пленки (ОПМП) и пленки Ленгмюра - Блоджета [60].

Таким образом в настоящее время остается весьма актуальной разработка и внедрение в практику новых и информативных лазерных спектроскопических методов исследования свойств биосистем, среди которых весьма важную роль могут иметь нелинейно-оптические методы.

Целью настоящей диссертационной работы является:

Создание лазерных систем с широким спектром управляемых выходных параметров и на их основе различных экспериментальных установок для проведения спектрально-флуоресцентных и нелинейно-оптических исследований биоткани.

Исследование спектрального состава флуоресценции биотканей: определение вклада натуральных флуорофоров и инжектированных фотосенсибилизаторов.

Исследование физического механизма процесса тушения флуоресценции пиридиннуклеотидов в растворе и в сенсibiliзированных 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.

Диссертационная работа состоит из пяти глав, введения и заключения.

В первой главе описана экспериментальная техника, схемы многочастотных и перестраиваемых источников лазерного излучения, в том числе, новые разработки пикосекундного лазера с распределенной обратной связью (РОС). Приведен пример их применения в задаче исследования пленения излучения в плотной атомарной среде.

Во второй главе описана новая схема лазерного синтеза полупроводниковых и металлических наночастиц методом лазерной абляции в жидкости. Исследованы люминесцентные свойства коллоидных растворов полупроводниковых квантовых точек размерами порядка 1.5–4 нм. Исследована роль структуры поперечных мод лазерной генерации в ходе синтеза коллоидных КТ для случаев  $TE_{M11}$  и  $TE_{M00}$  модовой структуры. Осуществлен лазерный синтез гибридных металл-металлических и металл-полупроводниковых коллоидных систем наночастиц, исследованы их плазмонные и спектральные свойства. Предложены схемы и показана эффективность применения металлических наночастиц в лазерной хирургии.

В третьей главе предложены и исследованы возможности оптической микроскопии нанометрического разрешения. Предложена новая схема комбинированной микроскопии с совмещением особенностей туннельной и оптической микроскопии. Показана возможность реализации данной схемы при регистрации штарковского спектрального сдвига в стационарном неоднородном электрическом поле. Экспериментально исследованы неординарные оптические свойства кристалла  $MgF_2$ , обусловленные наличием отрицательной компоненты действительной части диэлектрической проницаемости среды. Предложена и рассчитана новая схема оптической микроскопии на основе кристалла  $MgF_2$  с высоким пространственным разрешением. Исследована особенность возбуждения и локализации поверхностных плазмонов-поляритонов в геометрии, возникающей при касании двух шероховатых поверхностей. Экспериментально исследована возможность аномальной локализации поверхностной волны в определенной наноразмерной области в целях использования данного свойства для разработки новой схемы плазмонно-оптического микроскопа, обладающего сверхвысоким пространственным разрешением.

В четвертой главе приведены результаты спектрально-флуоресцентного исследования биотканей человека и животных при фотосенсибилизации фототропными красителями, физического механизма тушения автофлуоресценции в сенсибилизированных тканях. Рассмотрена возможность клинического применения метода лазера-возбуждаемой флуоресценции в диагностике злокачественных новообразований и описана новая методика оптической диагностики опухолей с разрешением по глубине.

В пятой главе содержатся результаты экспериментального исследования многофотонных процессов каскадной фотодиссоциации и двухфотонной флуоресценции туморотропных красителей, а также, генерации второй оптической гармоники в биотканях, предложена и описана методика изучения динамики конформационного перехода спираль-клубок макромолекул коллагена в тканях. Рассмотрена возможность клинического

применения метода ГВГ для определения степени фототермального действия электромагнитного излучения на биоткань.

Во введении освещено современное состояние флуоресцентных и нелинейно-оптических исследований биологических систем, а также, указаны новые возможности применений нанотехнологий в биологии и медицине.

В заключении сформулированы основные выводы диссертационной работы.

## ГЛАВА 1

### РАЗРАБОТКА ПРИМЕНЕННЫХ ИСТОЧНИКОВ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

В проведенных в рамках диссертационной работы 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.

Были реализованы схемы как одночастотного, так и многочастотного лазерных резонаторов с кристаллом АИГ:Nd<sup>3+</sup>. Использование лазерного излучения пикосекундной длительности позволяет достичь высоких плотностей мощности порядка 3 ГВт/см<sup>2</sup> на основной частоте 1.064 мкм.

Также были использованы методы нелинейной оптики для дискретного преобразования фундаментальных частот лазерной генерации в коротковолновую область спектра и разработаны лазерные источники, плавно перестраиваемые по длине волны в широкой спектральной области 560-850 нм.

## §1.1. Многочастотный наносекундный твердотельный лазер

Способность кристалла АИГ:Nd<sup>3+</sup> генерировать лазерное излучение на различных длинах волн ближнего инфракрасного диапазона была продемонстрирована в работе [61]. Долгое время достижение высокоэнергетичной эффективности лазерного выхода считалось возможным только для лазерных переходов 4F<sub>3/2</sub> - 4I<sub>11/2</sub> (1064нм) и 4F<sub>3/2</sub> -4I<sub>13/2</sub> (пять линий вокруг 1333нм) (см. рис.1.1). В дальнейшем была продемонстрирована возможность эффективной генерации также линии 1444нм [62], для достижения чего использовался специальный подбор условий накачки и конфигурации лазерной головки. Таким образом, только для длины волны 1064нм и линий вокруг 1333нм многочастотный режим генерации лазерных импульсов может быть реализован, без серьезных изменений конфигурации генератора.

Нами реализована схема многочастотного наносекундного лазера с активным элементом АИГ:Nd<sup>3+</sup>, работающего в режиме активной модуляции добротности и с длинами волн основной гармоники 1064 , 1318 и 1332 нм. [63,64] (см. рис. 1.2). Для дискретного переключения длины волны генерации, в лазерный резонатор был установлен дисперсионный элемент - кварцевая призма, вращением которой обеспечивалась установка на определенную длину волны. Коэффициенты отражения зеркал резонатора были подобраны таким образом, чтобы при переключении режимов генерации 1064↔1318 (1332) нм, одно из зеркал являлось бы глухим (R≈100%) для соответствующей длины волны. Выходное излучение последовательно преобразовывалось во вторую и третью оптические гармоники в нелинейных кристаллах KDP и LiIO<sub>3</sub>. Энергия импульса для третьих гармоник 355 и 440 нм, соответственно составляла E=5 и 2мДж, длительность импульса - 15нс, частота следования - до 25 Гц.

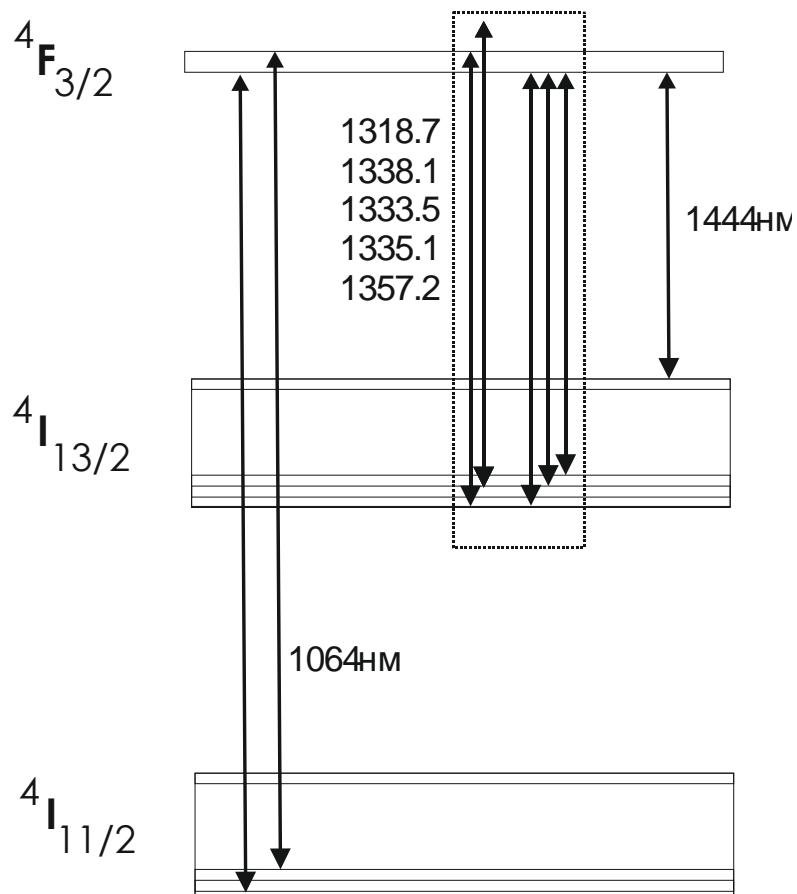


Рис.1.1. Схема основных лазерных переходов в кристалле АИГ Nd<sup>3+</sup>

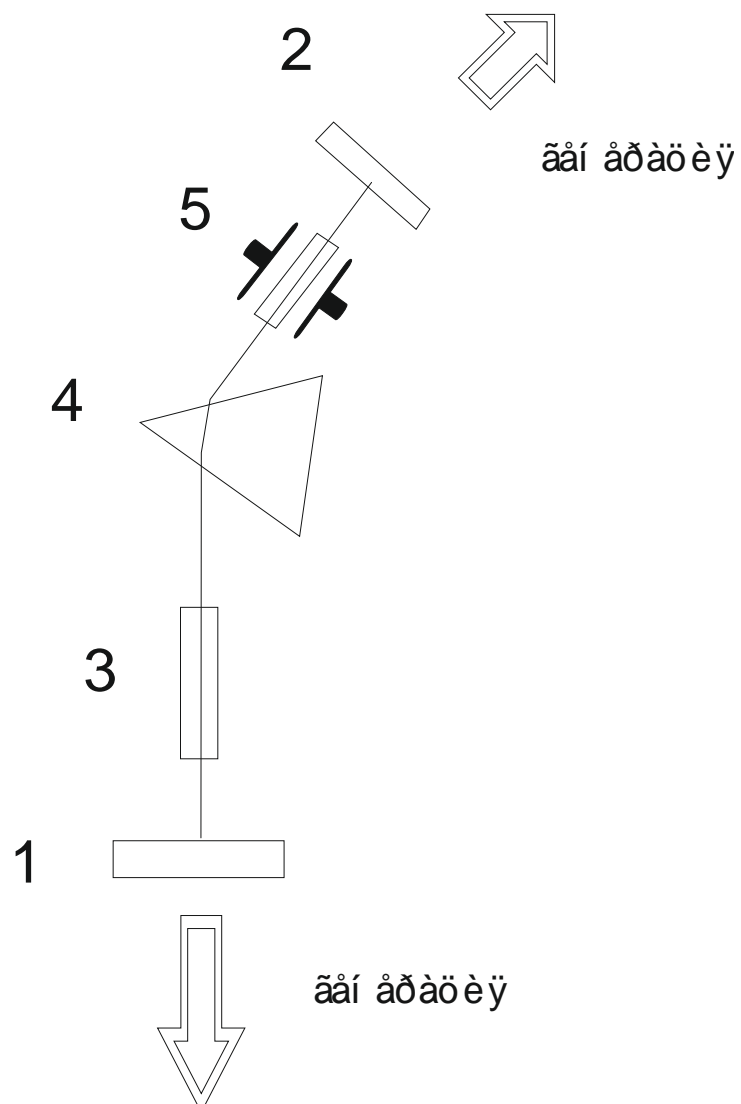


Рис.1.2. Блок - схема многократного АИГ  $\text{Nd}^{3+}$  лазера.

1, 2 - диэлектрические зеркала, 3 - АИГ  $\text{Nd}^{3+}$  кристалл,

4 - кварцевая призма, 5 - электрооптический затвор.



## §1.2 Пикосекундный твердотельный лазер

Для проведения исследовательских работ в режиме многофотонного взаимодействия был реализован пикосекундный лазер по схеме приведенной в работе [65]. Для получения пикосекундной генерации непосредственно возле глухого зеркала оптического резонатора размещалась полимерная пленка толщиной 0.3мм и допированная фотопросветляющим красителем 3274У [66]. Выходным зеркалом служила клиновидная стеклянная пластина с углом клина  $12^{\circ}$ . Указанная оптическая схема резонатора обеспечивает наиболее оптимальный режим синхронизации и исключает режим расщепления как самого цуга, так и импульсов в цуге. Временной интервал между пикосекундными пачками задается длиной резонатора:  $t = 2L/c$  и в нашем случае составлял 10нс. Изменение поляризации лазерной генерации осуществлялось вращением тонкой стеклянной пластины, расположенной на оптической оси внутри резонатора, под углом Брюстера. Селекция продольных мод производилась диафрагмой с диаметром 2 мм.

Одиночный импульс выделялся из цуга генерационных импульсов с помощью системы выделения, с использованием поперечного электрооптического эффекта Погкельса. В качестве активного элемента электрооптического затвора использовались кристаллы DKDP. Работа электрооптического затвора происходит по следующей схеме: излучение лазерной генерации проводится через систему поляризатор-анализатор, представляющую собой пару скрещенных призм Глана-Томсона. Начальные пикосекундные пачки из переднего фронта цуга отражаются анализатором на фототранзистор КТ 603А с прозрачным окном для доступа излучения к р-п переходу. Световое излучение с интенсивностью, достаточной для инициации лавинного пробоя, при попадании на р-п переход образует фотоэлектрический импульс с амплитудой 25-30 В и крутым фронтом, не превышающей одну наносекунду. Затем, электрический сигнал в цепи последовательно включенных транзисторов КТ 603А формируется в сигнал, амплитудой, превышающей полувольтное напряжение при этом сохраняя крутизну фронта, и подается на электрооптические кристаллы. Для одного из центрально расположенных в цуге пачка, посредством временного согласования, обеспечивается полувольтное напряжение на кристаллах и таким образом

осуществляется вращение плоскости поляризации на  $\pi/2$ . В данной схеме через систему поляризатор - анализатор электрооптического затвора, практически без потерь в амплитуде, проходит только одиночный пикосекундный импульс.

Выделенный, таким образом импульс, усиливался по двухпроходной схеме в синхронизированном по времени усилителе, в котором активный элемент также изготовлен из аллюмоиттриевого граната с неодимом и представляет собой цилиндр с длиной 10см и диаметром 10мм. После двухпроходного усилителя интенсивность лазерного излучения достигала  $3 \text{ ГВт/см}^2$ . На выходе лазерное излучение коллимировалось телескопической системой и направлялось в нелинейный кристалл KDP длиной 2см, где при угле синхронизма  $\theta_{\text{ооe}} = 41^{\circ}$  фундаментальная гармоника с длиной волны 1.064мкм эффективно преобразовывалась во вторую гармонику с длиной волны 532нм. Далее в кристалле KDP длиной 4см излучение преобразовывалась в третью гармонику с длиной волны 355нм, при угле синхронизма  $\theta_{\text{eoe}} = 58^{\circ}$ . В указанном нелинейно-оптическом процессе фундаментальная гармоника с длиной волны 1.064мкм оптически смешивалась со второй гармоникой с длиной волны 0.532мкм. На выходе лазера вторая и третья гармоники спектрально фильтровались соответствующими светофильтрами.

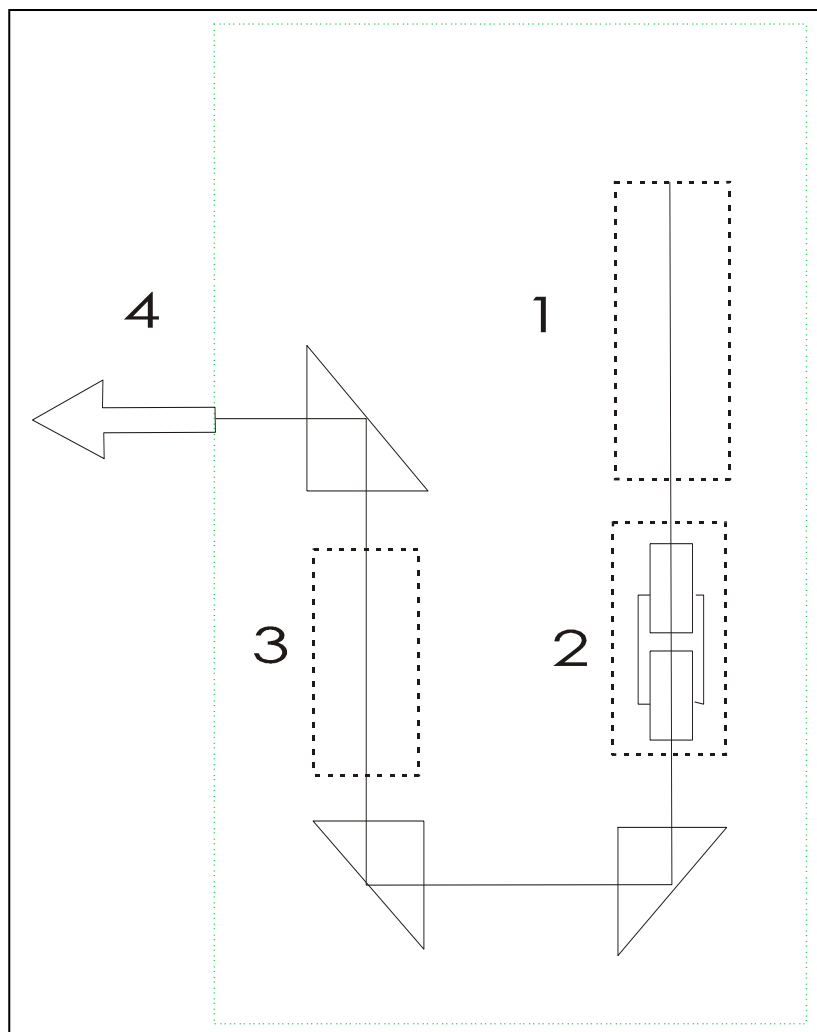


Рис.1.3. Блок- схема пикосекундного АИГ  $\text{Nd}^{3+}$  лазера,  
 1- резонатор, 2- система выделения одиночного импульса,  
 3- усилитель, 4- выходное излучение.

### **§1.3. Схемы перестраиваемого по длине волны лазера на красителе с распределенной обратной связью**

Перестраиваемое по частоте лазерное излучение широко применяется и находит все новые области применения в ходе научно-технических исследований в различных отраслях биологии, химии, медицины, оптики, лазерной спектроскопии, нанотехнологий и т. д. Широкое применение такие источники находят в биомедицине, в методах исследования с использованием селективно возбуждаемых флуоресцентных зондов, в двух и трехмерных флуоресцентных микроскопах основанных на высокоселективных многофотонных схемах возбуждения флуоресценции, для определения зависимости от длины световой волны оптических параметров тканей и т.д. Ввиду того что спектральные полосы поглощения как эндогенных флуорофоров биотканей и биожидкостей, а так и широко применяемых в качестве флуоресцентных зондов экзогенных высокомолекулярных органических соединений расположены в широкой спектральной области 190-750нм, то для целей флуоресцентной диагностики, несомненно наиболее оптимально применение лазеров с красителями в качестве активной среды, отличающихся широкой областью перестройки в данной спектральной области [67, 68].

Нами были реализованы различные схемы лазеров на красителе с лазерной накачкой на длине волны 532нм (вторая гармоника АИГ:Nd<sup>3+</sup> лазера). Экспериментально исследован пикосекундный режим генерации лазера на красителе с распределенной обратной связью (РОС): на основе исследования спектральных и энергетических параметров излучения, выявлены характерные особенности процесса. Предложены и апробированы новые схемы РОС лазера, обеспечивающие перестройку пико-фемтосекундного излучения в широкой спектральной области.

Одним из наиболее удобных перестраиваемых источников является лазер с распределенной обратной связью (РОС) с оптической накачкой, отличающийся спектрально узкой линией излучения, получаемой без применения внутрирезонаторных дисперсионных элементов, компактностью, возможностью генерации одиночных -как наносекундных так и пикосекундных и субпикосекундных импульсов, в том числе, при накачке импульсами значительно большей длительности [69]. В схемах лазеров с РОС (рис.1.4), когерентные лазерные пучки накачки интерферируют в активной среде, производя в ней периодические изменения коэффициентов усиления и преломления, которую можно представить как наведенную в среде систему полупрозрачных зеркал. Период фотонаведенной световой

решетки зависит от угла пересечения пучков и определяет преимущественные частоты, на которых возможна лазерная генерация. При этом длина волны лазерной генерации определяется условием дифракции Брегга :

$$\lambda_2 = n_p \lambda_n / m \sin \theta/2,$$

где  $n_p$  - коэффициент преломления активной среды ,  $\lambda_n$  - длина волны лазера накачки,  $m$  - порядок дифракции Брэгга ,  $\theta$ - угол схождения пучков накачки.

Отметим что дифракция Брэгга для высших порядков ( $m>1$ ) в синусоидально модулированных структурах малоэффективна и использование в практике имеет смысл только для первого порядка дифракции  $m = 1$ . Для случая активной среды – этанольного раствора лазерного красителя, значения  $n_p = 1.36$  и при углах падения, не превышающих угол Брюстера, значение  $\lambda_r / \lambda_n$  не менее 1.4. Таким образом здесь удобнее использование схемы с призмным вводом излучения в активную среду [68] и в этом случае:

$$\lambda_2 = n_p \lambda_n / n \sin( 45 + \beta),$$

где  $n$  - коэффициент преломления призмы,  $\beta$  - угол преломления.

В схемах с РОС с интерферирующими пучками накачки существует определенная проблема обеспечения большого спектрального диапазона перестройки длины волны генерации. Проблема состоит в том, что изменение длины волны, то есть изменение угла схождения двух пучков накачки в активной среде, достигается посредством изменения позиции, либо одновременно двух связанных зеркал (призм) [70], либо -одного перестроечного зеркала (призмы) [71]. При осуществлении перестройки частоты генерации, между пучками накачки в плоскости их пересечения на поверхности активной среды обычно возникает значительный пространственный сдвиг, что ведет к ухудшению видности, а при дальнейшем увеличении сдвига - и к полному распаду, наведенной в активной среде, динамической решетки. Возникновение большого по величине пространственного сдвига приводит к необходимости промежуточной подюстировки системы, что вносит очевидные неудобства при эксплуатации подобных схем в практике. Несколькими исследовательскими группами были предприняты попытки оптимизации традиционной схемы с РОС [72-76], здесь отметим работу [76], в которой был получен наибольший диапазон непрерывной перестройки который составлял  $\approx 350 \text{ \AA}$

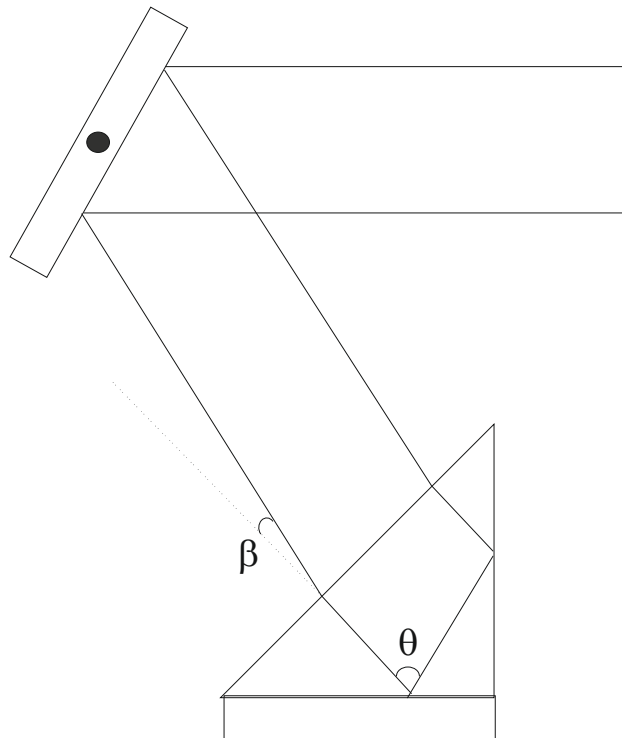


Рис.1.4. Схема РОС лазера

В указанной схеме РОС лазера, в качестве делителя пучка накачки была применена отражательная голографическая решетка где первые порядки дифракции используются для наведения РОС в активной среде.

Заметим, что для реализации пикосекундного режима работы РОС генератора требуется значительное уменьшение длины зоны возбуждения  $L$ , которая является фактором, определяющим длительность генерационного импульса  $\tau \leq Ln/c$ . Таким образом при пикосекундном режиме генерации данное обстоятельство ограничивает длину динамической решетки до значений  $L \approx 1-2$  мм, что делает схему с РОС весьма чувствительной к наличию пространственного сдвига между интерферирующими пучками накачки. Минимальный предел для уменьшения  $L$  задается минимальным значением оптического усиления в активной среде, которая необходима для осуществления лазерной генерации. При этом оптическое усиление задается выражением [77]:

$$\ln G = \sigma_{и} \int n(x)dx$$

где  $\sigma_{и}$  - эффективное сечение излучения красителя,  $n(x)$  - плотность населенности возбужденного состояния,  $G$  - максимальное усиление в РОС. Даже в случае когда наведенная в среде решетка имеет видность  $\approx 1$ , плотность населенности возбужденного состояния не может достигнуть значений общей плотности молекул без существенного искажения требуемого синусоидального распределения возбужденного состояния [78], что налагает следующее ограничение на накачку:

$$\sigma_{и} \varepsilon = 0.4$$

где  $\sigma_{и}$  - эффективное сечение поглощения красителя на длине волны накачки,  $\varepsilon$  - плотность энергии накачки в красителе. При таком ограничении на излучение накачки возбуждается только треть общей населенности  $N$ :

$$\int n(x)dx \approx LN/3.$$

Для случая активной среды – этанольного раствора красителя родамин 6ж (для экспериментальных условий  $N = 4 \times 10^{19}$  см<sup>-3</sup>,  $\sigma_{и} = 1.4 \times 10^{-16}$  см<sup>2</sup>,  $n = 1.36$ ) численные оценки показывают, что можно достичь длительности импульса генерации  $\tau \approx 350$  фс. В экспериментальной работе [79], по схеме РОС с пикосекундной накачкой было достигнуто значение длительности импульса генерации 320 фс.

Нами были проведены разработки новых схем РОС лазера [80-83], в которых реализуется значительное увеличение спектрального диапазона непрерывной перестройки. На рисунке 1.5. представлена одна из них [80]. Перестроенное зеркало 3 РОС лазера с помощью телескопического рычага связано с точкой 0 и при этом имеется возможность перемещения вдоль оптической оси пучка накачки, что обеспечивает синхронное вращение

перестроечного зеркала вокруг собственной оси и приводит к изменению угла падения пучков накачки на РОС кювету с призмным вводом излучения. Расчет такой схемы показывает что величина пространственного сдвига  $D$  пучка накачки от вершины вводной призмы определяется выражением:

$$D = \frac{\sqrt{2}\sqrt{n^2 - \sin^2 \alpha}}{\sqrt{n^2 - \sin^2 \alpha} \sin \alpha} \frac{H \sin \alpha}{\sqrt{n^2 - \sin^2 \alpha}} - \frac{L \sin(\theta - \alpha)}{2 \cos(\alpha/2) \sin(\theta/2 - \alpha/2)} - P \operatorname{tg} \alpha$$

Здесь  $n$  - показатель преломления материала призмы,  $\alpha$  - угол падения излучения накачки на призму,  $H$  - высота призмы; величины  $L$ ,  $P$  и  $\theta$  - параметры, задаваемые при  $\alpha = 0$ .

Зависимости  $D$  от  $\alpha$  при разных значениях параметров  $L$ ,  $P$ ,  $\theta$  приведены на рис.1.6. Как можно заметить из рисунка, для каждого фиксированного значения пары величин  $P$  и  $\theta$  можно подобрать соответствующее  $L$ , обеспечивающее наибольший диапазон перестройки. При этом уменьшение угла  $\theta$  и значений параметров  $L$ ,  $P$  приводит к достижению спектрального диапазона перестройки  $\approx 1500 \text{ \AA}^0$ , внутри которого величина пространственного сдвига  $D$  не превышает характерной допустимой величины 0.2 мм. Призма Дове с нанесенным на входной торец полупрозрачным зеркалом применена в качестве делителя излучения накачки. Использование такого делителя одновременно с РОС кюветой с призмным вводом излучения гарантирует необходимую пространственную и временную когерентность пучков накачки. Существенным фактором, влияющим на эффективность генерации и спектральные характеристики перестраиваемого излучения, является соотношение энергии лазерной генерации к энергии усиленного спонтанного излучения (УСИ). На рис.1.7 представлены энергии лазерной генерации и УСИ при реализации предложенной схемы при перестройке длины волны генерации. Как видно, уровень фонового УСИ оставался практически постоянным во всем широком диапазоне непрерывной перестройки, без характерного в ранее известных схемах с РОС резкого увеличения интенсивности УСИ вблизи спектральных пределов генерации активной среды, что свидетельствует о пренебрежительно малом значении пространственного сдвига. Отметим здесь что при проведении измерений в качестве активной среды, использовались этанольные растворы красителей родамин 6Ж и 6-аминофеноленол, перекрывающие спектральную область 560-650нм.



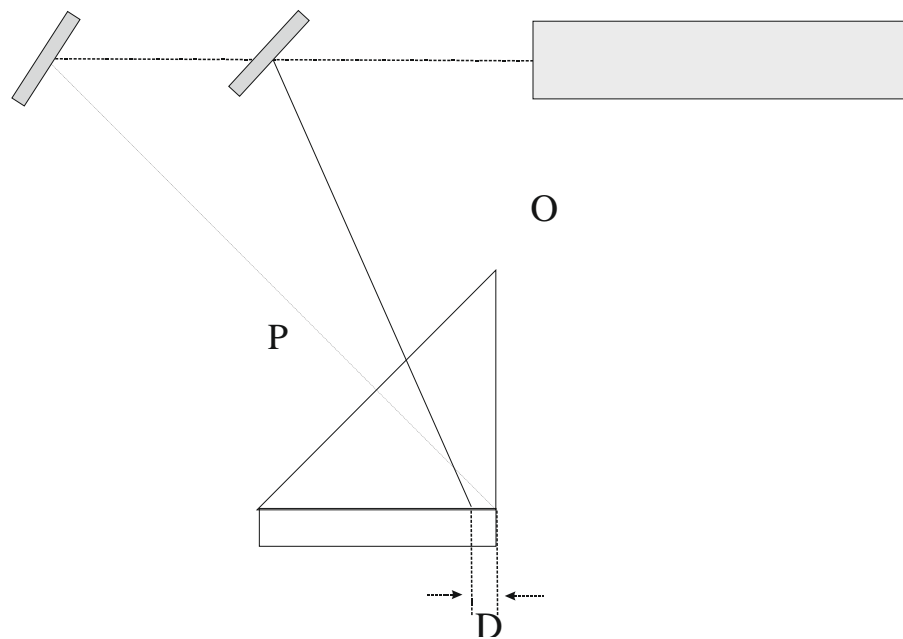


Рис. 1.5. Принципиальная схема РОС лазера с призмным вводом оптической накачки.

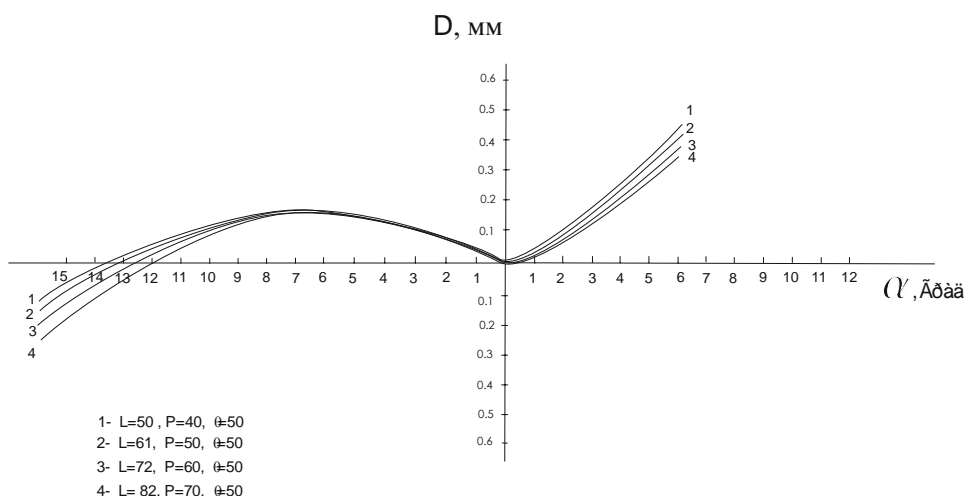
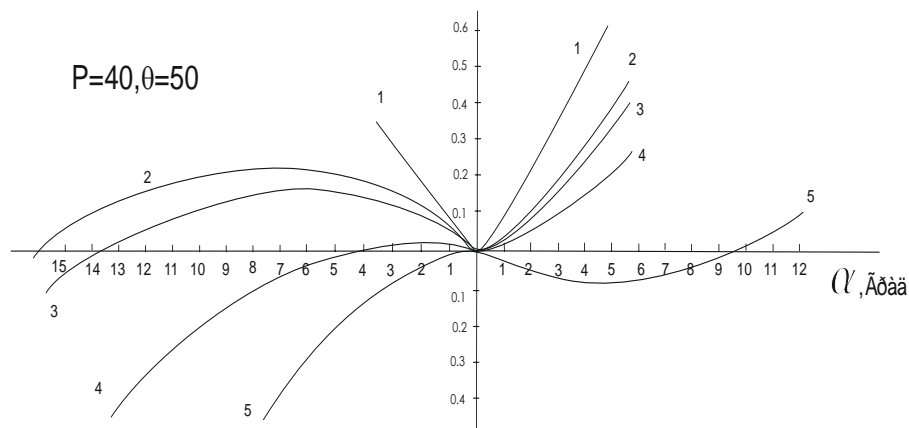


Рис.1.6. Расчетные кривые зависимости параметра  $D$  от изменения угла  $\alpha$ : а) при фиксировании параметров  $P=40\text{см}$  и  $\theta=50^0$  и значениях параметра  $L$ , равных:  $48\text{см}$  (кривая 1),  $49\text{см}$  (кривая 2),  $50\text{см}$  (кривая 3),  $51\text{см}$  (кривая 4) и  $52\text{см}$  (кривая 5), б) при фиксированном значении  $\theta=50^0$  и оптимальном подборе значений для пары  $L$  и  $P$ .

Генерационное излучение далее усиливалось в усилителе с квазипродольной накачкой и регистрировалось фотодиодами на выходе спектрографа ДФС-8-2.

На рисунках 1.8, 1.9 приведены также две схемы альтернативных разработок РОС лазеров с оптической накачкой [81,82] в которых осуществлена перестройка в широком спектральном диапазоне. В отличие от ранее известных схем, в обеих предложенных схемах удалось практически полностью устранить проблему возникновения пространственного сдвига в ходе осуществления перестройки частоты генерации. Отметим здесь, что в схеме рис.1.8 возможны режимы работы как при отсутствии, так и при наличии призмного ввода. Отметим что в схеме, приведенной на рис.1.9, наиболее легко реализуется режим одновременной генерации нескольких независимо перестраиваемых импульсов генерации при использовании нескольких делителей пучка накачки, расположенных на оси вращения диска. Малый по величине пространственный сдвиг (рис.1.10) между пучками накачки в плоскости их пересечения на поверхности активной среды возникает только при использовании призмного ввода излучения. Отметим, что угловой диапазон перестройки в данной схеме в два раза превышает наилучшие показатели схемы, приведенной на рис.5.

Ввиду данного преимущества в указанной схеме удалось получить перестраиваемую лазерную генерацию также в ближней ИК спектральной области 710-850нм, используя - наряду с традиционными - полиметиновые красители 4424У и 5166 У. Таким образом нами была реализована схема РОС лазера перестраиваемая в широкой спектральной области  $2900\text{Å}^0$ , расположенной в видимой –ближней ИК области спектра.

Для подбора оптимального режима работы РОС генератора, было проведено исследование влияния параметров накачки и концентрации красителя на генерационные характеристики излучения. Кривые представленные на рис.1.11с демонстрируют зависимость эффективности преобразования энергии накачки от концентрации, при близпороговом и превышающем порог генерации, режимах накачки. Отметим что близпороговому режиму работы соответствует резкая концентрационная зависимость эффективности преобразования, а в режиме значительно превышающем порог - слабая зависимость от дальнейшего после оптимального, увеличения концентрации красителя, что связано с глубоким насыщением поглощения. Помимо указанного, изменение концентрации красителя влияет также на спектральные характеристики генерации. На рис.1.11 а,б представлены перестроечные кривые при различных уровнях энергии накачки и различных концентрациях красителя.

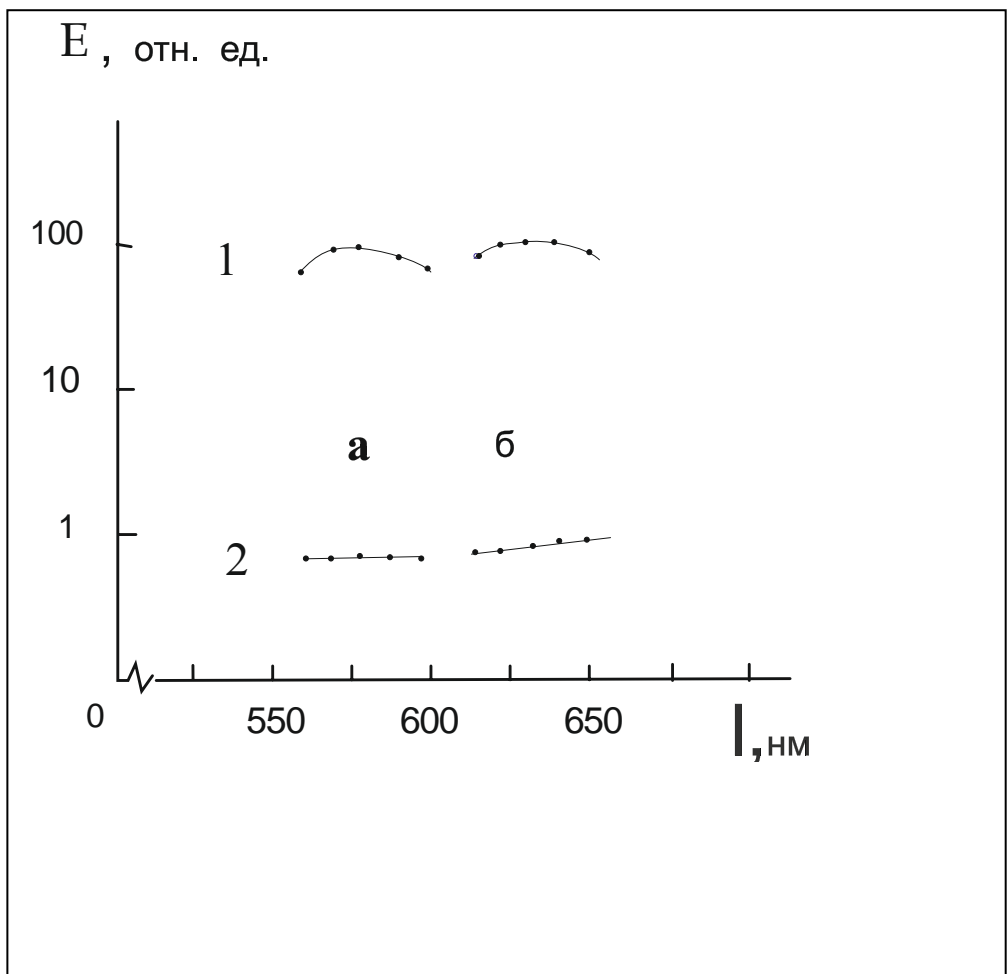


Рис.1.7. Зависимости энергии генерации (кривая 1), и УСИ (кривая 2) от длины волны для: а) этанольного раствора красителя родамин 6Ж и б) этанольного раствора красителя 6-аминофеноленол.

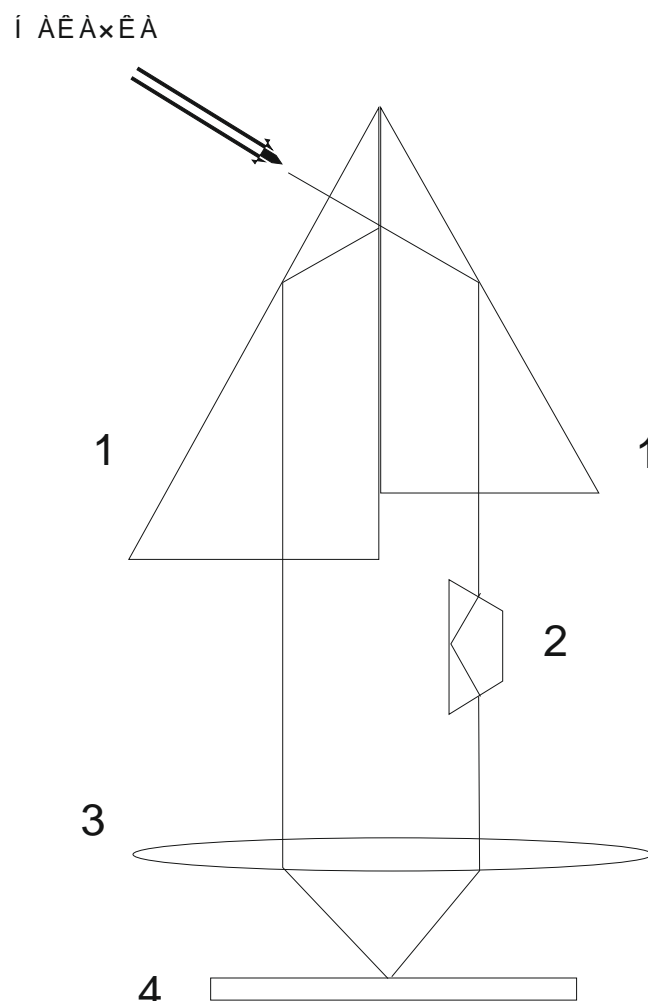


Рис.1.8. Схема РОС лазера с широкой спектральной областью перестройки. Здесь, 1- 90 градусные призмы, 2- призма Дове, 3- цилиндрическая линза, активная среда с наведенной РОС.

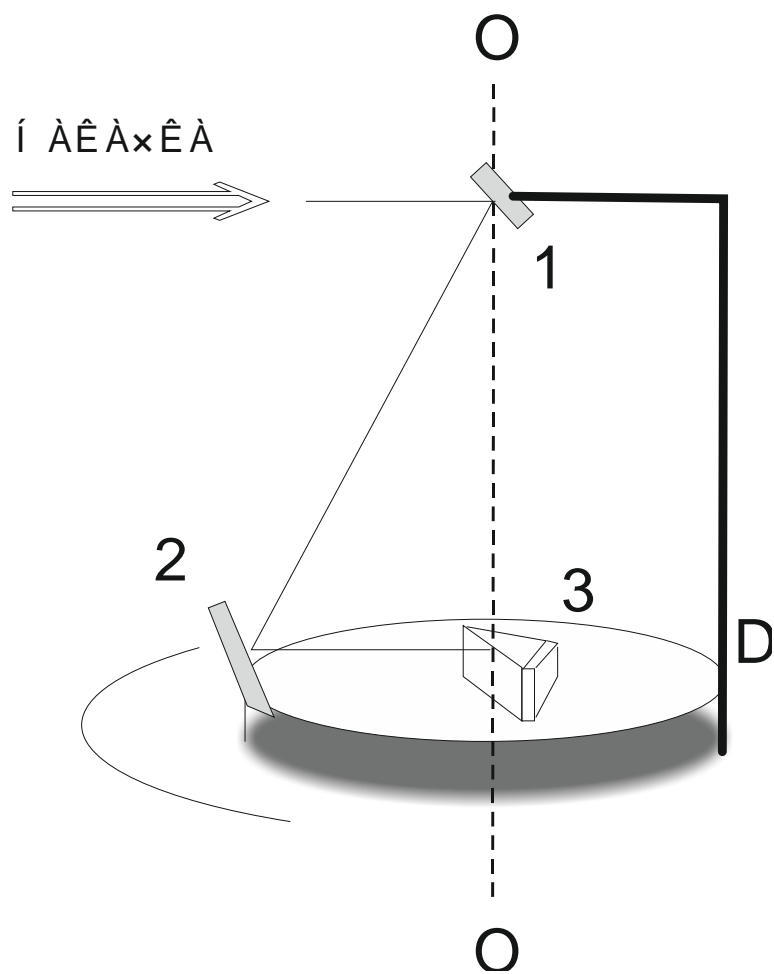


Рис.1.9. Схема РОС лазера с широкой спектральной областью перестройки. Здесь, 1 и 2 - зеркала синхронно вращающиеся вокруг оси OO диска D, 3 - РОС кювета с призмным вводом.

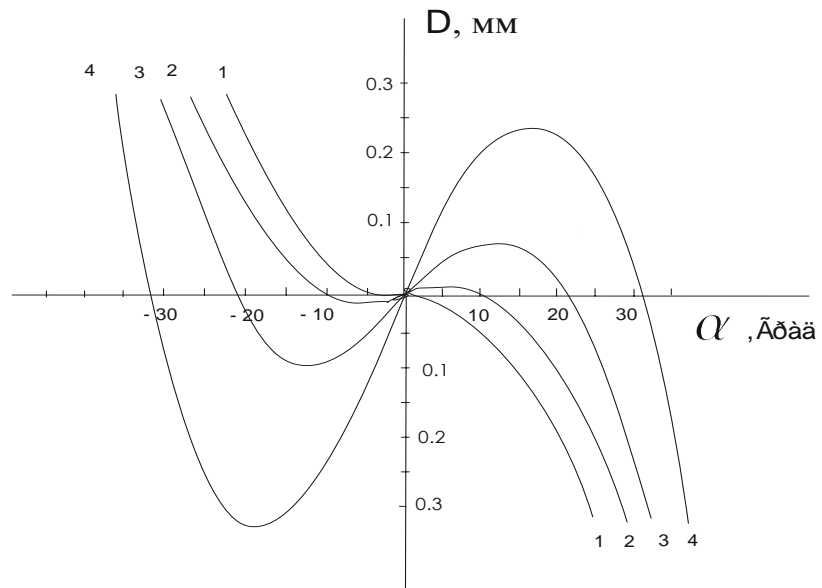
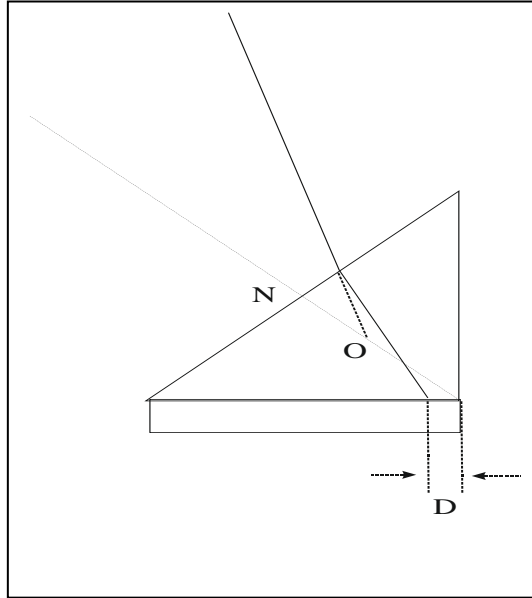


Рис.1.10. Расчетные кривые зависимости параметра  $D$  от изменения угла  $\alpha$  при значениях параметра  $ON = 8.4\text{мм}$  (кривая 1),  $8.0\text{мм}$  (кривая 2),  $7.6\text{мм}$  (кривая 3),  $7.2\text{мм}$  (кривая 4), полученные для призмы высотой  $14.18\text{мм}$  и с коэффициентом преломления  $n = 1.75$ .

Здесь, можно отметить что увеличение концентрации ведет к смещению всей спектральной области генерации в длиноволновую часть спектра, которое соответствует известному сдвигу полосы люминесценции органических красителей. Отметим также что при высоких концентрациях появляется заметная асимметрия формы перестроенной кривой и смещение спектрального максимума также в сторону длинных волн. Режим высоких уровней накачки приводят к ослаблению зависимости выходной энергии от изменения концентрации красителя и от перестройки длины волны. Отметим, что при уровне энергии накачки 1мДж генератор входит в режим насыщения. Изменение энергии накачки существенно влияет на величину флуктуаций энергии генерации. При значении концентрации красителя  $n = 1.1 \times 10^{-3}$  моль/л среднеквадратичное отклонение энергии генерации в центре спектральной полосы генерации для красителя родамин 6Ж ( $\lambda = 578\text{нм}$ ) с увеличением энергии накачки от 0.7 до 1.5 мДж уменьшается на 14%, а на краях полосы генерации - на 50%. В режиме высоких уровней энергии накачки, для достижения наибольшего к.п.д. преобразования и предотвращения фоторазрушения оптических элементов генератора обычно применяется схема генератор-усилитель. Так, для диапазона энергии накачки 25-45 мДж, нами выбрана трехкаскадная система усиления с квазипродольной схемой накачки. При этом выходная энергия лазера после трехкаскадного усиления при высоких значениях энергии накачки  $\approx 45\text{мДж}$  достигала порядка 7мДж на максимуме усиления родамина 6Ж, при спектральной ширине линии 1нм. В системе многокаскадного усиления, в усилителях обеспечивалось точное временное совпадение импульса накачки с генерационным излучением с целью предотвращения образования интенсивного УСИ.

В работе [73] была предложена теоретическая модель для анализа временного поведения лазерной генерации РОС на базе кинетических балансных уравнений для случая органического красителя, рассмотренной в качестве четырехуровневой активной среды:

$$\frac{dN}{dt} = I_p \sigma_p (N_0 - N) - \frac{\sigma_e}{n_p} c N Q - \frac{N}{\tau_c}$$

$$\frac{dQ}{dt} = \frac{(\sigma_e - \sigma_a)}{n_p} N Q - \frac{Q}{\tau_c} + \frac{\Omega N}{\tau_f}$$

$$\tau_c = \frac{n_p L^3 [N(\sigma_e - \sigma_a) V]^2}{8\pi^2 c}$$

$$P_d = \frac{hcQ}{2\lambda\tau_c} Lab$$



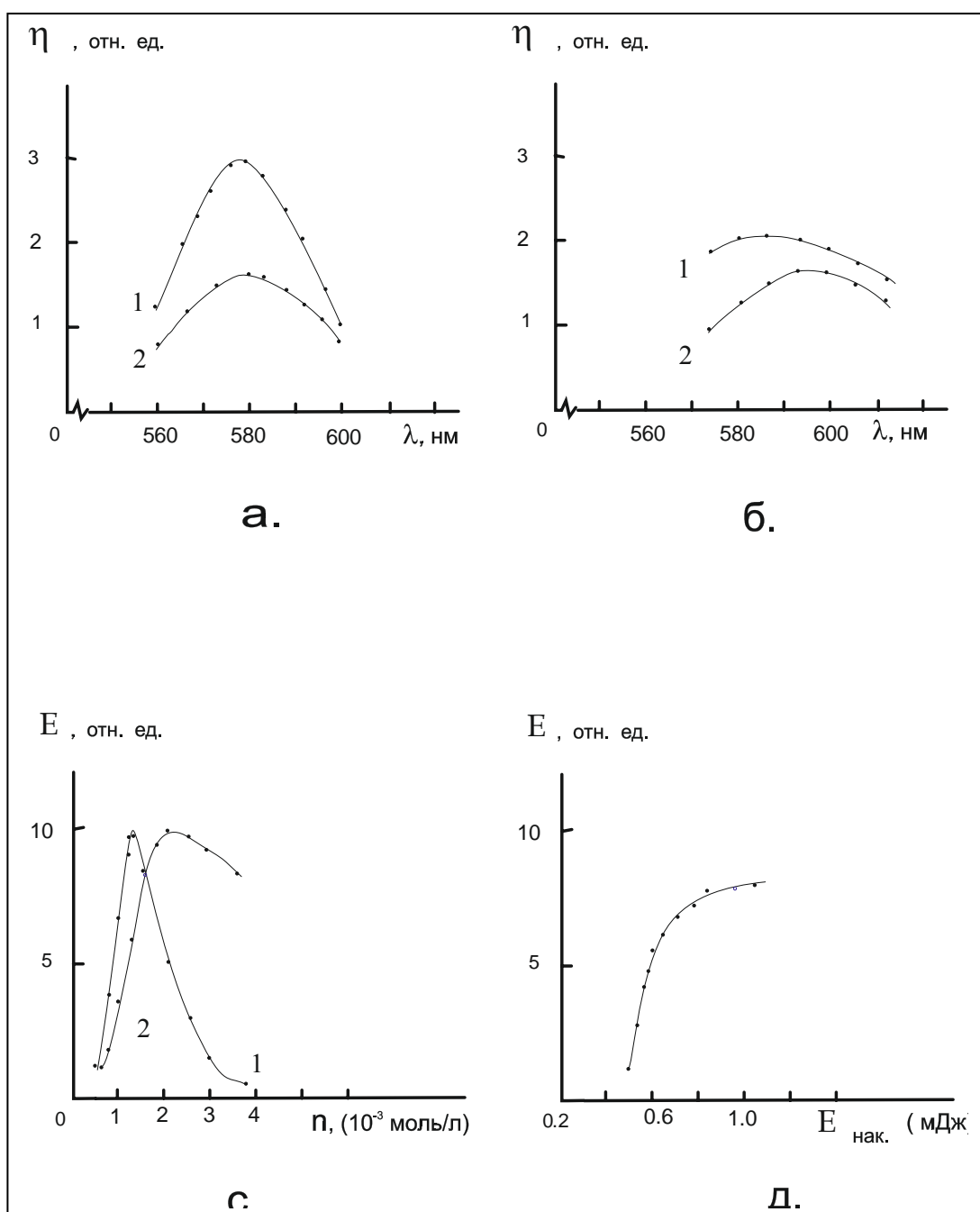


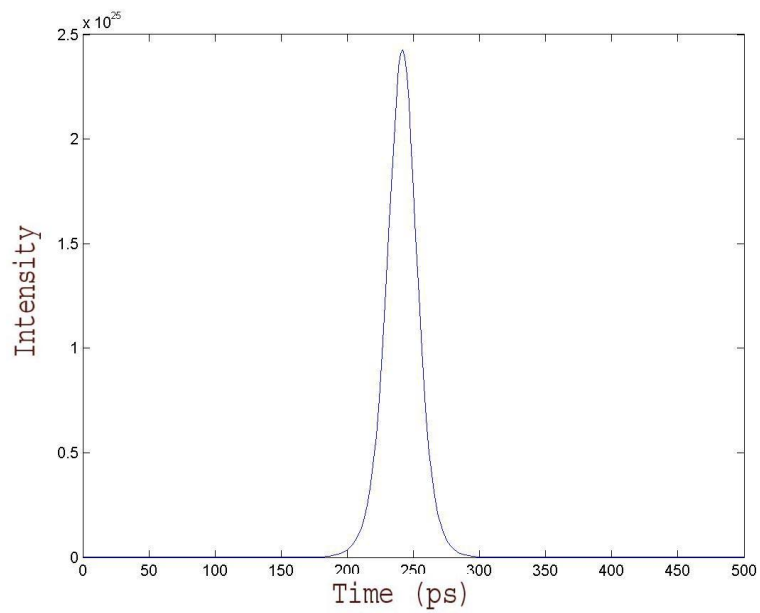
Рис.1.11. Зависимости а), б) -эффективности генерации при концентрации красителя родамин 6Ж соответственно  $1.1 \times 10^{-3}$  моль/л и  $2.2 \times 10^{-3}$  моль/л при энергии накачки  $E_{\text{н}}=1.5$ мДж (кривая1) и  $0.6$ мДж (кривая2), с) -энергии генерации от концентрации красителя при энергии накачки  $E_{\text{н}}=1.5$ мДж (кривая1) и  $0.6$ мДж (кривая2), д) -энергии генерации от энергии накачки при концентрации красителя  $2.2 \times 10^{-3}$  моль/л и ( $\lambda = 578$ нм).

В этих уравнениях  $N(t)$  - плотность молекул красителя в первом возбужденном синглетном состоянии,  $Q(t)$  - плотность фотонов лазерной генерации,  $\tau_c$  - среднее время жизни фотонов в резонаторе,  $P_d$  - выходная мощность РОС лазера,  $N_0$  - плотность молекул красителя,  $I_p$  - пространственно усредненный поток фотонов накачки на единицу площади,  $\sigma_p$  - сечение поглощения для длины волны накачки,  $\sigma_a$  - сечение поглощения для длины волны лазерного излучения для перехода с первого синглетного уровня на второй синглетный уровень,  $\sigma_e$  - сечение вынужденного излучения для длины волны лазерного излучения,  $\tau_f$  - время жизни флуоресценции первого возбужденного состояния,  $c$  - скорость света в вакууме,  $L$  - длина возбужденной области раствора красителя,  $a$  - глубина проникновения излучения накачки в слой раствора красителя,  $b$  - высота возбужденного объема,  $V$  - видность интерференционных полос,  $n_p$  - показатель преломления раствора красителя,  $\Omega$  - определяет долю спонтанного излучения, которая распространяется в угловом и спектральном сегментах соответствующих лучу лазерной генерации и  $h$  постоянная Планка. Временное поведение РОС лазера на красителе при наносекундной накачке ( $\Delta\tau = 8$ нс) азотным лазером и субнаносекундной накачке ( $\Delta\tau = 540$ пс) YAG:Nd лазером было детально проанализировано в работах [73,74]. Нами проанализирован случай пикосекундной накачки [83], соответствующий нашим экспериментальными условиями. Накачка представлена в виде импульса с временным гауссовским профилем и длительностью  $\Delta\tau = 30$ пс, длина РОС структуры составляет 1,6мм, энергия импульса накачки принята как 0.09 мкДж (вблизи порога генерации).

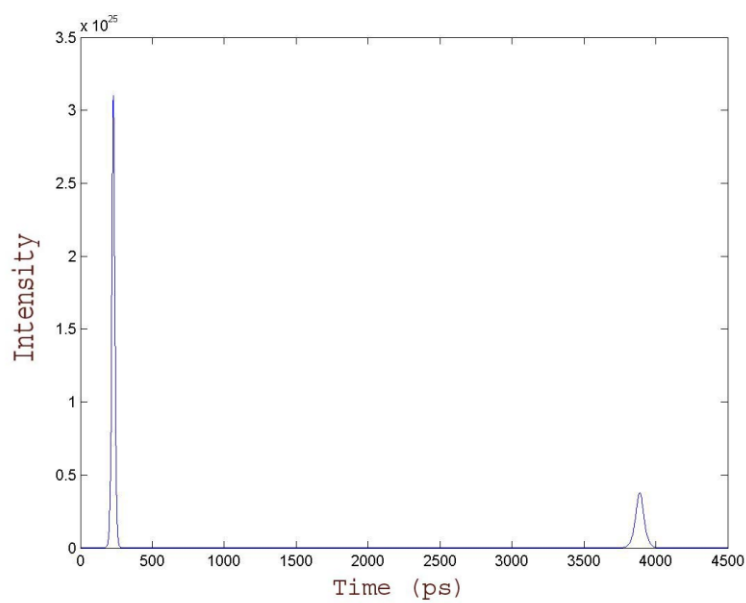
На рис.1.12а продемонстрирована генерация одиночного импульса с длительностью 25пс, который формируется через временной интервал порядка 250пс после импульса накачки с  $E_{\text{нак}} = 0.09$  мкДж. Аналогичная длительность лазерной генерация была получена в диапазоне длительности импульса накачки от 10 нс до 30пс.

При энергии накачки  $E_{\text{нак}} = 54$  мкДж моделирование задачи предсказывает образование двух лазерных импульсов рис.1.12б. Первый импульс с длительностью  $\Delta\tau = 23$ пс образуется через интервал 200-300пс после возбуждения. Наблюдается также второй импульс с длительностью  $\Delta\tau = 65$  пс, который образуется через 3750-4050пс после возбуждения.

На рис.1.13. приведены временные профили РОС лазера при дальнейшем увеличении энергии накачки вплоть до 108мкДж. Наблюдается генерация цуга лазерного излучения с увеличением числа генерируемых импульсов и сокращением длительности первых импульсов. В последнем рассмотренном случае рис.1.14. энергия накачки составляла

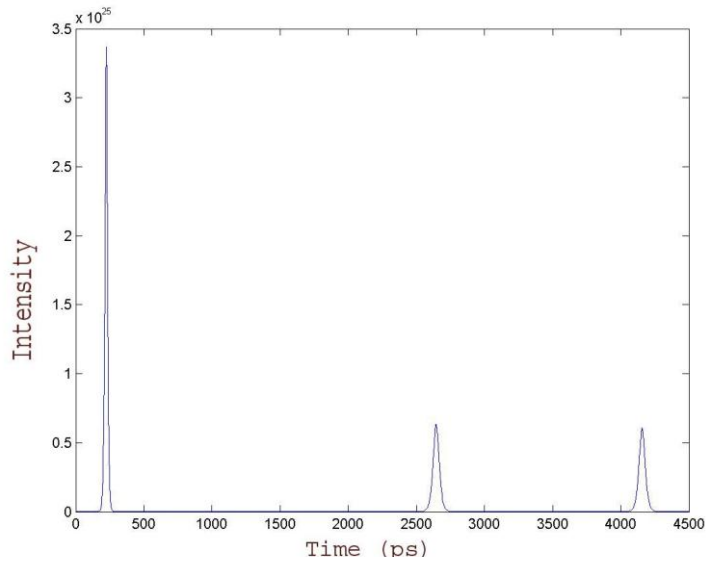


а



б

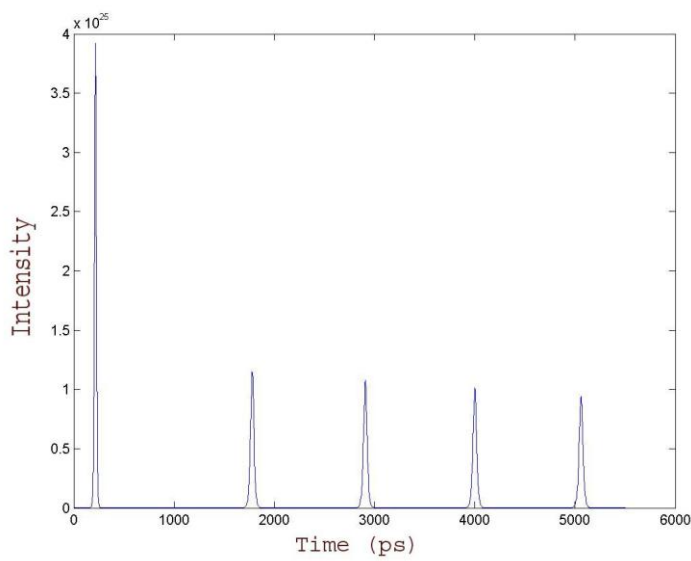
Рис.1.12. Временной профиль РОС лазера на красителе при :  
а)  $E_{\text{нак}} = 0,09$  мкДж и б)  $E_{\text{нак}} = 54$  мкДж.



**а.**  $E_{\text{нак}} = 72 \text{ мкДж}$ , генерируется

Зимпульса:

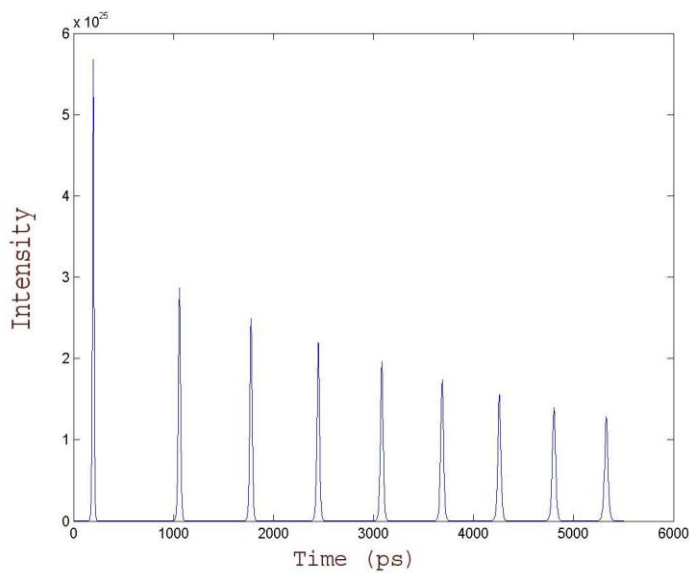
- 1-  $\Delta\tau = 22 \text{ пс}$ ,
- 2-  $\Delta\tau = 50 \text{ пс}$ ,
- 3-  $\Delta\tau = 52 \text{ пс}$ .



**б.**  $E_{\text{нак}} = 108 \text{ мкДж}$ , генерируется

5 импульсов:

- 1-  $\Delta\tau = 17 \text{ пс}$ ,
- 2-  $\Delta\tau = 40 \text{ пс}$ ,
- 3-  $\Delta\tau = 40 \text{ пс}$ .
- 4-  $\Delta\tau = 41 \text{ пс}$
- 5-  $\Delta\tau = 42 \text{ пс}$



**в.**  $E_{\text{нак}} = 225 \text{ мкДж}$ , генерируется

9 импульсов:

- 1-  $\Delta\tau = 17 \text{ пс}$ ,
- 2-  $\Delta\tau = 28 \text{ пс}$ ,
- 3-  $\Delta\tau = 28 \text{ пс}$ .
- 9-  $\Delta\tau = 70 \text{ пс}$

Рис.1.13. Временные профили РОС лазера на красителе при :

а)  $E_{\text{нак}} = 72 \text{ мкДж}$ , б)  $E_{\text{нак}} = 108 \text{ мкДж}$ , в)  $E_{\text{нак}} = 225 \text{ мкДж}$ .

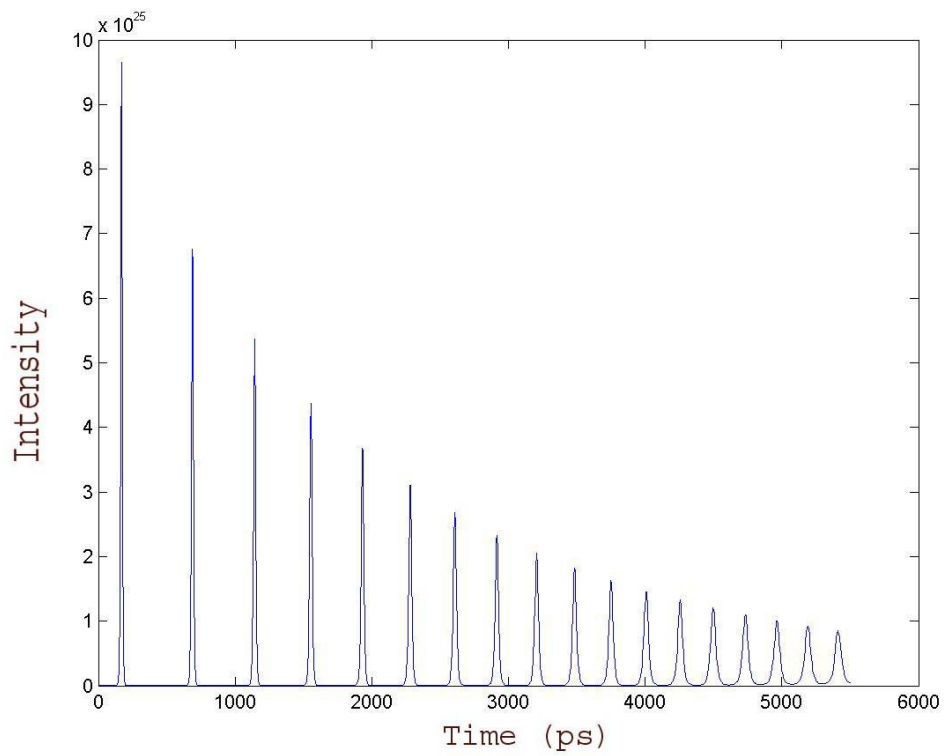


Рис.1.14. Временной профиль РОС лазера на красителе при  $E_{\text{нак}} = 495$  мкДж генерируются 18 импульсов. Продолжительность первого импульса  $\Delta\tau = 14$  пс, продолжительность последнего импульса  $\Delta\tau = 74$  пс

495мкДж; при этом наблюдается цуг из 18 импульсов, причем длительность первого лазерного импульса укорачивается до величины 14пс. Таким образом показано, что лазерная генерация широко перестраиваемых импульсов в видимом инфракрасном спектральном диапазоне и с высокой контрастностью энергии генерации к уровню УСИ может быть реализована для пикосекундного лазера на красителе с распределенной обратной связью. Аналитическое исследование временных свойств РОС лазера на красителе от энергии пикосекундной накачки демонстрирует одноимпульсный и многоимпульсный режимы генерации. Продемонстрировано увеличение числа генерируемых импульсов и сокращение длительности первых генерируемых импульсов с увеличением энергии накачки.

#### §1.4. Наносекундный перестраиваемый лазер на красителе

В перестраиваемых лазерах на красителе с наносекундной длительностью импульса генерации, как правило, реализуют резонаторы, в которых используются внутрирезонаторные дисперсионные оптические элементы, такие как дифракционные решетки, интерферометры Фабри-Перо, призмы, двулучепреломляющие пластины.

Использование дифракционных решеток и призм позволяет получить перестраиваемую генерацию в широком спектральном диапазоне. Мы реализовали схему (рис.1.15) 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 указанном режиме угол падения равен углу дифракции  $\alpha$  и блеска  $\varphi$  и условие дифракционного максимума для угла  $\alpha$  следующее:

$$2d \sin \alpha = m \lambda,$$

где  $d$  - постоянная решетки,  $m$  - порядок дифракции.

Отсюда, для дифференциальных приращений  $\delta\alpha$  и  $\delta\lambda$  имеем:

$$\delta\lambda = 2d \cos \alpha \cdot \delta\alpha / m.$$

Если лазерное излучение имеет расходимость, близкую дифракционному пределу, то

$$\delta\lambda = (2.44 \cdot \lambda d \cos \alpha) / mD,$$

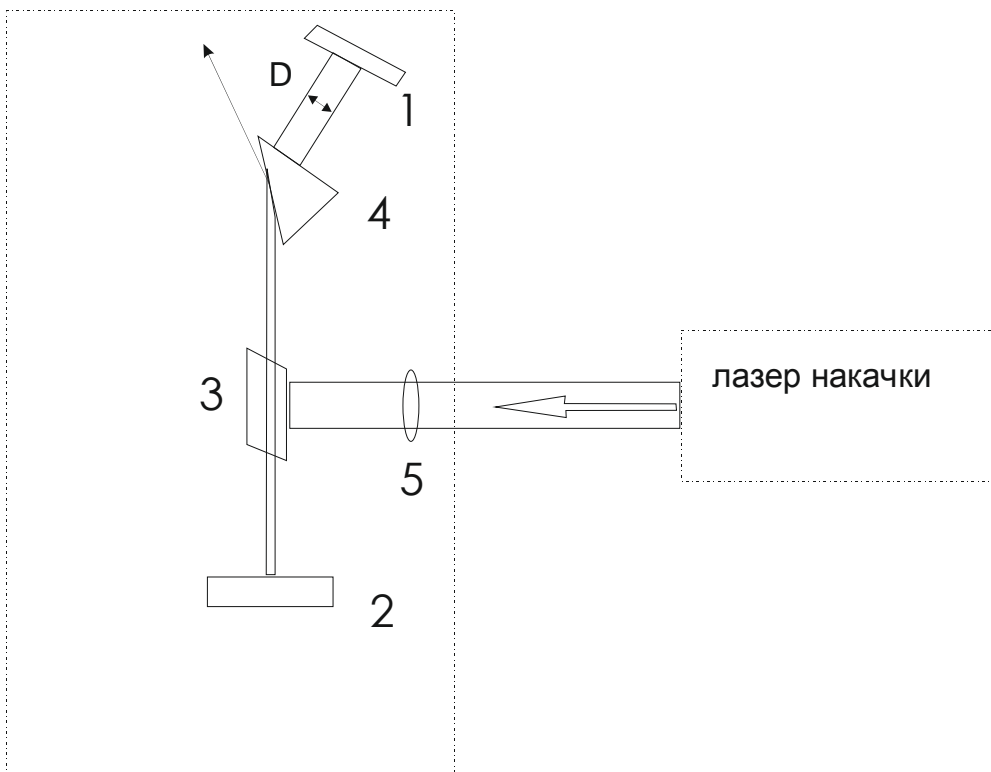


Рис.1.15. Схема наносекундного перестраиваемого лазера на красителе.  
 1,2 - глухие зеркала, 3- кювета с раствором красителя, 4-призма,  
 5- цилиндрическая фокусирующая линза.

где  $D$  - апертура падающего на решетку светового луча.

Таким образом, в описанной схеме использование внутри резонатора расширителя оптического пучка приводит к уменьшению ширины линии лазерной генерации за счет увеличения апертуры и уменьшения расходимости падающего на решетку пучка. При этом, одновременно уменьшается плотность светового поля на металлизированной поверхности дифракционной решетки, что приводит к снижению вероятности ее фоторазрушения. Отметим здесь что в качестве внутрирезонаторного расширителя наиболее удобно использование призмного расширителя, который в отличие от линзового компактен и не имеет паразитных отражений вдоль оптической оси резонатора, а также расширяет лазерный пучок только в одной плоскости, то значительно упрощается процесс юстировки резонатора.

### **§1.5. Применение перестраиваемых лазеров на красителе в задаче исследования временной релаксации заселенности резонансных уровней в парах натрия**

Измерение времени жизни возбужденных состояний атомов и молекул имеет важное значение для интерпретации разнообразных эффектов, возникающих при взаимодействии излучения с резонансной средой. В случае малых плотностей среды среднее время жизни возбужденного состояния достаточно точно определяется вероятностью спонтанного распада для отдельного атома или молекулы. С увеличением плотности, а также размеров среды необходимо учитывать также коллективные эффекты взаимодействия атомов. В относительно оптически плотных средах значительно возрастает вероятность поглощения невозбужденным атомом фотона, испущенного возбужденным атомом. Многократные акты испускания и поглощения, которые происходят за время нахождения фотона в среде, ведут к пленению излучения, таким образом происходит увеличение среднего времени жизни возбужденного состояния. Когда характерные размеры среды значительно превышают длину свободного пробега фотона в центре спектральной линии, основные эффекты пленения излучения удастся описать с помощью приближенной теории. Эта теория позволяет определить пространственную заселенность резонансного уровня атома с координатой  $x$  в момент времени  $t$  из кинетического уравнения Бибермана - Голстейна [84].



$$dn(x,t)/dt = -(A_0 + A_1 + W)n(x,t) + \alpha(x,t) + \int K(x,\xi)n(\xi,t)d\xi, \quad (1.1)$$

где  $A_0$  - вероятность перехода с резонансного уровня в основное состояние,  $A_0 + A_1$  - величина, обратная радиационному времени жизни резонансного уровня,  $W$  - полная вероятность тушения,  $\alpha(x,t)$  - пространственная плотность возбуждения в точке  $x$ ,  $K(x, \xi)$  - вероятность фотону, испущенному в элементе объема  $d\xi$ , поглотиться в точке  $x$ . Вид ядра  $K(x, \xi)$  определяется концентрацией нормальных атомов и видом контура спектральной линии.

Известны решения этого уравнения, полученные для геометрии с неограниченным измерением (слой между двумя бесконечными плоскостями, бесконечный цилиндр), в случае шара ограниченного радиуса  $a$  также для цилиндра конечных размеров. В работе [85] показано, что длину цилиндра можно полагать равной бесконечности, если ее величина превосходит более чем в три раза величину радиуса. В данной работе также, выяснены условия, при которых временное поведение интенсивности регистрируемого излучения описывается одноэкспоненциальным членом.

Описанное явление пленения излучения может существенно проявляться в ряде физических эффектов [86]. Например, в экспериментах по исследованию диффузии резонансного излучения в слабом магнитном поле наблюдается сужение резонансной линии при увеличении плотности среды [87]. Пленение излучения может привести к значительным изменениям в соотношении компонент резонансных спектральных линий газового разряда [88] и может влиять на характеристики газовых лазеров [89]. В результате процессов перепоглощения фотонов радиальное распределение яркости линии резонансного излучения может оказаться значительно уширенным по сравнению с другими линиями [90].

Для определения эффективного времени жизни возбужденных состояний атомов широко применяются методы резонансной флуоресценции и абсорбции. Например в работе [91] методом резонансной флуоресценции в диапазоне температур 320-355<sup>0</sup>С было зарегистрировано уменьшение эффективных времен жизни при увеличении температуры насыщенных паров Na. Уменьшение эффективного времени жизни наблюдалось еще Зеemanским в 1927 году, для случая резонансного излучения ртути. Этот факт насколько нам известно, подтверждался лишь в упомянутой работе [91], для случая атомного резонанса, что по всей видимости связано с малой чувствительностью традиционных методов и техническими трудностями проведения эксперимента. Отметим что, измерения эффективного времени жизни возможно провести методами поляризационной

спектроскопии, которые на несколько порядков чувствительнее [92] обычных методов спектроскопии.

При прохождении эллиптически поляризованного излучения через двухуровневую резонансную среду происходит самовращение эллипса поляризации. Угол поворота  $\alpha$  зависит от моментов количества движения  $J_1$  и  $J_2$  [93]. В случае  $J_1=1/2, J_2=3/2$

$$\alpha = q z [ (1 + \xi + 3 \xi^+)^{-1/2} - (1 + 3 \xi + \xi^+)^{-1/2} ] \quad (1.2)$$

здесь  $\xi^\pm$  - параметры интенсивности, определяемые выражением:

$$\xi^\pm = \tau \frac{|d_{21}|^2}{6h^2 \varepsilon^2} |E^\pm|^2$$

где  $E^\pm = E_x \pm iE_y$  - сферические компоненты амплитуды падающего поля,  $\varepsilon = \omega_0 - \omega$  - расстройка резонанса ( $\omega_0$  - частота перехода,  $\omega$  - несущая частота поля),  $d_{21}$  - приведенный матричный элемент перехода между уровнями 2 и 1,  $z$  - длина резонансной среды, величина  $q$  в формуле (1.2) равна :

$$q = \pi \frac{|d_{21}|^2 \omega_0}{12ch\varepsilon} N \quad (1.3)$$

где  $N$  - разность плотностей атомов в нижнем и верхнем состояниях до взаимодействия с излучением.

Аналитические выражения для показателей преломления лево -и право-циркулярно поляризованной волны имеют вид:

$$\mathbf{n}^{(+)} = 1 + \frac{qc}{\omega} \left[ \frac{3}{\sqrt{1 + \xi^+}} + \frac{1}{\sqrt{1 + \xi^-}} \right] \quad (1.4)$$

$$\mathbf{n}^{(-)} = 1 + \frac{qc}{\omega} \left[ \frac{1}{\sqrt{1 + \xi^+}} + \frac{1}{\sqrt{1 + \xi^-}} \right]$$

Как можно заметить лево- и право-циркулярно поляризованные волны по разному зависят от параметров интенсивности, что приводит к тому, что эллиптически поляризованное излучение в ходе прохождения через описанную двухуровневую среду изменяет эллипс поляризации.

При  $\xi^\pm \ll 1$  формула (1.2) принимает вид:

$$\alpha = q z \xi \eta_2 \quad (1.5)$$

где обозначено  $\xi = \xi^- + \xi^+$ ,  $\eta_2$  - параметр Стокса, определяющий степень круговой поляризации.

В случае когда заселенность верхнего уровня незначительна, изменение величины угла поворота при фиксированных значениях интенсивности проходящего излучения и расстройки резонанса будет полностью определяться изменением населенности только нижнего уровня. Таким образом, исследуя самовращение в двухуровневой среде, где нижний уровень в свою очередь является возбужденным, мы имеем возможность по временной зависимости угла поворота определять закон изменения во времени населенности этого уровня. Отметим, что аналитические выражения (2), (5) для величины угла поворота получены для случая равнозаселенности магнитных подуровней уровня 1 (рис.1.16). Ввиду этого, заселение возбужденного уровня 1 с основного уровня должно проводиться лазерной накачкой с линейной поляризацией.

Экспериментальное исследование девозбуждения 3P уровней натрия проводилось на установке, схема которой приведена на рис.1.17 [94, 95]. Здесь в качестве источника возбуждающего излучения использовался лазер на красителе 1, длина волны которого перестраивалась вблизи резонансных переходов  $3S_{1/2} \rightarrow 3P_{1/2, 3/2}$ , а в качестве пробного излучения - лазер на красителе 2, длина волны которого перестраивалась вблизи резонансных переходов  $3P_{1/2} \rightarrow 4D_{3/2,5/2}$ ,  $3P_{3/2} \rightarrow 4D_{3/2,5/2}$  паров натрия. Длительность импульсов лазеров на красителе составляла 15нс, расходимость лучей 2мрад. Кварцевая кювета с металлическим натрием (диаметр кюветы 24мм, длина =200мм) помещалась в термонагреватель, температура которого варьировалась в пределах от  $300^0$  С до  $340^0$  С.

Лазерный пучок 1 после однокаскадного усиления, проходя через призму Глана, приобретает линейную поляризацию и линзой фокусируется в кювету с парами натрия. Одновременно через среду проходит сфокусированное линзой эллиптически поляризованное излучение с параметром Стокса  $\approx 2 \cdot 10^{-2}$  в направлении навстречу интенсивному импульсу. Эллиптичность пучка достигалась после прохождения излучения лазера 2 через призму Глана невысокого качества. После выхода из среды излучение проходит через анализатор, который скрещен с поляризатором. Фотоприемники служат для регистрации интенсивностей

накачки, перпендикулярной  $I_y$  и параллельной  $I_x$  компонент поляризации пробного излучения соответственно. Угол поворота определялся как  $\arcsin \sqrt{I_y / I_x}$ . Для избежания влияния изменения интенсивности накачки на измеряемую величину угла поворота, измерения проводились в режиме насыщения по интенсивности накачки.

На рис.1.18 приведена зависимость резонансного самовращения эллипса поляризации (переход  $3P_{3/2} \rightarrow 4D_{3/2,5/2}$ ) от времени задержки  $\tau$ , при различных температурах насыщенных паров атомарного натрия. Как видно из приведенных графиков, наблюдается экспоненциальный спад населенности  $3P_{3/2}$  уровня при увеличении временной задержки  $\tau \approx \exp(-\tau / \tau^*)$ .

Эффективное время спада  $\tau^*$  с ростом температуры, а следовательно и плотности среды уменьшается и принимает значения:

$$\tau^* = 1650 \pm 180 \text{ нс} \quad \text{при} \quad N = 2.32 \cdot 10^{14} \text{ см}^{-3} \quad (300^\circ \text{ C})$$

$$\tau^* = 1280 \pm 150 \text{ нс} \quad \text{при} \quad N = 4.66 \cdot 10^{14} \text{ см}^{-3} \quad (320^\circ \text{ C})$$

$$\tau^* = 900 \pm 60 \text{ нс} \quad \text{при} \quad N = 1.0 \cdot 10^{15} \text{ см}^{-3} \quad (340^\circ \text{ C})$$

Такое же временное поведение наблюдалось и для уровня  $3P_{1/2}$ . Таким образом, экспериментально показано, что эффективное время жизни уровней  $3P_{1/2, 3/2}$  натрия в интервале плотностей среды  $2.32 \cdot 10^{14} \text{ см}^{-3} - 1.0 \cdot 10^{15} \text{ см}^{-3}$  намного превышает спонтанное время распада  $\tau = 1 \text{ нс}$ , что обусловлено эффектом пленения резонансного излучения. Зарегистрированное в исследуемой области температур уменьшение значения  $\tau^*$  при увеличении плотности среды связано с ростом вероятности столкновений, в которых участвует возбужденный атом, что при достаточной интенсивности столкновительных процессов, ведет к укорочению эффективных времен жизни.

Рассмотрим изменение во времени населенности возбужденных  $3P$  уровней после прохождения через среду парообразного Na с цилиндрической геометрией, в режиме диффузии излучения. Для случая короткого возбуждающего импульса, основным источником заселения  $3P$  уровня является само резонансное лазерное излучение, временная эволюция плотности атомов  $N_{3P}(\tau)$  определяется выражением:

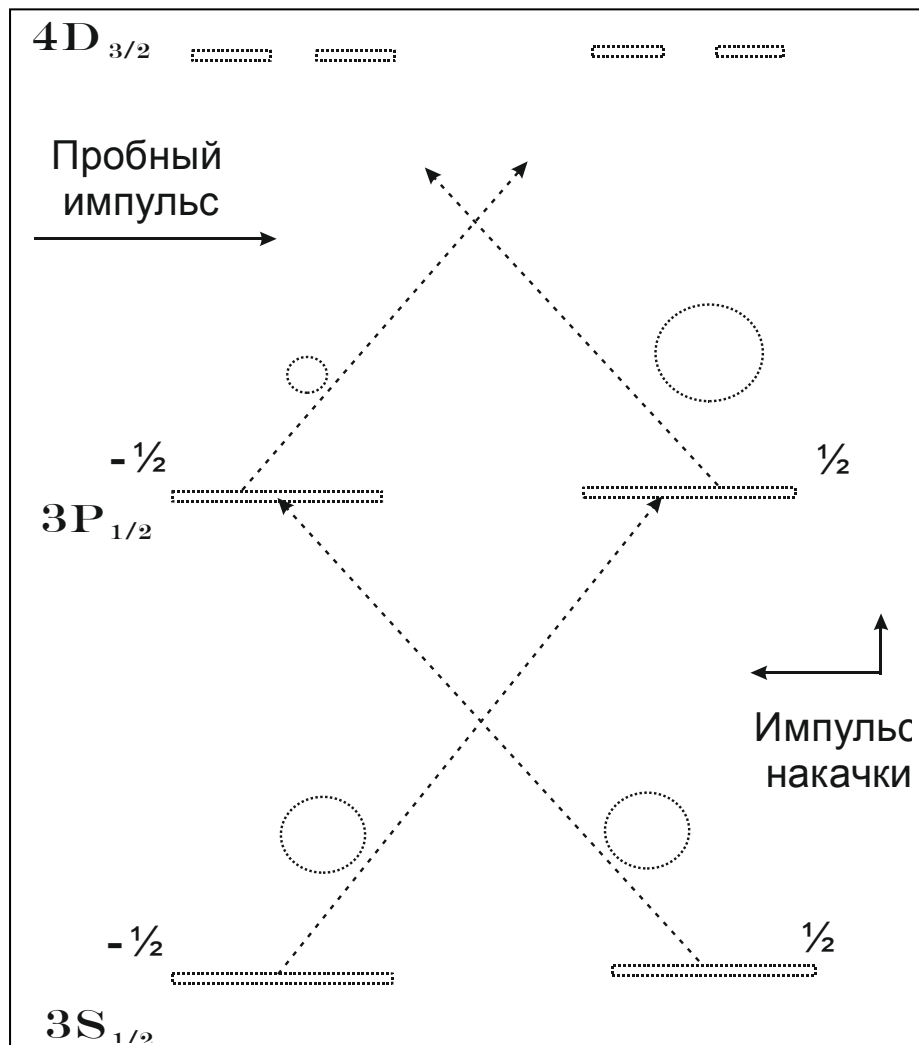


Рис.1.16. Схема магнитных подуровней атома натрия в поле интенсивной линейно поляризованной волны накачки и пробной эллиптически поляризованной волны.

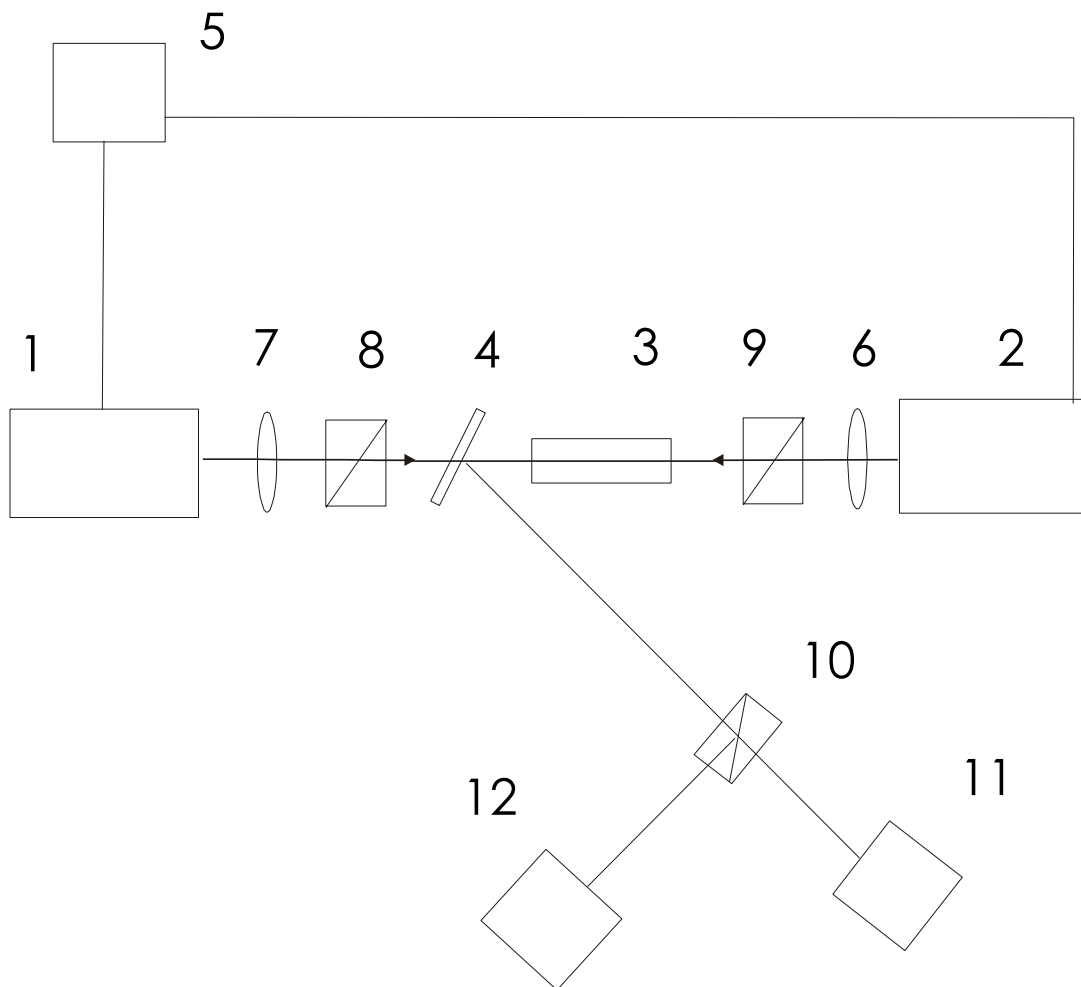


Рис. 1.17. Схема экспериментальной установки:  
 1,2- лазеры на красителе, 3 - кювета с парами натрия,  
 4- зеркало, 5- блок задержки и синхронизации,  
 6,7 - сферические линзы, 8-10 -призмы Глана,  
 11,12- фотоприемники.

$$N_{3P}(\tau) = N_{3P}(0) \exp(-\tau/\tau_0). \quad (1.6)$$

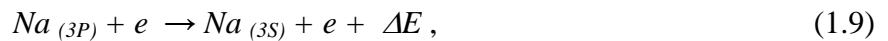
Здесь начальным моментом времени  $\tau = 0$  отмечено положение лазерного пика, через  $\tau_0$  обозначено время пленения излучения, которое много больше естественного времени жизни. В случае дисперсионного контура линии атомного поглощения и без учета полного тушения,  $\tau_0$  определяется выражением:

$$\tau_0 = \sqrt{\pi K_0 R} / 1.114 A_0 \quad (1.7)$$

где  $K_0$  - коэффициент поглощения в центре линии,  $R$  - радиус цилиндра. В случае же доплеровского контура, являющегося доминирующим при высоких температурах среды,  $\tau_0$  определяется выражением:

$$\tau_0 = 1.16 K_0 R \sqrt{\ln K_0 R / 114 A_0} \quad (1.8)$$

Для достаточно высоких плотностей ( $\tau_0 \gg A^{-1}$ ), в промежутке времени девозбуждения, в среде начинают происходить столкновительные процессы, например типа:



где  $\Delta E$ - изменение кинетической энергии системы атом + электрон. В этом случае первичные электроны образуются главным образом вследствие пенинговской и ассоциативной ионизации вызванных лазерным излучением. Отметим что учет тушения  $3P$  уровня столкновениями, очевидно, должен привести к укорочению эффективного времени жизни, то есть к уменьшению вычисленных по формулам значений  $\tau_0$ . Имея ввиду столкновительные процессы типа (1.9), изменение во времени числа возбужденных атомов можно описать упрощенным уравнением:

$$d N_{3P} / dt = - N_{3P} (\tau_0) - N_{3P} N_e \alpha, \quad (1.10)$$

где  $N_e$  - плотность электронов,  $\alpha$ - скоростной коэффициент для девозбуждающих процессов типа (1.9). Решение уравнения имеет вид :

$$N_{3P} = N_{3P}(0) \exp(-\tau/\tau^*).$$

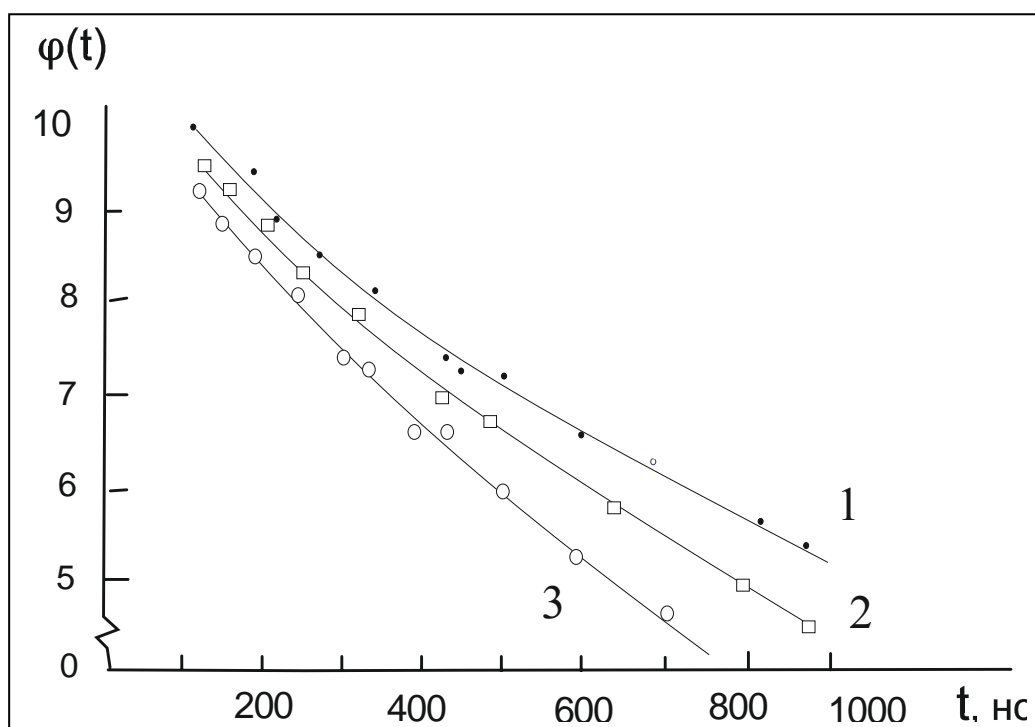


Рис.1.18. Зависимость относительного угла поворота самовращения эллипса поляризации от времени задержки при температуре среды  $T=300^{\circ}\text{C}$  (кривая 1),  $T=320^{\circ}\text{C}$  ( кривая 2),  $T=340^{\circ}\text{C}$  ( кривая 3).



где  $\tau^*$  эффективное время жизни  $3P$  состояния

$$\tau^* = \tau_0 / (1 + N_e \alpha \tau_0) \quad (1.11)$$

Из (1.11) видно, что если  $N_e \alpha$  - монотонно возрастающая функция от плотности среды  $N$ , что и наблюдалось в эксперименте, то учитывая линейную зависимость коэффициента поглощения от  $N$ , при некотором значении  $N = N_0$ ,  $\tau_0$  достигает максимума и, в дальнейшем, с увеличением  $N$  уменьшается.

Резюмируя отметим что анализ влияния даже таких простых столкновительных процессов, как (1.9), приводит к тому, что в определенном диапазоне плотностей среды,  $\tau^*$  является убывающей функцией  $N$ .

## **Выводы главы 1.**

Реализован и экспериментально исследован пикосекундный режим генерации лазера на красителе с РОС: на основе исследования спектральных, энергетических и временных параметров излучения выявлены характерные особенности процесса. Разработаны и апробированы новые схемы лазера на красителе с РОС, обеспечивающие перестройку пикофемто-секундного излучения в широкой спектральной области, которые подтверждены авторскими свидетельствами на изобретение. Также сконструированы наносекундный перестраиваемый лазер на красителе и многочастотный твердотельный YAG:Nd<sup>3+</sup> лазер. Совокупность различных лазерных источников предназначена для создания на их базе экспериментальных установок с широким спектром исследовательских возможностей.

С применением перестраиваемых лазеров на красителе исследован процесс девозбуждения электронного состояния в плотных парах атомарного натрия методом самоиндуцированного вращения плоскости поляризации. Измерены эффективные времена жизни возбужденных  $3P_{1/2}$ ,  $3P_{3/2}$  состояний натрия. Установлено укорочение эффективных времен указанных состояний от 1650 до 900 наносекунд в температурном интервале 300-340<sup>0</sup>С.

## ГЛАВА 2

### ЛАЗЕРНЫЙ СИНТЕЗ НАНОЧАСТИЦ, ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА И ВОЗМОЖНЫЕ ПРИМЕНЕНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ

Нанотехнология является одним из приоритетных направлений развития современной техники в тесной связи с наукой. Нанотехнологии имеют своим фундаментом выявленные физические, химические и биологические свойства наноразмерных частиц различных материалов, а также гомогенных и гибридных по составу наноструктур. Безусловно первоочередной задачей здесь является установление фундаментальных закономерностей объектов с размерами 1-100нм. Уже первые исследования показали, что свойства наноразмерных материалов кардинально отличаются от массивных материалов размерами от микронных и выше. Когда размеры частиц сравнимы с длиной когерентности электронной волновой функции, то их электронные свойства становятся сильно зависимыми от размеров, что является проявлением так называемого квантово-размерного эффекта, который соответственно наблюдается в объектах, имеющих наноразмеры в одном, двух и трех измерениях. Движение электрона в таких объектах ограничено размерами и, как следствие его квантовых свойств, его энергия может принимать только определенные дискретные значения. Здесь важной характеристикой влияющей на электронные и оптические свойства является плотность состояний. Рис 2.1. схематически иллюстрирует зависимость плотности состояний наноразмерного объекта с различным числом измерений, по которым могут двигаться электроны. Эффекты размерного квантования впервые были обнаружены в сверхтонких пленках InSb и висмута, представляющих собой 2Д структуру [96]. Для создания квантовых ям широко распространена методика, в которой тонкий слой одного полупроводникового материала с узкой запрещенной зоной размещается между слоями другого полупроводника с широкой запрещенной зоной. Для формирования квантовых нитей и квантовых точек необходимо ограничивать движение электронов в двух или трех измерениях. В настоящее время нашли широкое распространение и уже коммерциализированы методы химического синтеза полупроводниковых квантовых точек и наночастиц различных материалов. Химический синтез позволяет получить интересную разновидность наночастиц – коллоидную взвесь наночастиц в различных жидкостях. Однако отметим, что в жидких растворах наночастицы могут взаимодействовать между собой и достаточно быстро создавать массивные структуры микронных размеров, которые уже не обладают наноразмерными свойствами.

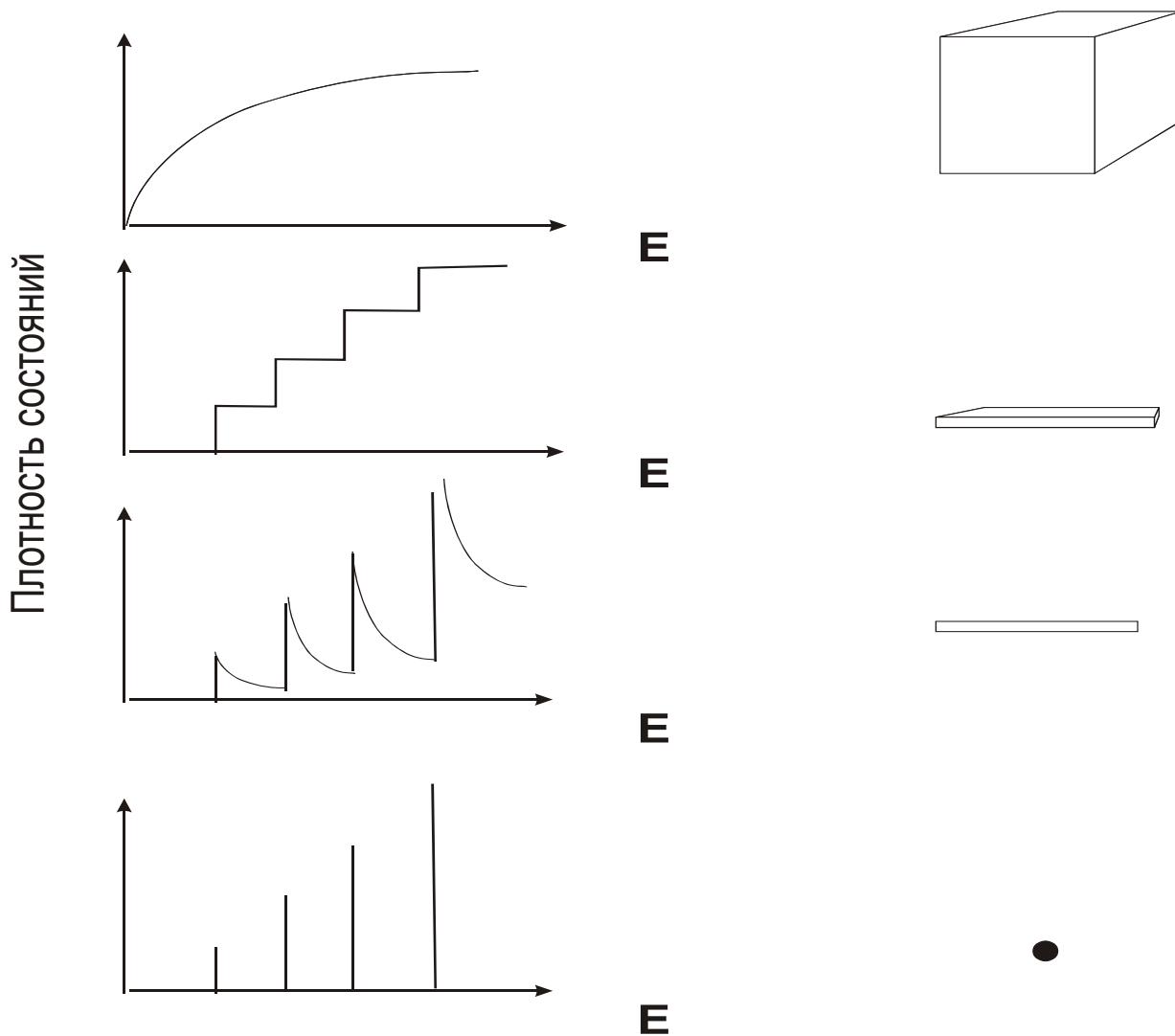


Рис 2.1. Схематическое представление плотности состояний для случаев 3Д массивного полупроводникового объекта, 2Д -двумерной структуре квантовой яме, 1Д -одномерной структуре квантовой нити, и наконец "0" мерной структуре -квантовой точке.

Впрочем для раствора наночастиц конкретного материала можно подобрать соответствующую жидкую среду, в которой наночастицы стабильны и не взаимодействуют между собой, вследствие чего продолжительное время сохраняют свои свойства. С другой стороны, способность коллоидных наночастиц самоорганизовываться имеет и весьма привлекательную сторону, так как позволяет технологически просто и эффективно создавать упорядоченные наноструктуры с задаваемыми электронными и оптическими свойствами. Известны методы управления процессом организации коллоидных наночастиц с помощью внешних оптических [97-100], электрических и магнитных полей [101-104]. Метод оптической манипуляции основан на локализации наночастиц в области пространства при помощи световых полей с высокими интенсивностями [105-107]. Возможность быстрой сканировки оптических полей применима для манипуляции коллоидными наночастицами в относительно малой области, однако оптическая манипуляция внутри больших областей требует создания голографических карт, конфигурацию которых достаточно трудно видоизменять. Манипуляция электрическим полем основана на локализации наночастиц в областях с максимумом или минимумом напряженности электрического поля, что реализуется приложением электрического поля с помощью ансамбля электродов. Однако, оптическая и электрическая манипуляции могут вызвать различные нежелательные последствия, например для органических материалов, влияя на биологические и биохимические процессы, в частности, интенсивные оптические поля могут вызвать нагрев и фотодиссоциацию органических молекул. Манипуляция же магнитным полем практически не влияет на живые системы, однако наночастицы в данном случае должны обладать магнитными свойствами; при этом эти свойства могут быть сильно зависимыми от размеров, что необходимо учитывать при применении манипуляции магнитным полем. Достаточно специфичными свойствами обладают углеродные наночастицы: фуллерены и нанотрубки. Атомы углерода расположены в вершинах правильных шести- и пятиугольников, покрывающих поверхность сферы или сфероида. Такие молекулы могут содержать 28, 32, 50, 60, 70, 76 и т.д. молекул. Наиболее стабильной конфигурацией обладает  $C_{60}$  с диаметром молекулы порядка 1 нм. Углеродная нанотрубка представляет собой свернутую в трубку шестигранную графеновую сетку, которая с концов может быть или открытой, или закрытой. Наиболее продуктивный способ получения фуллеренов основан на технологии с использованием электродуговых установок, в которых фуллерены получают в процессе высокотемпературного распыления графитового анода в атмосфере гелия. Углеродные нанотрубки могут быть проводниками или полупроводниками. Причем ширину запрещенной зоны полупроводниковой нанотрубки можно изменять в большом динамическом диапазоне,

прикладывая внешнее магнитное поле, вплоть до перевода ее в проводящее состояние. В последнее время интенсивно исследуются свойства нанотрубок, наполненных различными химическими элементами, в частности металлами и водородом, и наличие такой возможности модуляции всего физико-химического набора свойств нанотрубок существенно расширяет спектр возможных применений нанотрубок.

Среди широкого спектра областей применения нанотехнологий, в первую очередь, отметим наноэлектронику, которая безусловно выделяется как по технологическому интересу, так и по объему исследований. Когда размеры электронного устройства порядка единиц нанометров, то в таком устройстве уже проявляются волновые свойства электронов. Пример такого эффекта – резонансное туннелирование, открытого японским ученым Л. Исаки еще в 1958 году [108]. На основе данного эффекта в дальнейшем был реализован транзистор, который представляет собой двухбарьерный диод на квантовых ямах, при этом потенциал ям управляется третьим электродом. Вследствие малых размеров, такие транзисторы обладают высокой скоростью переключений до  $10^{12}$  Гц, что на два порядка выше скорости переключений обычных транзисторов на интегральных схемах. В 1986 г. [109] был предложен принцип транзистора использующего эффект интерференции электронов в вакууме. Интерференционный транзистор состоит из коллектора, полевого эмитора и конденсаторов между ними. За счет потенциала на конденсаторах можно управлять интерференцией электронов, то есть прохождением электронов через данную структуру. В 1993 г. была предложена схема переключающего устройства на атомных или молекулярных шнурах [110]. В роли переключателя здесь выступает отдельный атом, перемещением которого можно управлять внешним полем. При этом, наличие зазора всего в 0.4 нм может прервать электрический ток проходящий через атомный шнур. Приведенные схемы могут эффективно функционировать только при размерах устройств порядка 10 нм.

В последнее время был достигнут значительный прогресс в химических и физических методиках по формированию наночастиц, в том числе квантовых точек, которые содержат несколько электронов, удерживаемых внешним потенциалом. Эти системы представляют большой интерес не только для изучения свойств "искусственных атомов", но и из-за возможных применений в вычислительной технике, в энергетике, в создании новых материалов, в оптике и плазмонике, а так же, в биологии и медицине [111-114]. Размер коллоидных квантовых точек, не превышающий 10 нм в диаметре, определяет их большой потенциал для различных применений в современной биомедицине. При этом для селективного синтеза КТ можно провести подбор химически нейтральных

полупроводниковых материалов, что особенно важно для исключения нежелательных биохимических реакций в исследуемых биообъектах.

Как показано в ряде исследований, КТ могут значительно улучшить использование флуоресцентных маркеров в схемах биологической визуализации [115-119]. Оптические и другие физические свойства объемных полупроводников обычно определяются вне зависимости от их размера. Однако в диапазоне ниже 10нм, эта переменная играет весьма важное значение. В таких сверхмалых структурах имеет большое значение изучение влияния размера на их люминесцентные и другие физические свойства. Оптические свойства квантовых точек зависят также от наличия в КТ примесных центров типа донора или акцептора, от формы, высоты потенциального барьера на поверхности КТ, а также от физических свойств окружающей среды. Возможность настройки оптических параметров определяет принципиальную разницу между КТ и органическими флуоресцентными красителями, что позволяет оптимизировать схему КТ зондирования в случае конкретной биологической системы. Другими несомненными преимуществами КТ маркеров в биомедицине являются их фотостабильность и наличие относительно большого стоксовского сдвига между полосой поглощения и спектром люминесценции. Последнее обстоятельство имеет большую практическую ценность, так как позволяет в ходе спектрального исследования многокомпонентных биологических сред эффективно решать проблему выделения полезного сигнала от фонового.

### **§2.1. Люминесцентные свойства полупроводниковых наночастиц–квантовых точек, полученных методом лазерного синтеза**

В настоящее время хорошо известны химические методы синтеза квантовых точек. Здесь значительный прогресс был достигнут в синтезе КТ из полупроводников типа II-VI, однако, синтез КТ полупроводников типа III-V оказался проблематичным вследствие необходимости обеспечения в ходе синтеза достаточно высоких температур [120]. В последнее время простой и гибкий метод лазерного синтеза полупроводниковых наночастиц с помощью импульсной лазерной абляции в жидких средах (PLAL) был продемонстрирован в работах [121-125]. Данный метод обладает тем преимуществом, что может быть применен практически ко всем материалам, чем выгодно отличается от широко распространенного

метода химического синтеза, требующего разработки отдельной технологии для каждого конкретного вещества. Метод лазерной абляции особенно привлекателен для биомедицинских применений, вследствие того, что наночастицы могут быть сформированы непосредственно в биологически совместимых и специально подобранных жидких средах. В зависимости от типа исследуемой биологической системы, также может быть подобран конкретный полупроводник, из которого синтезируются наночастицы коллоидного раствора. Нами реализована схема синтеза наночастиц, в том числе коллоидных квантовых точек, в жидкой среде с применением импульсного наносекундного и пикосекундного лазерного излучения [122-123]. Схема лазерного синтеза коллоидных квантовых точек представлена на рис.2.2. Лазерный луч фокусируется на поверхность мишени из полупроводникового материала, размещенной в кювете с жидкостью. Под воздействием мощных импульсов лазерного излучения с длительностью в наносекундном-пикосекундном диапазоне на поверхности материала мишени образуется высокотемпературный лазерный факел. Такое воздействие лазерного излучения приводит к испарению материала мишени, или так называемой лазерной абляции. Отметим, что формирование наночастиц с помощью лазерной абляции было исследовано в различных экспериментальных условиях, при этом было показано, что их размер сильно зависит как от физико-химических свойств жидкой среды, так и от параметров лазерного излучения. Синтез наночастиц в ходе лазерной абляции может быть объяснен с точки зрения динамического механизма формирования роста частиц [124]. Согласно этому механизму, испаренный в лазерном факеле материал мишени очень быстро конденсируется и образует мелкие, так называемые, эмбриональные наночастицы. Соответственно, такие параметры лазерного излучения - как энергия и длительность импульса, играют критическую роль в этом процессе. На раннем этапе экспериментальных работ нами был реализован лазерный синтез квантовых точек с использованием импульсного YAG:Nd лазера работающего на длине волны 1064 нм в режиме пассивной синхронизации мод с длительностью импульса  $\tau_{imp} = 33$  пс и энергией 30 мДж.

На рис. 2.3 и 2.4 приведены спектры люминесценции лазеро-синтезированных коллоидных GaAs и CdS квантовых точек. Люминесценция возбуждалась при облучении на длине волны 355 нм (третья гармоника того же самого YAG:Nd лазера). Как указывают приведенные кривые, спектры люминесценции GaAs и CdS КТ расположены в спектральном диапазоне 390-440 нм.

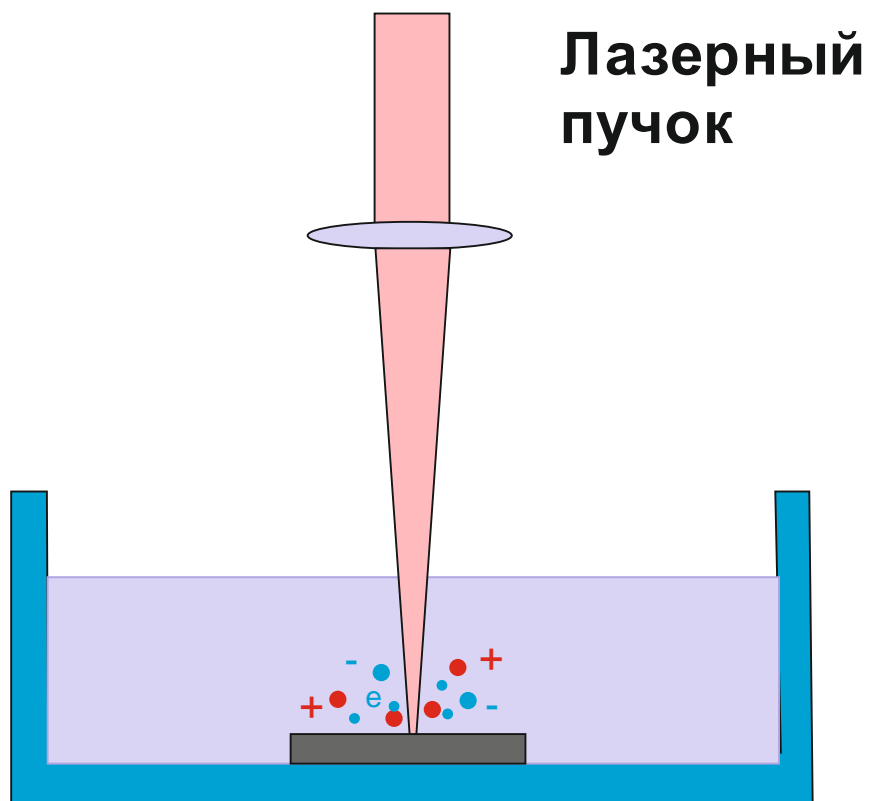


Рис. 2.2. Схема лазерного синтеза коллоидных наночастиц в жидкости.



Возможные вклады в люминесценцию материала кварцевой кюветы и дистиллированной воды были устранены путем сравнения с фотолюминесценции при заполнении кюветы чистой водой или раствором органического красителя кумарина 120 (рис. 2.5.). Отметим, что в отличие от случая массивных кристаллов для квантовых точек наблюдается значительный сдвиг фотолюминесценции в синюю область спектра, что обусловлено размерным эффектом. Максимумы люминесценции расположены на длине волны 405нм и 420 нм для наночастиц CdS и GaAs, соответственно. Теоретический анализ спектральных данных был выполнен на основе квантово-механического 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. Отметим здесь, что существующие в литературе (см, например, [125-127]) расчетные данные, относящиеся к эффекту размерного квантования в КТ, указывают на хорошее согласие результатов, полученных для модели с конечной высотой барьера [125,126]. Как известно, частицы с эффективной массой  $m$  могут быть локализованы в потенциальной яме радиусом  $d$  и высотой  $U_0$ , только если выполняется условие  $U_0 \geq \pi^2 \hbar^2 / 8md^2$  [128] ( $\hbar$  – постоянная Планка). Численный анализ показывает, что связанные состояния электрона в квантовых точках GaAs и CdS, находящихся в жидкой среде (с  $U_0 = 5$  эВ [126]), существуют для значений КТ с радиусом начиная от 2нм. В модели бесконечного потенциала длина волны  $\lambda_0$  для границы зоны поглощения квантовой точки определяется хорошо известным выражением:

$$\frac{\hbar c}{\lambda_0} = E_g + \frac{\hbar^2 \pi^2}{2m_r d^2},$$

Энергию основного состояния  $\varepsilon$  электрона (дырки) в сферической КТ, в случае конечного потенциального барьера на поверхности КТ:  $\zeta(\rho) = U_0$ , когда  $\rho = \delta$ , и  $\zeta(\rho) = 0$ , и когда  $\rho < \delta$ , можно получить из уравнения [128]:

$$-\sqrt{U_0 - \varepsilon} \tan d \sqrt{\varepsilon} = \sqrt{\varepsilon}.$$

Результаты, полученные для зависимостей  $\lambda_0(d)$  представлены на рис.2.6. для случаев бесконечного и конечного барьеров для полупроводниковых наночастиц CdS (кривые 1 и 2) и GaAs (кривые 3 и 4).

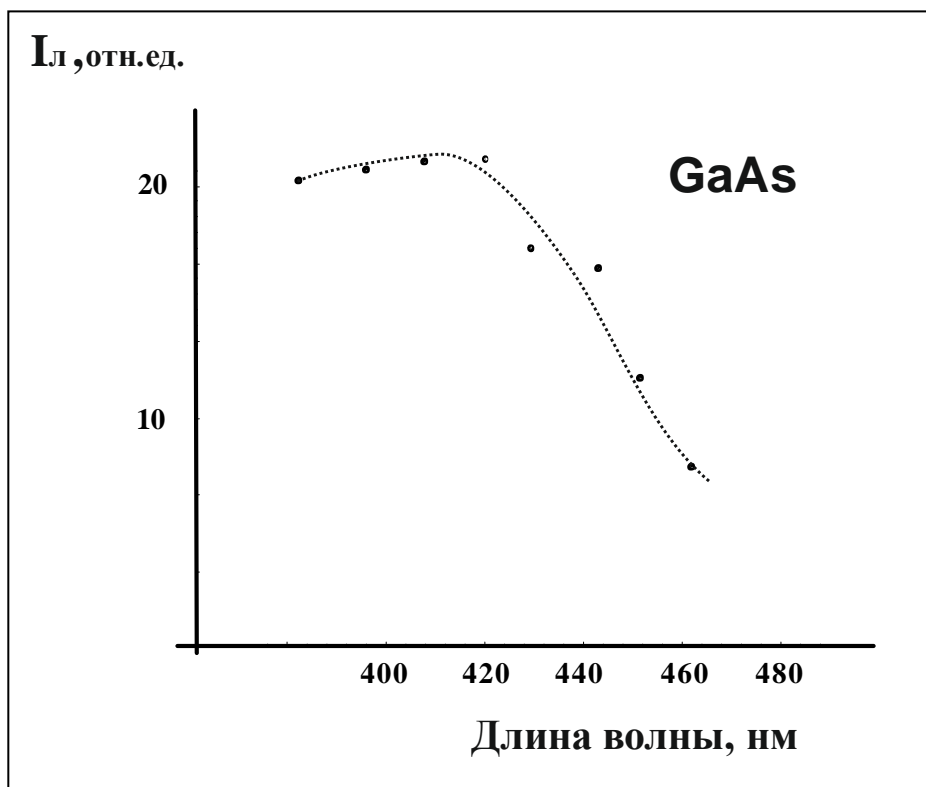


Рис 2.3. Спектр люминесценции лазеро-синтезированных коллоидных квантовых точек GaAs.

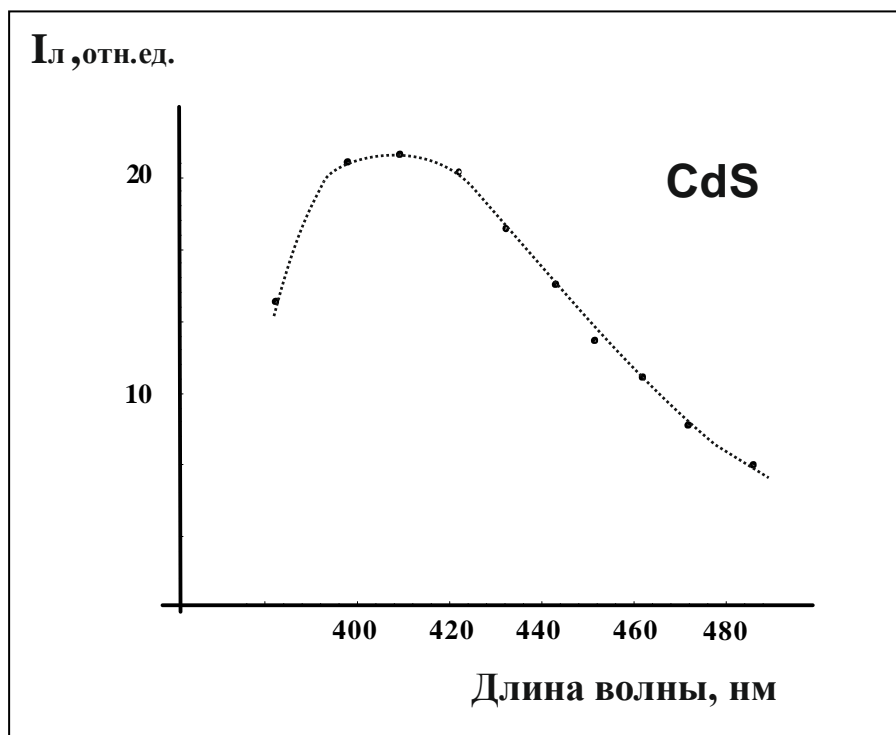


Рис 2.4. Спектр люминесценции лазеро-синтезированных коллоидных квантовых точек CdS.

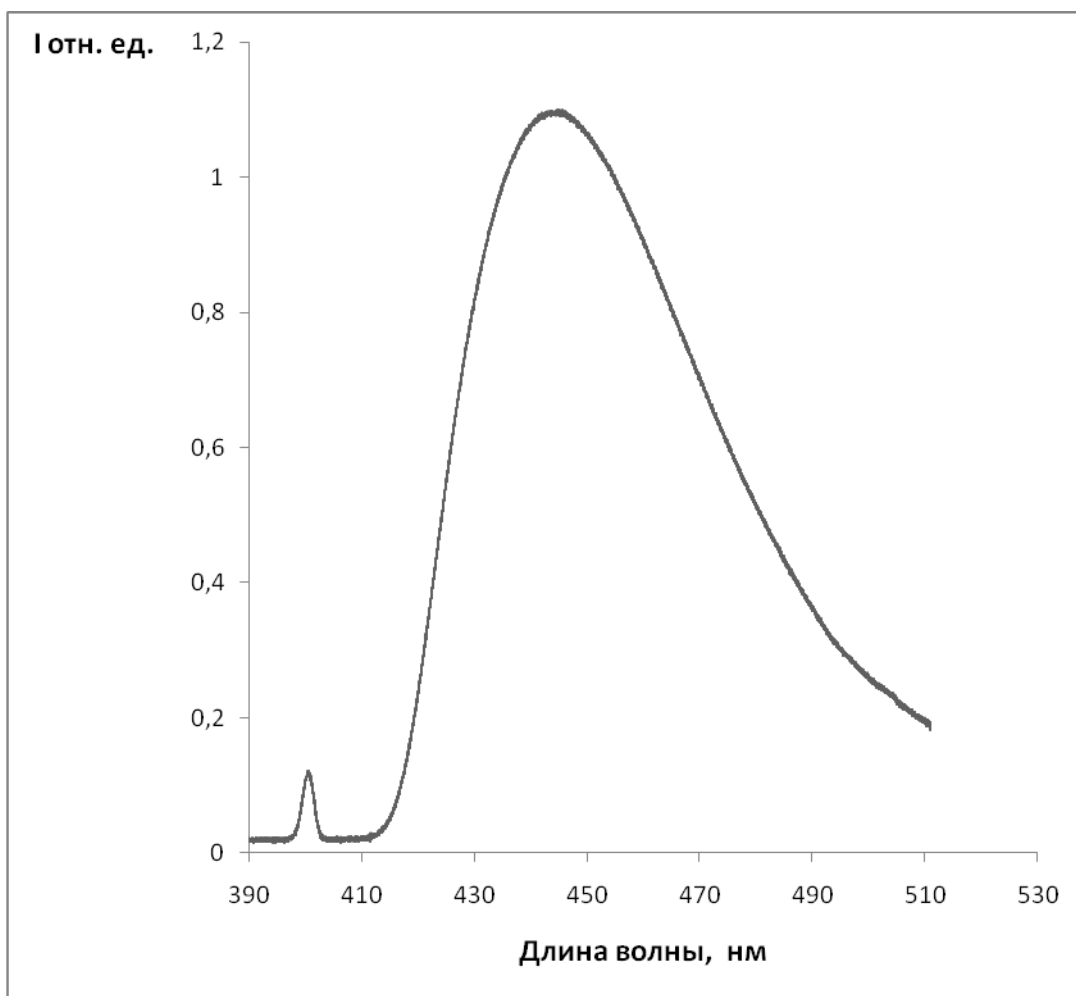


Рис. 2.5. Спектр люминесценции раствора органического красителя Кумарин 120.

На рис. 2.6 приведены теоретические результаты, полученные для зависимостей длины волны края межзонного поглощения  $\lambda_0(d)$  от радиуса  $d$  квантовых точек GaAs и CdS. Когда  $d \rightarrow \infty$  значение  $\lambda_0(d)$ , соответствует значению  $\lambda_0$  массивного полупроводника - 517нм для CdS и 864нм для GaAs при комнатной температуре. Учет конечности высоты потенциального барьера на поверхности КТ приводит к снижению значений энергии электрона и дырки в КТ, из-за возможности туннелирования частиц через барьер. Как видно из графиков, это снижение становится существенным при малых радиусах КТ и приводит к увеличению длины волны  $\lambda_0(d)$  по сравнению со случаем бесконечного барьера, при том же значении радиуса КТ. На основе сравнения теоретических кривых (2,4) рис.2.6 и экспериментально полученных спектров люминесценции можно оценить средний радиус КТ, который составил 3 нм для квантовых точек CdS и 2 нм -для GaAs. Стоит отметить, что экспериментальные данные [129] указывают на наличие заряда на поверхности КТ. Из-за несимметричности формы КТ этот заряд может привести к изменению распределения заряда и формирования отрицательных или положительных локализованных зарядов внутри КТ. Спектры КТ с радиусом около 2-3нм чувствительны к присутствию поверхностных зарядов, а также акцепторных и донорных центров. Для анализа влияния заряда на оптические свойства КТ рассмотрим простой случай, когда отрицательный заряд находится в центре КТ. Эта ситуация похожа на случай присутствия примесей ионов КТ [130]. Наличие отрицательно заряженного центра (акцептора) в одиночном КТ приводит к положительному сдвигу  $E(d)$  основного состояния электрона и, соответственно, к снижению  $\lambda_0(d)$ , при том же радиусе КТ. Корреляционная энергия основного состояния  $E_K(d)$  системы электрон-отрицательный ион в сферической КТ исследована в обоих случаях конечного и бесконечного потенциального барьера на поверхности КТ с использованием вариационного подхода.  $E = E_K(d)$  представляет собой разницу между энергией основного состояния электрона в присутствии и в отсутствие акцепторного центра в КТ.

На рис.2.7. показана зависимость  $E_K(d)$  в КТ (в единицах эффективного радиуса Бора  $a_B^* = \hbar^2 / m^* e^2$  энергия рассчитана в единицах эффективного  $R^* = e^2 / 2km a_B^*$ , для квантовых точек с параболической (кривая 1) и непараболической (кривая 2) дисперсией (дисперсия Кана) . Как показывает рис. 2.7, наличие примесных центров может резко изменить оптические свойства квантовых точек в области, где радиус КТ меньше, чем соответствующий эффективный боровский радиус полупроводника.

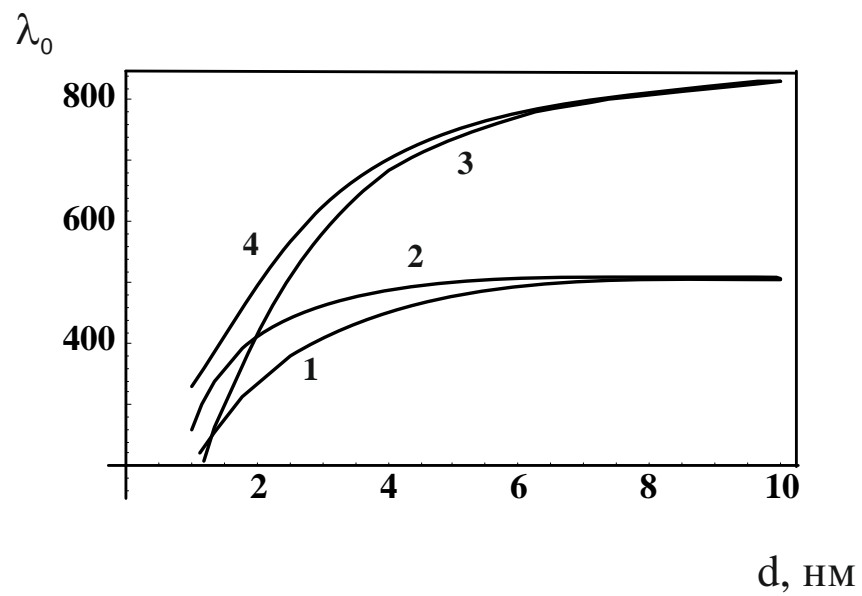


Рис.2.6. Зависимости длины волны края межзонного поглощения  $\lambda_0(d)$  от радиуса для случаев бесконечного и конечного барьеров для полупроводниковых наночастиц CdS (кривые 1 и 2) и GaAs (кривые 3 и 4).

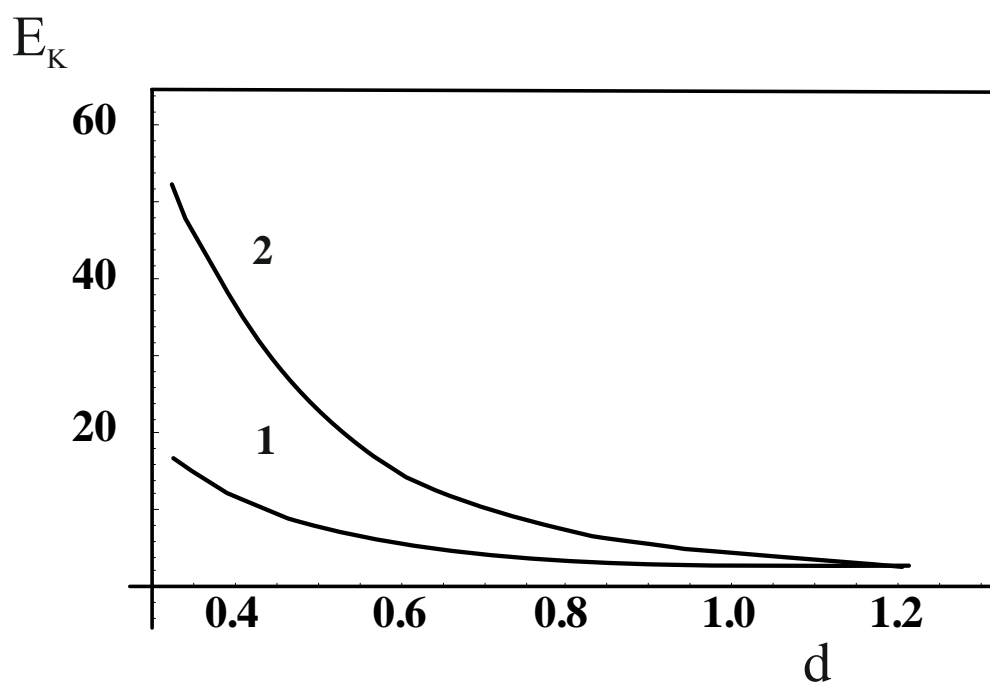


Рис.2.7. Зависимость корреляционной энергии основного состояния  $E_K$  системы электрон-отрицательный ион в сферической КТ в единицах эффективного радиуса Бора для квантовых точек с параболической (кривая 1) и непараболической (кривая 2) дисперсией (дисперсия Кана).

Расчеты показывают появление синего сдвига  $\lambda \approx 17$  нм для наночастицы GaAs с радиусом  $d = 2$  нм и  $\lambda \approx 20$  нм для наночастицы CdS с радиусом  $d = 3$  нм из-за наличия однозарядного ( $z=1$ ) акцепторного центра в КТ. Наличие донорной примеси в центре КТ приводит к соответствующему красному смещению  $\lambda_0(d)$ . Величина сдвига такого же порядка, что и в случае отрицательно заряженной примеси. Значительный сдвиг длины волны  $\lambda_0$  края фундаментального поглощения в КТ может произойти также из-за экситон-примесных центров или заряженных экситонов (трионов) [130]. Как видно из рис.2.4, ширина экспериментально полученного спектра люминесценции наночастиц CdS составляет 60нм. Если предположить, что КТ не содержит каких-либо дефектов или не имеет поверхностных зарядов, то такое спектральное уширение может быть вызвано дисперсией размеров квантовых точек. В этом случае дисперсия размер для квантовых точек CdS составляет 2,5-4 нм. Обычно некоторая часть наночастиц, генерируемые во время лазерной абляции, содержит поверхностные заряды [131,132] или могут содержать примесные центры и во время лазерного облучения. Кроме того генерируемые в КТ экситоны, могут образовывать экситон-примесные центры или заряженные экситоны [133,134]. Таким образом, суммарное уширение спектра люминесцентных КТ может быть обусловлено как дисперсией размеров нанокристаллов, так и поверхностными зарядами КТ. Только лишь наличие кулоновских центров и трионов в монодисперсных коллоидных КТ CdS с радиусом 3нм может привести к уширению спектра люминесценции порядка 60нм. Таким образом, формируемые лазером коллоидные КТ GaAs и CdS могут быть использованы в качестве люминесцентных маркеров в визуализации изображений биомедицинских исследованиях как “*in vivo*” так и “*in vitro*”, и выявление особенностей их люминесцентных свойств весьма важно в данной области.

## **§2.2. Влияние модовой структуры лазерного пучка на люминесцентные свойства наночастиц, формируемых в схеме лазерного синтеза**

Как отмечалось выше, размеры получаемых в ходе лазерного синтеза наночастиц весьма критичны к параметрам применяемого лазерного излучения. Как в литературных данных, так и в наших экспериментах по синтезу наночастиц наблюдается зависимость от длительности и энергии лазерного импульса. В этом контексте вызывает интерес возможное влияние поперечной модовой структуры лазерного луча на размеры, и соответственно, на люминесцентные свойства синтезированных наночастиц. С этой целью нами была



использована Nd:YAG лазерная система, которая способна работать в режимах двух разных поперечных электромагнитных мод [135]. Юстировкой оптического резонатора была реализована лазерная генерация как в режиме  $TEM_{00}$ , так и  $TEM_{11}$  поперечной моды. Лазерная абляция и спектральные исследования производилась на экспериментальной установке, описанной выше; при этом использовался массивный образец полупроводника GaAs. В случае  $TEM_{00}$  моды, которая представляет собой одиночную поперечную моду с гауссовским распределением интенсивности, была зарегистрирована сдвинутая в синюю область спектра люминесценция с максимумом на длине волны 420нм, соответствующая приведенной на рис. 2.3. В случае же  $TEM_{11}$  моды, которая представляет собой набор четырех отдельных поперечных мод, была зарегистрирована люминесценция белого цвета (рис 2.8). Энергия лазерного импульса в случае  $TEM_{00}$  модовой структуры составляла 30мДж и 80 мДж -при  $TEM_{11}$  моде. Стоит отметить, что в нашем случае энергии четырех поперечных мод  $TEM_{11}$  лазерного генератора по отдельности отличались друг от друга, что обусловлено с концентрационной неоднородностью в поперечном сечении лазерной среды (цилиндрический стержень, вырезанный из Nd:YAG кристалла). При этом три поперечные моды незначительно различались по энергии в диапазоне 20 - 25мДж , в то время как одна мода была гораздо слабее и равнялась  $\approx 5$ мДж. Как видно из рис.2.8, случаю  $TEM_{11}$  модовой структуры соответствует относительно широкополосый спектр с  $\lambda$  порядка 250нм, в котором наблюдаются три пика на длинах волн 455нм (синяя область), 555 нм (зеленая область) и 640нм (красная область). Таким образом из полученных люминесцентных данных можно заключить, что самая слабая поперечная мода лазера практически не играла роли в синтезе наночастиц. В то же время три остальные моды в процессе лазерной абляции действуют независимо друг от друга, и с этой точки зрения можно легко объяснить наличие трех выраженных пиков в спектре люминесценции.

На рис.2.9. приведено распределение по размерам наночастиц GaAs, соответствующее спектральным данным, полученным в случае  $TEM_{11}$  модовой структуры лазерного пучка. Данная гистограмма была рассчитана с использованием расчетных кривых рис.2.6. для зависимости поглощения длины волны края межзонового поглощения КТ от радиуса. Таким образом, нами показано, что размеры наночастиц, полученных методом лазерного синтеза в жидкости, сильно зависят от модовой структуры применяемого лазерного пучка.

**I<sub>л</sub>, отн.ед.**

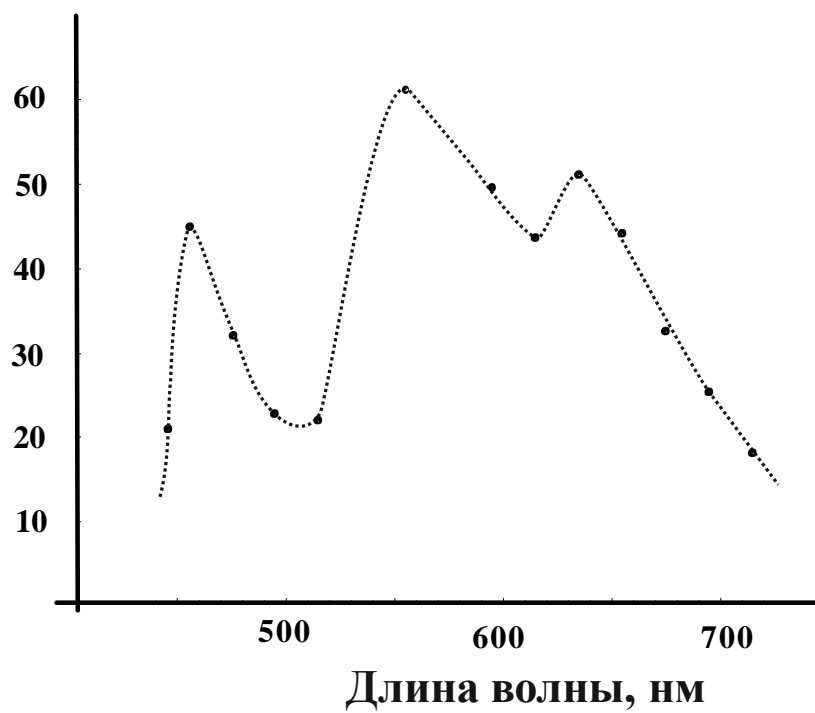


Рис.2.8. Спектр фотолюминесценции GaAs квантовых точек при ТЕМ<sub>11</sub> структуре поперечной моды лазерного пучка.

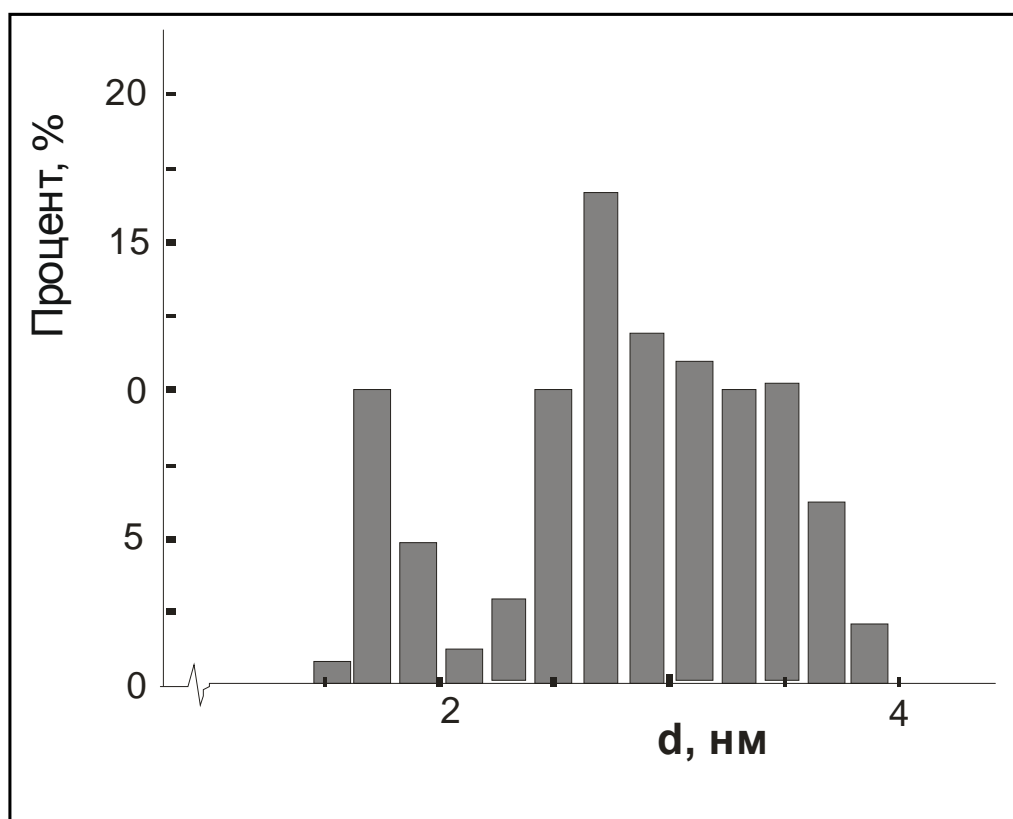


Рис.2.9. Гистограмма распределения по размерам для наночастиц GaAs в случае  $TEM_{11}$  моды лазерного излучения.

### §2.3. Лазерный синтез металлических и гибридных наночастиц.

Помимо полупроводниковых наночастиц в современной науке и технике проявляется большой интерес также к металлическим наночастицам, размер которых варьируется от единиц до сотен нанометров. У таких наночастиц многообещающие перспективы по применению в широком диапазоне различных технологий, включая наноэлектронику, материаловедение, катализ, фотопреобразование, биомедицина и т. д. Нами были проведены исследования по лазерному синтезу металлических наночастиц [136]. в экспериментальной установке описанной выше, однако в данном случае использовался наносекундный лазер.

Импульсный Nd:YAG-лазер с пассивной модуляцией добротности на длине волны генерации 1064нм, с длительностью импульса 8нс и частотой повторения 10Гц был использован для синтеза металлических наночастиц в водной среде. Лазерный луч фокусировался на поверхность массивной металлической пластины, размещенной в стеклянной кювете с дистиллированной водой (рис.2.2.). Экспозиция лазерного облучения составляла два часа. Как отмечалось во введении, в биомедицине особый интерес вызывают металлические наночастицы, обладающие выраженным поверхностным плазмонным резонансом. В частности, возможности диагностики и фототермической терапии злокачественных опухолей методом фотонагрева злокачественных клеток посредством металлических наночастиц золота была успешно продемонстрирована в работах [137-139].

Указанный метод основан на возбуждении локализованного поверхностного плазмонного резонанса (ЛППР), когда наноразмерная локализация и усиление электромагнитных полей достигается в непосредственной близости от металлической наночастицы [140]. Здесь поверхностными плазмонами называются коллективные флуктуации электронной плотности на границе диэлектрика с положительной диэлектрической проницаемостью и металла с отрицательной диэлектрической проницаемостью [141]. Локально усиленное оптическое поле генерирует локализованную тепловую энергию в связи с быстрым преобразованием энергии фотонов в тепло через электрон-электронное рассеяние и электрон-фононное взаимодействие вблизи длин волн ЛППР [142-145]. Локализованный поверхностный плазмонный резонанс для золотых и серебряных сфероидных наночастиц находится в зелено-голубом диапазоне видимого спектра, однако может быть смещен в красную или ближнюю инфракрасную область, если форма наночастиц модифицируется в виде наностержней или сферических нанооболочек. Для биологических тканей это имеет более практическое значение, так как биоткани относительно прозрачны для красного–ближнеинфракрасного излучения.

Наиболее известные и широко применяемые в условиях локализованного поверхностного плазмонного резонанса частицы - это золотые и серебряные наночастицы, которые проявляют сильные по амплитуде ЛППР в видимой области, на длинах волн 405 нм и 520 нм соответственно. Достаточно слабую по амплитуде ЛППР в красной области спектра проявляют также наночастицы меди. Нами были проведены измерения оптического поглощения коллоидных растворов золотых и медных наночастиц, которые были синтезированы методом лазерной абляции в жидкости (рис.2.10 и 2.11). Полученные длины волн резонансного поглощения согласуются с предыдущими публикациями по частотам плазмонных резонансов для широко используемых сферических наночастиц этих металлов с размерами около 50 нм. Плазмонный резонанс можно наблюдать, если обратиться к формуле для рассеяния электромагнитной волны на малой сфере радиуса  $a \ll \lambda$ , полученной на основе теории Ми [146]

$$E \approx -\frac{2i}{3} \frac{\varepsilon - 1}{\varepsilon + 2} (ka)^3 E_0$$

где  $E$  - амплитуда рассеянной волны.

Отметим, что диэлектрическая проницаемость золота и серебра в видимой части спектра отрицательна и зависит от частоты. В биомедицинских исследованиях, как правило, используются золотые наночастицы ввиду их химической нейтральности и стабильности. Отметим также, что при использовании наночастиц в условиях возбуждения локализованного поверхностного плазмонного резонанса требуется строгая настройка на фиксированную резонансную длину волны и такая подстройка по частоте излучения практически не предусмотрена в существующих коммерческих медицинских лазерных системах. Исходя из зависимости амплитуды и частоты плазмонного резонанса от значений диэлектрической проницаемости  $\varepsilon$  конкретного металла, нами показана возможность модифицирования плазмонных свойств гибридных металлических наночастиц с использованием наночастиц из сплавов Au, Ag и Cu. Для формирования гибридной металл-металл коллоидной взвеси наночастиц, вначале производился высокооднородный сплав двух металлов, затем образец подвергался облучению лазером в кювете с дистиллированной водой.

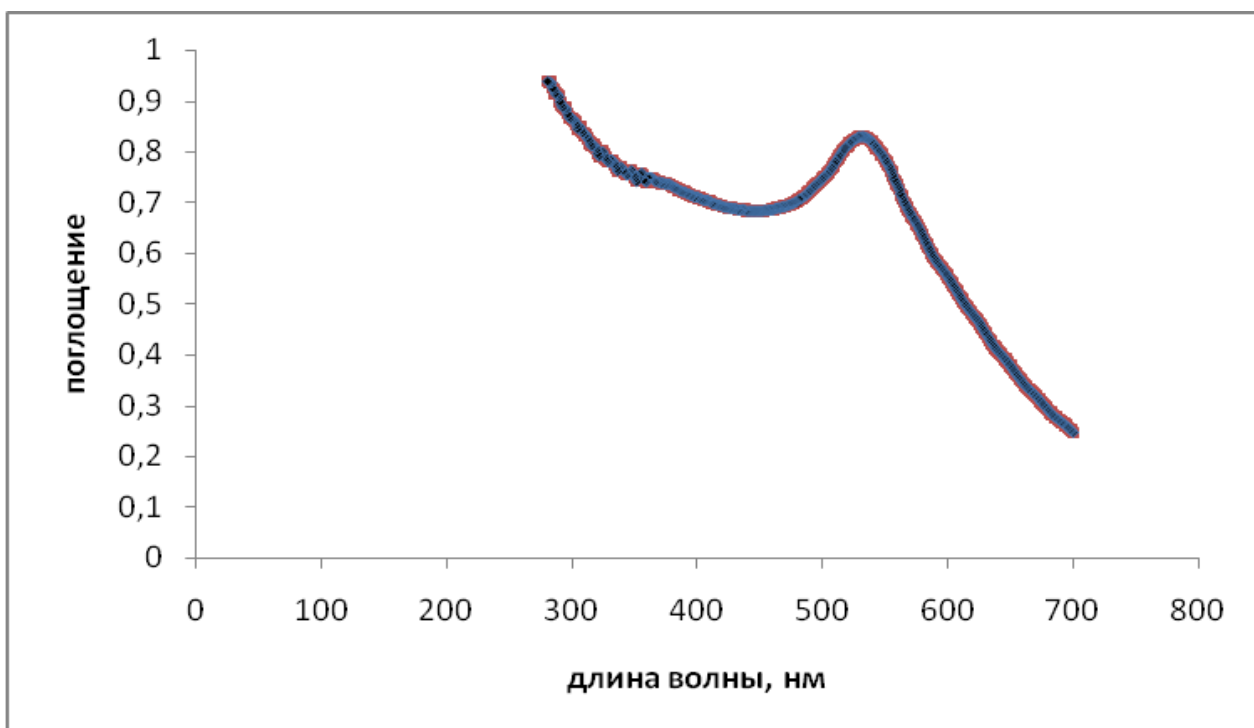


Рис.2.10. Спектр поглощения водного раствора наночастиц золота.

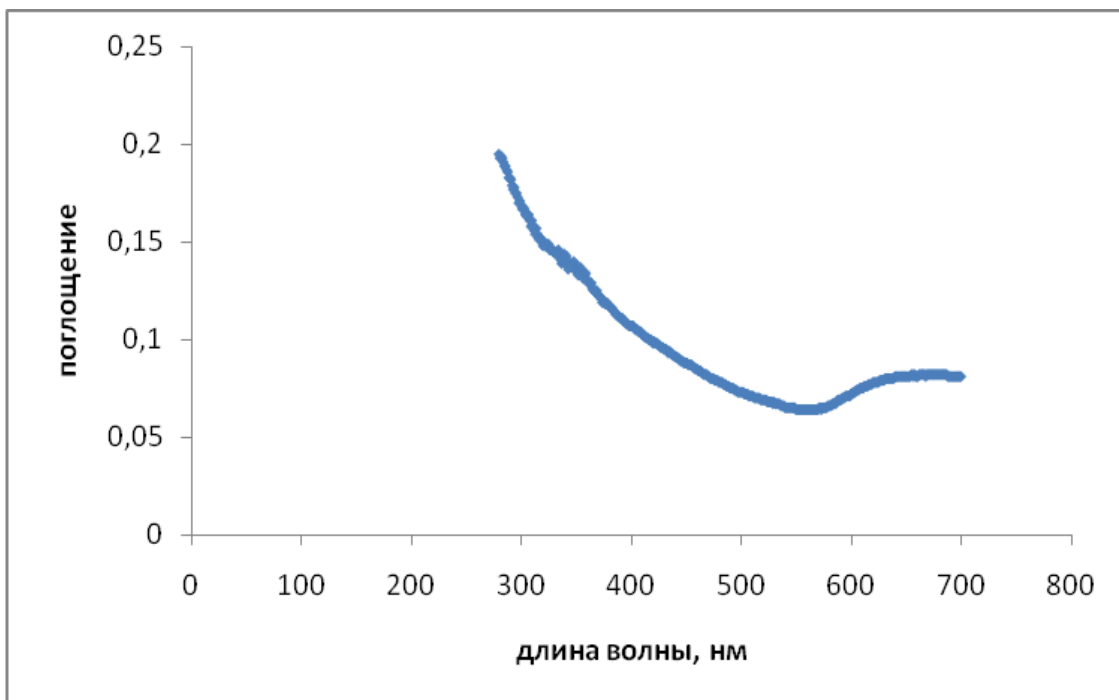


Рис.2.11. Спектр поглощения водного раствора наночастиц меди.

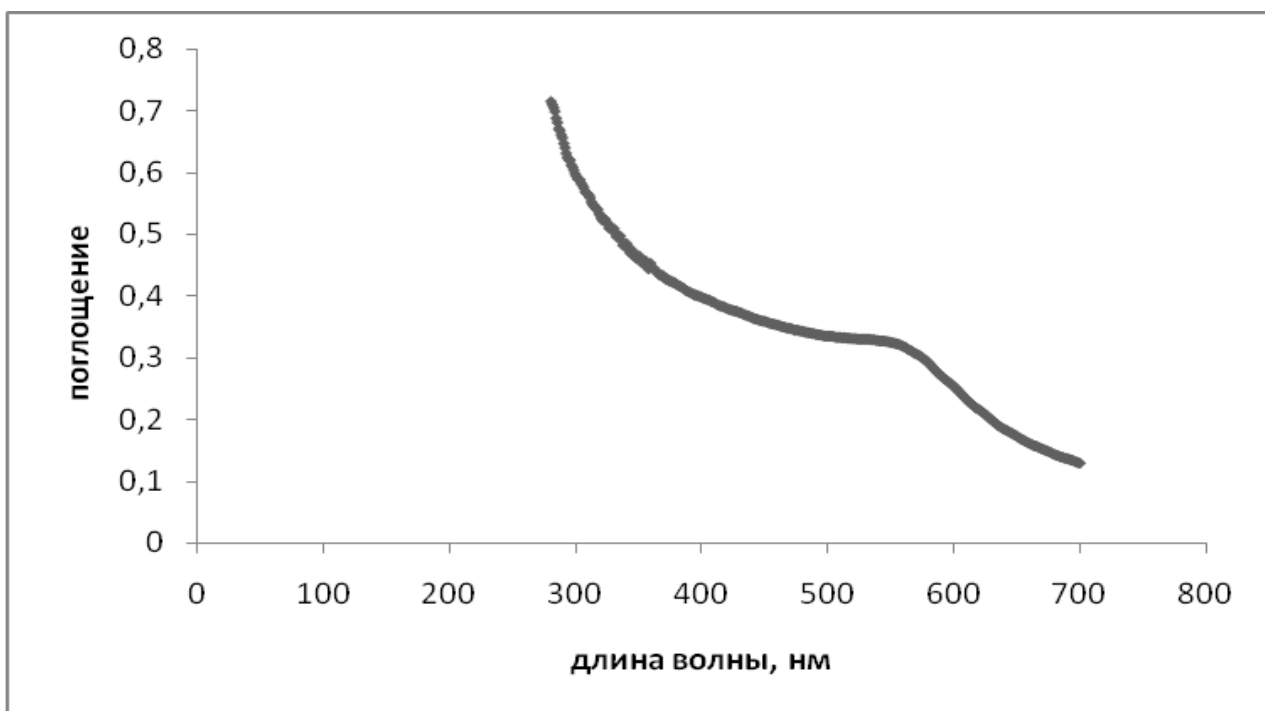


Рис.2.12. Спектр поглощения водного раствора наночастиц сплава золота с медью.



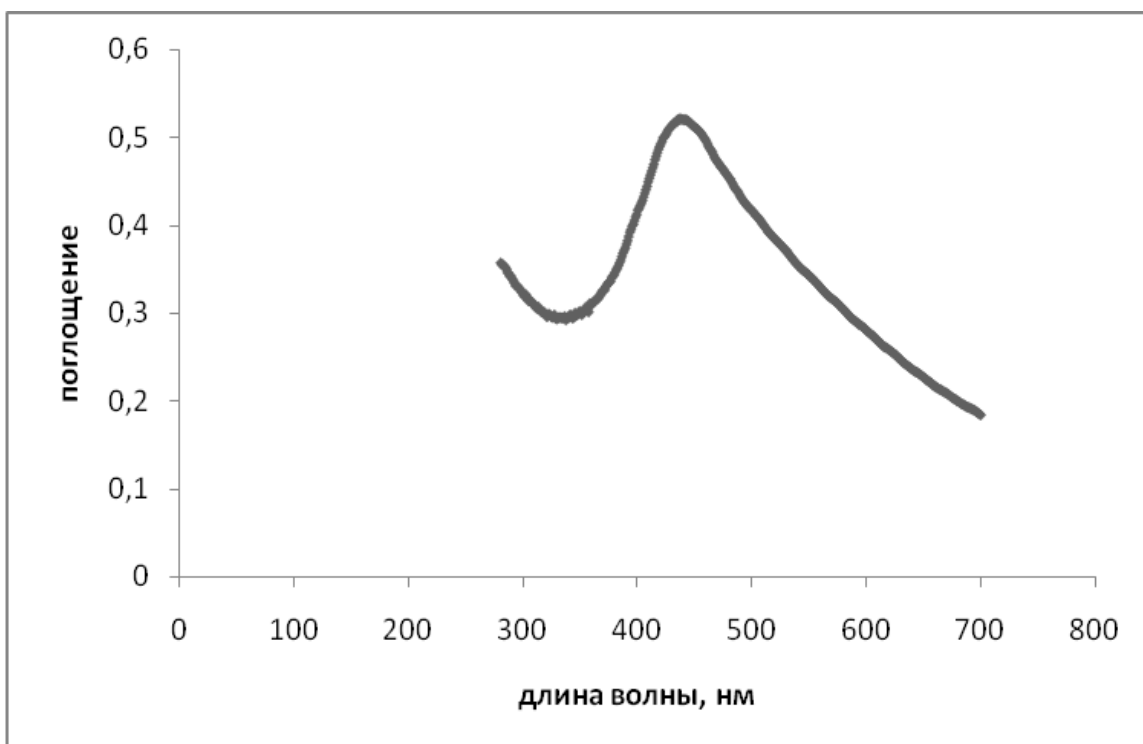


Рис.2.13. Спектр поглощения водного раствора наночастиц сплава золота с серебром.

Как видно из спектра поглощения водного раствора наночастиц сплава золота с серебром (рис.2.13), частота плазмонного резонанса составляет  $\approx 460\text{нм}$ , то есть значительно смещена от плазмонных резонансов как золотых, так и серебрянных наночастиц и лежит в спектральном промежутке между их плазмонными резонансами. Таким образом мы получили специфичный тип гибридных металлических наночастиц со спектрально сдвинутой частотой плазмонного резонанса. Отметим здесь также, что наночастицы сплава золота с серебром в водном коллоидном растворе отличаются химической нейтральностью и стабильностью, как и для случая золотых наночастиц. Как видно из спектра поглощения водного раствора наночастиц сплава золота с медью (рис.2.12.), здесь также наблюдается модифицированный спектр поглощения. Отметим ослабление амплитуды плазмонного резонанса более чем в два раза, по сравнению со случаем наночастиц из чистого золота (рис. 2.10), однако при этом не наблюдается изменения частоты плазмонного резонанса. Данный результат, по всей видимости, обусловлен тем обстоятельством, что наночастицы из чистой меди проявляют плазмонный резонанс довольно слабый по амплитуде (рис 2.11), который по величине на порядок слабее по сравнению с наночастицами чистого золота.

Нами также были проведены работы по лазерному синтезу металл-полупроводниковой гибридной коллоидной взвеси наночастиц в водной среде. С этой целью вначале лазерный луч фокусировался на поверхность никелевой пластины, размещенной в стеклянной кювете с дистиллированной водой. В данном случае использовался наносекундный Nd:YAG-лазер. При этом экспозиция лазерного облучения составляла два часа. Затем в коллоидный раствор, содержащий наночастицы Ni, размещался образец кристаллического кремния, который подвергался лазерной абляции также в течение двух часов. Коллоидная взвесь металл-полупроводниковых наночастиц была сформирована также по схеме, когда наночастицы Ni и Si были синтезированы отдельно в различных кюветах, после чего механически смешивались. Следует отметить, что спектры люминесценции полученных гибридных наночастиц в этих двух экспериментальных подходах были идентичными. Для измерения спектров люминесценции водный раствор наночастиц был помещен в кварцевую кювету с прозрачными стенками в УФ-области спектра. Люминесценция коллоидных квантовых точек

возбуждалась излучением непрерывного диодного лазера с длиной волны  $400\text{нм}$  и мощностью  $10\text{ мВт}$ . Спектры люминесценции были измерены спектрометром, собранным нами на базе монохроматора ЛОМО МДР-23 и фотоумножителя ФЭУ-79 с усилителем электрического сигнала.

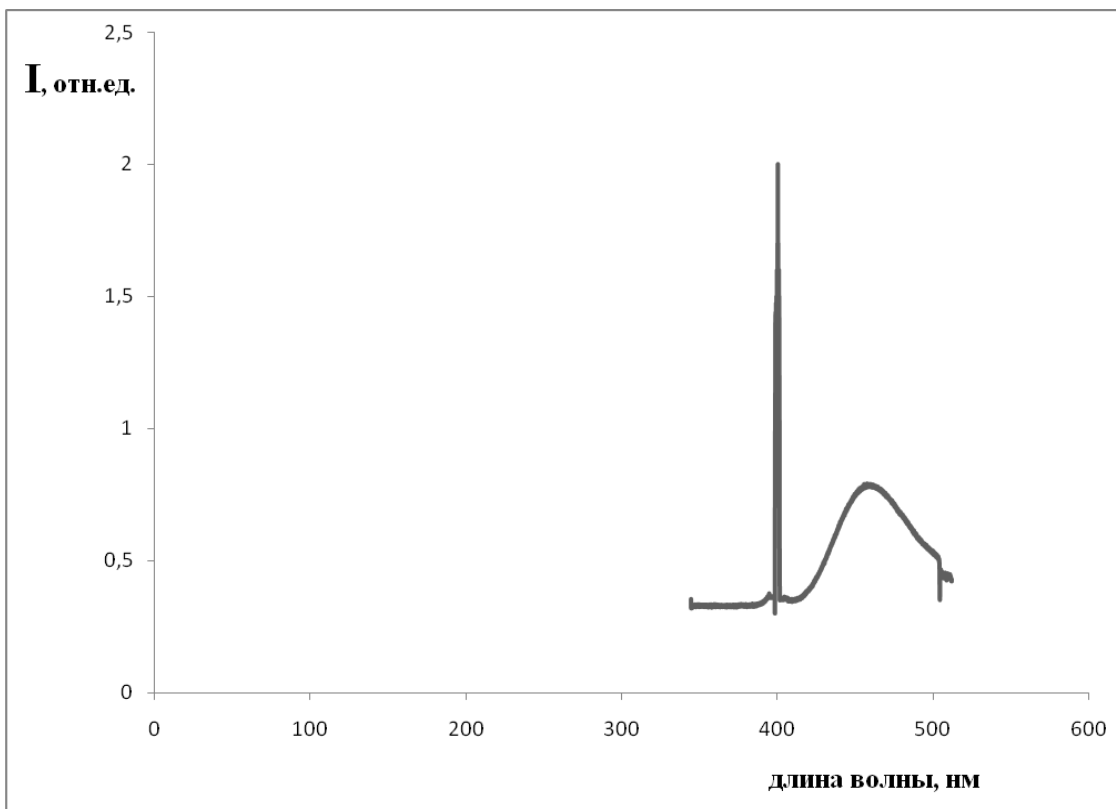


Рис.2.14. Спектр люминесценции гибридного коллоидного раствора Si - Ni наночастиц.

Спектр люминесценции гибридного коллоидного раствора Si - Ni наночастиц представлен на рис.2.14. Значительный синий сдвиг фотолюминесценции был зарегистрирован, который связан с эффектом размерного квантования. Сама люминесценция локализована в синей области спектра, с максимумом на длине волны 455нм, что значительно отличается от фотолюминесценции объемного Si, расположенной в ближней инфракрасной области. Наблюдаемый интенсивный максимум на 400нм соответствует длине волны лазерного возбуждения. В течение одного года наблюдалась стабильность люминесцентных свойств полученный таким образом гибридных наночастиц. Отметим также, что не наблюдалась люминесценция отдельно синтезированных наночастиц Si.

Здесь мы приведем некоторые интерпретации результатов нашего эксперимента по оценкам, основанным на квантово-размерном эффекте и известных свойствах наночастиц Si, а также учитывая влияние заряженных наночастиц никеля на спектр люминесценции наночастиц Si. Как известно [129], металлические наночастицы, полученные в различных средах методом лазерной абляции несут положительный или отрицательный электрический заряд. В нашем случае гибридной системы Si-Ni, заряженная наночастица Ni наводит статическое электрическое поле, которое вызывает штарковский сдвиг энергетических уровней в кремниевой КТ.

Рассмотрим точечный заряд, расположенный на определенном расстоянии от поверхности кремниевой КТ (рис.2.15.). Оценка сдвига спектра люминесценции наночастиц Si под влиянием статического электрического поля внешнего заряда позволяет объяснить экспериментальные результаты эффектом Штарка в неоднородном (кулоновском) электрическом поле.

Так, внешний точечный заряд  $Q$  на расстоянии  $R_q$  от центра кремниевой квантовой точки создает электростатическое экранированное поле в точке  $r$  внутри КТ, потенциал которого может быть представлен в следующей форме [147]:

$$\phi(r) \approx q \sum_0^{\infty} \frac{2n+1}{\varepsilon n+n+1} \frac{r^n}{R_q^{n+1}} P_n(\cos \nu) , \quad (1)$$

где  $P_n \cos \nu$  есть полином Лежандра,  $\varepsilon$  - экранированная диэлектрическая проницаемость кремниевых квантовых точек,  $\nu$  - угол между векторами  $r$  и  $R_q$ .

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

$$\Delta E = \int dr_e dr_h [\phi(r_h) - \phi(r_e)] |\psi_0(r_e, r_h)|^2 \quad (2)$$

Принимая во внимание вид потенциала внешнего поля (1), сдвиг энергии (2) может быть представлен в виде суммы

$$\Delta E = \sum_{n=0}^{\infty} E_n, \quad (3)$$

где

$$\Delta E_n = \frac{eq}{R_q} \int dr_e dr_h \left\{ \frac{2n+1}{\varepsilon n + n + 1} \times \frac{(r_h^n P_n(\cos \nu_h) - r_e^n P_n(\cos \nu_e))}{R_q^n} |\psi_0(r_e, r_h)|^2 \right\}. \quad (4)$$

Первый член в сумме (3):  $\Delta E_0 = 0$ . Оценим основной член, соответствующий  $n = 1$ , с учетом малости остальных членов. В итоге получим:

$$\Delta E_1 = \frac{eq}{R_q} \int dr_e dr_h \left\{ \frac{3}{\varepsilon + 2} \times \frac{r_h \cos \nu_h - r_e \cos \nu_e}{R_q} |\psi_0(r_e, r_h)|^2 \right\}. \quad (5)$$

Это выражение можно написать в следующей форме:

$$\Delta E_1 = \frac{Deq}{R_q^2} \frac{3}{\varepsilon + 2} \left( \frac{\langle z_h \rangle - \langle z_e \rangle}{D} \right), \quad (6)$$

где  $D$  -размер экситона,  $\langle z_{h,e} \rangle = \int |\psi_0(r_e, r_h)|^2 z_{h,e} dr_e dr_h$  - средние значения плотности распределения заряда электрона и дырки, соответственно.

Для вычисления энергии спектрального сдвига, оценим  $\Delta E_1$  для вышеописанных экспериментальных условий. Как показано в [148], излучаемая энергия фотона зависит от размера кремниевого нанокристалла. При уменьшении размера наночастиц квантово-размерный эффект воздействует на ширину запрещенной зоны экситона, тем самым увеличивая энергию излучения. В ходе исследований люминесцентных свойств наночастиц кремния при облучении длиной волны 400 нм, люминесценции не наблюдалось. Это свидетельствует о том, что ширина запрещенной зоны квантовых точек Si более 3эВ, что согласуется с результатами работы [149].

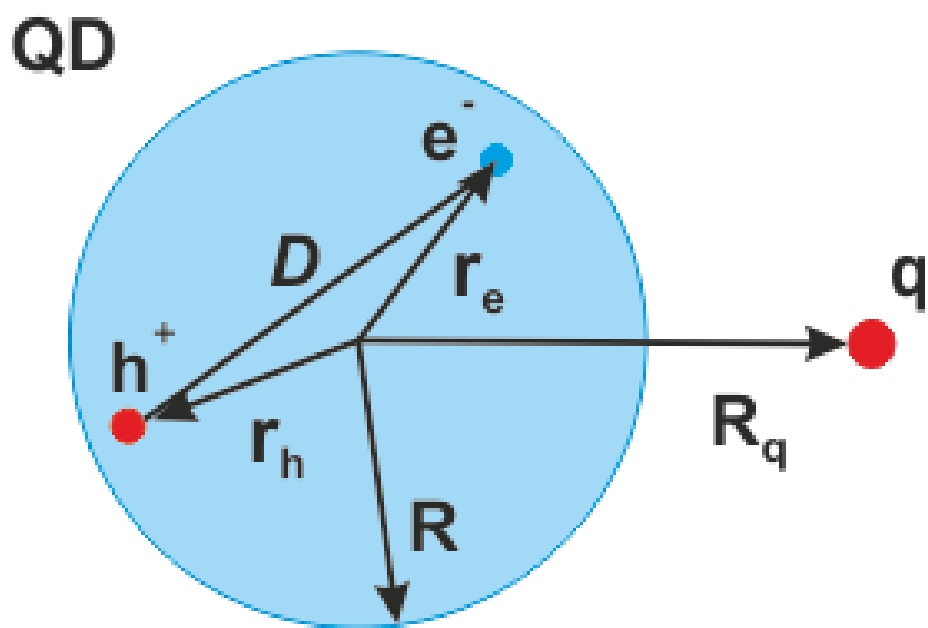


Рис.2.15. Схема взаимодействия точечного заряда с экситоном на дистанции  $R$  от центра КТ.

Согласно работе [148], такие энергии соответствуют наночастицам кремния с диаметром менее 1.4 нм. Чтобы определить другие параметры, мы положим значение экранированной диэлектрической постоянной, равной  $\epsilon = 6$  [150], что исходя из результатов работы [148] соответствует диаметру  $D = 1.3$  нм кремниевой КТ при пассивации атомами водорода. Мы полагаем, что наночастицы Si, формируемые в жидкой среде (в нашем случае - чистая вода), оборванные связи атомов кремния на поверхности КТ должны насыщаться в основном атомами водорода. Вероятность осуществления такого процесса велика ввиду того обстоятельства, что в процессе лазерной абляции, при образовании лазерной плазмы, большое количество молекул водорода производится за счет диссоциации молекул воды в области высокотемпературного лазерного факела. Как показано в работе [150], в случае наночастиц Si, пассивируемых водородом, размер экситона примерно равен диаметру КТ. Так как мы рассматриваем случай расположения никелевой наночастицы в непосредственной близости от кремниевой КТ, то  $R_q - R \ll R$ , и кулоновский потенциал является достаточно сильным, чтобы отодвинуть дырку от электрона на определенное расстояние. В этом случае, соотношение  $|\langle z_h \rangle - \langle z_e \rangle|/D$  может достигнуть величины 0.5 [151] и значение  $\Delta E_1$  составит 0.207 эВ, при диаметре кремниевой КТ  $D = 1.3$  нм. Такой сдвиг энергии соответствует красному смещению спектра люминесценции квантовой точки на величину порядка 30 нм. Отметим, что величина спектрального сдвига весьма критична от расстояния точечного заряда до поверхности кремниевой КТ. Таким образом, наличие синей люминесценции в случае гибридной системы Si-Ni наночастиц, при отсутствии люминесценции, для случая коллоидного раствора состоящего только из кремниевых наночастиц, можно объяснить проявлением штарковского механизма сдвига энергетических уровней в КТ.

## **§2.4. Некоторые возможности применения наночастиц в биомедицине: лазерная абляция и сварка биоткани**

Как было показано в предыдущих параграфах, размер полупроводниковых наночастиц получаемых в схеме лазерного синтеза составляет порядка 2-3 нм. Для медицинских применений наибольший интерес представляют наночастицы с достаточно малыми размерами, так чтобы они могли оставаться в системе кровообращения после инъекции, проходить через капиллярные системы органов и тканей, избегая эмболии сосудов,

а также, легко проникать сквозь клеточную мембрану. Нами исследована возможность применения металлических наночастиц в биомедицине для случаев лазерной абляции и сварки биотканей [152,153]. Для синтеза металлических наночастиц использовался лазер YAG:Nd с длиной волны 1064 нм, длительностью импульса 8 нс, частотой повторения 10Гц и работающей в поперечной TEM<sub>00</sub> электромагнитной моде. Лазерный луч фокусировался на поверхность объемной металлической мишени, помещенной в стеклянную кювету с дистиллированной водой. Экспозиция лазерного облучения составляла два часа. Сферические наночастицы металлов Ag, Ni, Ti, Au и Cu были сформированы в жидкой среде. Затем образцы куриной кожи выдерживались в течение 15мин в коллоидном растворе металлических наночастиц.

Рисунок 2.16 демонстрирует типичное фотографическое изображение (полученное с помощью оптического микроскопа) образца биоткани прокрашенной металлическими наночастицами. Непрерывный YAG: Nd лазер с диаметром выходного пучка порядка 3 мм и мощностью до 4 Вт был использован для сварки и абляции биоткани. Таким образом нами исследованы возможности лазеро-хирургических процедур посредством фотонагревания образцов биологической ткани с помощью инфракрасного лазерного излучения на длине волны 1064 нм. Как было отмечено в параграфе §2.3, излучение в инфракрасной области спектра находится далеко от плазмонных резонансов сферических металлических наночастиц Au, Ag и Cu. Следует отметить, что в настоящее время наиболее интенсивно исследуются возможности применения в медицине именно золотых наночастиц, ввиду наличия у них сильного плазмонного резонанса.

Два участка поверхности образца, один из которых неокрашенный, а другой - прокрашенный металлическими наночастицами, были подвержены процедуре лазерной абляции при одинаковой дозе облучения непрерывным лазером. Рис. 2.17 показывает картину поверхности образцов кожи после процедуры лазерной абляции. Как видно из рис.2.17, площадь участка биообразца, подвергнутой лазерной абляции, которая была окрашена наночастицами, примерно в 3 раза больше, чем для непрокрашенной области. При этом практически одинаковый результат был получен для наночастиц Ag, Ni, Ti, Au, Cu металлов, вне зависимости от наличия плазмонного резонанса. Таким образом, мы наблюдаем существенное различие в фотовоздействии для образцов биоткани, неокрашенных и прокрашенных металлическими наночастицами. Такое различие в поглощении инфракрасного излучения может быть объяснено интенсивным образованием



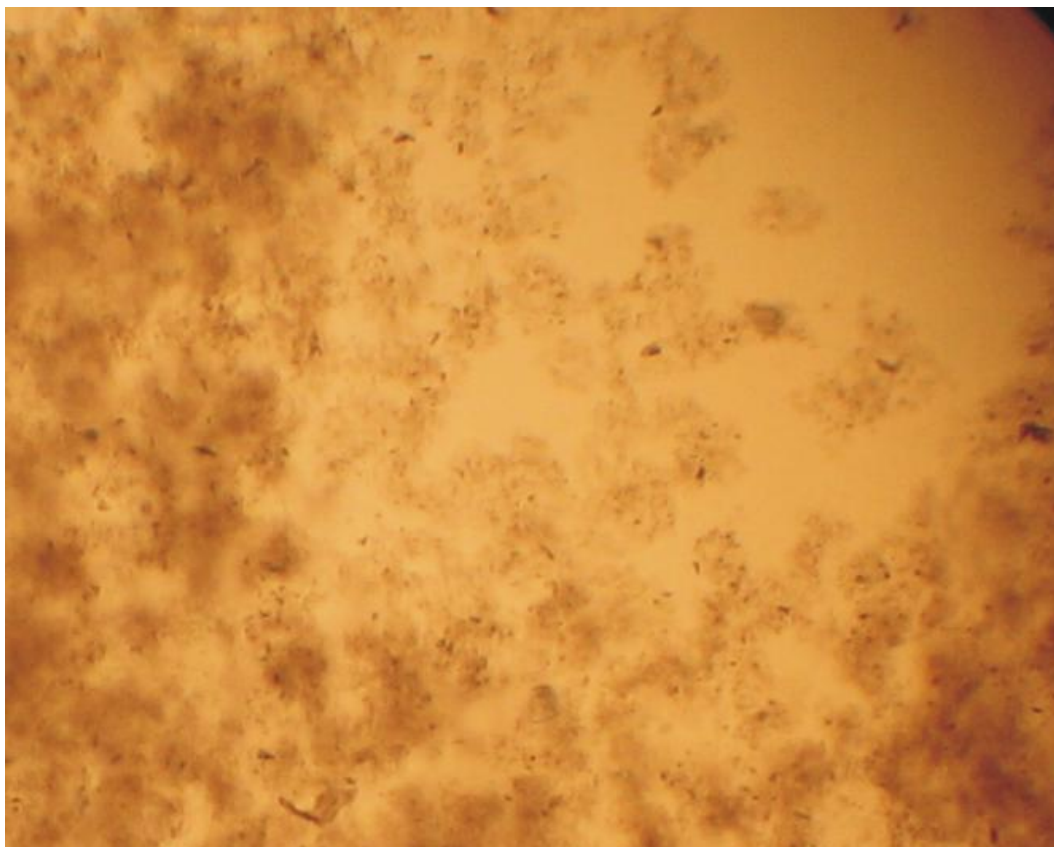


Рис.2.16. Характерное фотографическое изображение образца биоткани, прокрашенной металлическими наночастицами.

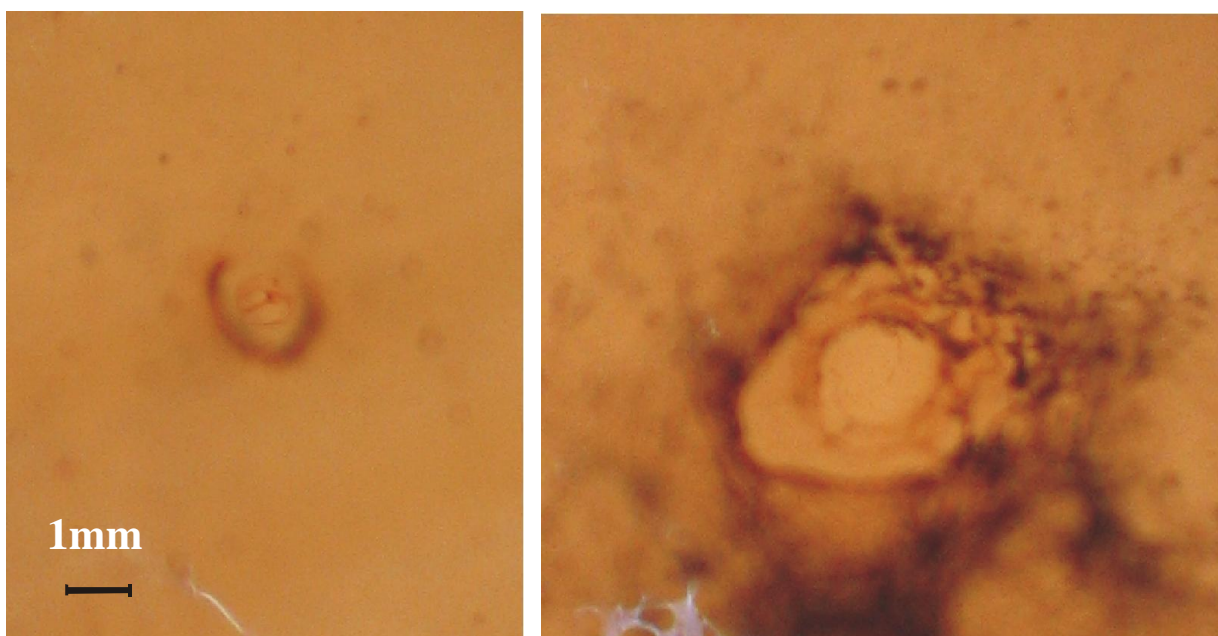


Рис.2.17. Фотографические изображения образцов биоткани после процедуры лазерной абляции. Слева – область образца, непрокрашенная наночастицами, справа – прокрашенная наночастицами серебра.

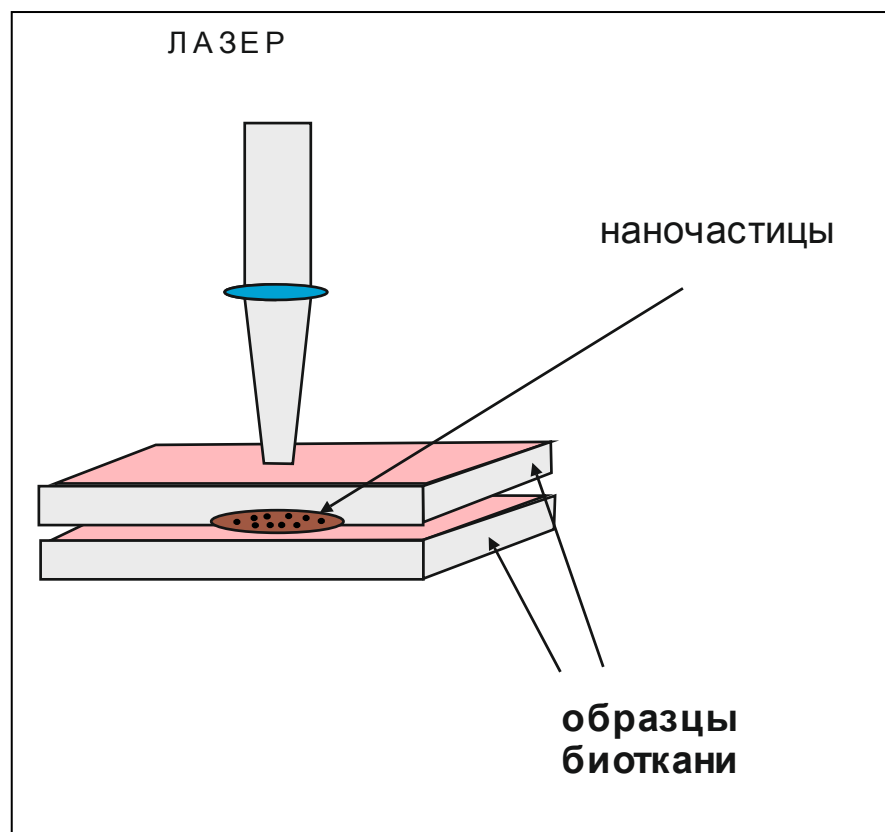


Рис.2.18. Схема точечной лазерной сварки в глубине биоткани

кластеров металлических наночастиц в образцах биоткани. В самом деле, как можно увидеть на рис.2.16, окраска биоткани весьма неоднородна, и можно наблюдать множество кластерных центров, прокрашенных в достаточно интенсивный черный цвет. В книге [154] проведен численный анализ оптических характеристик фрактальной агрегаций наночастиц. Было показано, что спектры поглощения сдвинуты в сторону инфракрасного диапазона, в случае кластеров, содержащих большое количество наночастиц (500-10000).

Таким образом, применение металлических наночастиц в лазерной хирургии позволяет эффективно использовать ИК лазерное излучение, которое может относительно глубоко проникать в биоткань. Данное преимущество может быть использовано для разработки новых схем лазерной сварки в глубине биоткани (рис.2.18). Для двух образцов куриной кожи толщиной 2мм была произведена лазерная точечная сварка. При этом контактируемые поверхности образцов были окрашены серебрянными наночастицами. Лазерное излучение проникало через первый образец не вызывая видимых повреждений биоткани и достигало области, содержащей наночастицы. Из-за сильного поглощения света наночастицами и затем селективного нагрева окружающей ткани, локальная точечная сварка образцов была осуществлена. Отметим, что применение наночастиц Ag в лазерной хирургии может привести к значительному улучшению послеоперационного заживления больных, ввиду наличия сильного бактерицидного эффекта. Также важно отметить, что фотонагрев биотканей в ряде случаев может привести к воспалительному процессу в связи с снижением местного антимикробного иммунного сопротивления. Данное постоперационное негативное влияние может быть также сведены к минимуму при использовании наночастиц металлов в лазерных хирургических процедурах, когда возможно значительно снизить дозу облучения.

## **Выводы главы 2.**

Предложена и реализована схема лазерного синтеза полупроводниковых и металлических сферических наночастиц методом лазерной абляции в жидкости. Исследованы люминесцентные свойства коллоидных растворов КТ GaAs и CdS. Зарегистрированы спектры люминесценции, которые расположены в синей области видимого спектра 390-440нм, что обусловлено квантово-размерным эффектом. Теоретический анализ экспериментальных данных показывает на малый размер лазеро-синтезированных КТ, составляющий порядка 2 – 3 нм. Исследована роль структуры

поперечных мод лазерной генерации в случае синтеза наночастиц GaAs. В случае  $TE_{M_{11}}$  модовой структуры получен относительно широкополосый спектр с шириной порядка  $\Delta\lambda=250\text{нм}$ , с пиками на длинах волн  $\lambda=455\text{нм}$  (синяя область),  $\lambda=555\text{ нм}$  (зеленая область) и  $\lambda=640\text{нм}$  (красная область).

Реализован лазерный синтез гибридных металл-металлических и металл-полупроводниковых коллоидных систем наночастиц. Для случаев Au-Ag и Au-Cu гибридных наночастиц реализована возможность модификации плазмонных свойств: изменение частоты и амплитуды плазмонного резонанса.

Проведено исследование люминесцентных свойств коллоидного раствора Si-Ni. Показано появление фотолюминесценции 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.

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

### ГЛАВА 3

## ВОЗМОЖНОСТИ РЕАЛИЗАЦИИ ОПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ НАНОМЕТРИЧЕСКОГО РАЗРЕШЕНИЯ

За последнее десятилетие нанотехнологии нашли важные применения в самые разные отрасли науки и техники. Безусловно, современные нанотехнологии имеют в качестве базиса многие открытия и достижения в различных областях фундаментальной науки прошлого века, особенно в области квантовой физики. Среди них отметим открытие туннельного эффекта, приведшего в 1981 году к созданию сканирующего туннельного микроскопа (СТМ) [155-159]. Через несколько лет (1986 г.) был создан атомно-силовой микроскоп (АСМ), который в отличие от СТМ позволяет исследовать также неэлектропроводящие образцы. Однако схемы силовой микроскопии позволяют определить только поверхностную морфологию исследуемого объекта; при этом достигнуто разрешение порядка 10–20 нм. Отметим, что на сегодняшний день сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) является одним из основных методов исследования и диагностики наноструктур.

Следует отметить, что при исследовании параметров квантово-размерных структур, помимо размеров и формы, существенно важным является определение их химического состава, молекулярной структуры, что возможно осуществить методами оптической спектроскопии. Как известно, разрешающая способность оптического микроскопа имеет ограничение, обусловленное волновой природой света [160,161]. В рассмотрении классической оптики, если имеются два точечных источника света, расположенных на расстоянии меньшем чем некоторое критическое, то их изображения будут перекрываться, так что их невозможно будет пространственно идентифицировать. Такое критическое расстояние определяется как дифракционный предел и вычисляется по формуле  $d = 0,61\lambda/N_A$ , где  $N_A = n \sin(\alpha/2)$  -числовая апертура оптической системы. Ввиду зависимости разрешения микроскопа от показателя преломления, широкое распространение нашли схемы иммерсионной микроскопии, в которых подбираются специальные жидкие среды с большим показателем преломления, что позволяет достичь разрешения около 200 нм в латеральной плоскости и 500 нм -в аксиальной . Очевидно, что такое разрешение оптического микроскопа недостаточно для детального изучения процессов и структур на нанометрическом уровне. Указанная проблема важна также в биологии, для исследования таких субклеточных структур, как биологических мембраны, рибосомы, клеточные филаменты, микротрубочки,

размеры которых не превышают 150 нм. Отметим, что необходимого разрешения можно достигнуть с помощью электронной микроскопии, однако она не пригодна для исследования динамических физико-химических процессов в наносистемах, а также, крайне неудобна для работы с живыми клетками из-за высокой разрушающей способности по отношению к биологическим структурам. Также отметим, что особенностью живых клеток является низкий оптический контраст внутриклеточных структур, которые в основном прозрачны в видимой области спектра. Данное обстоятельство вызывает необходимость специфического окрашивания исследуемых биосистем, в том числе с применением различных флуоресцентных маркеров. При этом, флуоресцентная микроскопия сочетает в себе сразу несколько преимуществ. Это, в первую очередь возможность селективного исследования отдельных биологических систем. Во-вторых, возможность одновременного изучения нескольких объектов ввиду наличия разнообразия флуоресцентных красителей и белков и возможности их одновременного использования. И наконец, возможно осуществить изучения объектов “*in vivo*”, при котором возможно проводить исследования биологических процессов в реальном времени.

Другое направление оптической микроскопии, которая позволяет преодолеть дифракционный предел -это ближнепольная сканирующая микроскопия ( БСОМ ) [162-166]. В схеме БСОМ основной инновацией было изготовление оптической апертуры, локализованной на вершине заостренного оптического волокна-зонда, покрытого тонким слоем металла. При этом размеры апертуры меньше чем длина волны излучения. Такая конфигурация, обеспечивающая разрешение  $\approx \lambda/20$ , используется в исследованиях наноструктур, для исследования оптического отклика одиночных молекул, наноразмерных (порядка сотен нанометров) элементов памяти и т.д. Следует отметить, что пространственное разрешение данной схемы определяется размерами апертуры, которая ограничена, в конечном итоге, толщиной нанесенного на заостренное кварцевое волокно металлического покрытия. К тому же, такая схема трудно применима для исследования трехмерных биологических объектов, так как с увеличением толщины объекта оптический сигнал от разных слоев будет затруднять интерпретацию изображения. Известно несколько методов микроскопии дальнего поля, значимость которых в первую очередь определяется заметным улучшением разрешения вдоль оси Z. В первую очередь отметим конфокальную микроскопию, в которой применяется сверхмалая апертура расположенная в фокальной плоскости объектива и пропускающая свет только от объектов, находящихся непосредственно в фокусе лазерного пучка [167,168]. Достигнутое на сегодняшний день наилучшее пространственное разрешение для конфокального лазерного микроскопа порядка

~30нм. Известна также схема так называемой 4Pi-микроскопии, в которой используются два объектива для возбуждения и регистрации флуоресценции с двух сторон от образца, что обеспечивает разрешение вдоль оптической оси порядка 100 нм [169,170].

Разрабатываются также схемы многофотонной нелинейной безапертурной микроскопии, основанные главным образом на явлениях многофотонной флуоресценции и генерации оптических гармоник [171-174]. К примеру, в двухфотонной схеме флуоресцентные маркеры или органические молекулы, в основном поглощающие ультрафиолетовое излучение в спектральной области 300-400 нм, могут быть возбуждены двумя более длинноволновыми фотонами с длиной волны 600-800 нм; при этом уровень оптического отклика зависит от квадрата интенсивности возбуждающего излучения. Очевидно, в таких схемах для возбуждения нелинейного оптического сигнала требуется достаточно высокоинтенсивное зондирующее излучение. Наконец отметим еще одно из перспективных направлений, разработанное в последние годы, и позволяющее определить точное положение флуоресцирующих молекул - микроскопию STED (Stimulated Emission Depletion) [175-177]. Данная методика основана на тушении флуоресценции флуорофоров, расположенных в периферийной части области светового возбуждения; при этом исследуемый образец освещается вспомогательным высокоинтенсивным лазером с пространственным распределением интенсивности в виде «бублика», с нулевой интенсивностью в центре пучка. В области, где образец освещается световым «бубликом», происходит тушение люминесценции флуорофоров, в результате полезный сигнал флуоресценции исходит только от молекул, расположенных в непосредственной близости от центральной точки облучения. Микроскопы, основанные на методе STED, позволяют достичь субдифракционного разрешения, рассчитываемое по формуле [178]:

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \alpha \times \left(1 + \frac{I^{\max}}{I^{\text{sat}}}\right)^{1/2}}$$

где  $I^{\max}$  - интенсивность STED-лазера,  $I^{\text{sat}}$  - интенсивность, которая необходима для обеспечения вынужденного излучения на уровне 50%.



### §3.1. Схема реализации комбинированного зондового микроскопа сверхвысокого оптического разрешения

Как отмечалось выше, сканирующий туннельный микроскоп является одним из основных инструментов исследования наноструктур. Принцип работы туннельного микроскопа (ТМ) предполагает создание и поддержание сверхмалого зазора  $Z$  ( $\sim \text{Å}$ ) между твердотельным острием с радиусом кривизны нанометрового масштаба и поверхностью исследуемого образца. Столь малая величина зазора обеспечивает возникновение туннельного тока при приложении к нему напряжения смещения  $U_{\text{см}}$  (мВ÷В). В ТМ при напряжении между игольчатым электродом и подложкой 5В и зазоре между ними 0.5 нм возникают электрические поля приблизительно  $10^8$  В/см. Особенностью таких полей являются их локальность (области охватывают поверхности подложек с нанометровым и менее поперечным сечением) и низкие приложенные напряжения, еще не вызывающие ионизацию молекул и атомов в межэлектродном зазоре.

Нами предложена новая схема комбинированной микроскопии с совмещением особенностей туннельной и оптической микроскопии [179]. Известно [180], что величина напряженности электрического поля  $E$  точечного заряда  $Q$ , находящегося на расстоянии  $h$  от бесконечно большой плоскости проводника (рис.3.1), описывается выражением:

$$E = -2Qh / (r^2 + h^2)^{3/2} \quad (1)$$

где  $r$  – расстояние от точки  $O$  на плоскости проводника.

Из формулы (1) видно, что напряженность поля  $E$  убывает (нелинейно) с возрастанием  $r$ . Оценки показывают, что уже при  $r = h/2$  величина  $E$  уменьшается на 30% от  $E_{\text{max}}$ . Таким образом, даже при линейной ( $\sim kE$ ) зависимости регистрируемого оптического сигнала, область локализации высоких значений напряженности поля  $E$  определяется площадью порядка  $S_{\text{лок}} \approx h^2/4$ . С другой стороны, для ряда веществ при проникновении в глубь материалов электрическое поле резко убывает. Так, например, для полупроводниковых подложек внешнее электрическое поле проникает в объем полупроводника, экспоненциально убывая, а это означает, что область с большой величиной  $E$  локализована в некотором локальном объеме полупроводника.

Таким образом, оптический сигнал из такой области будет содержать информацию и о локальных свойствах исследуемого образца. Например, характерную информацию может содержать спектральный сдвиг, обусловленный эффектом Штарка, который легко детектируется уже при значениях  $E$ , порядка  $3 \cdot 10^5$  В/см [181]. Так как принцип работы

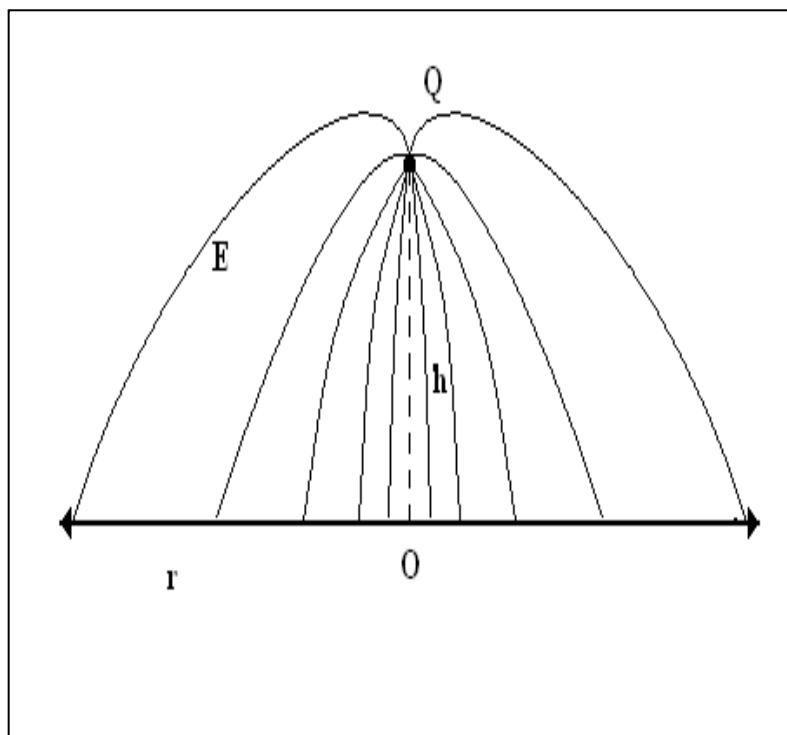


Рис.3.1. Конфигурация электрического поля точечного заряда вблизи проводящей поверхности

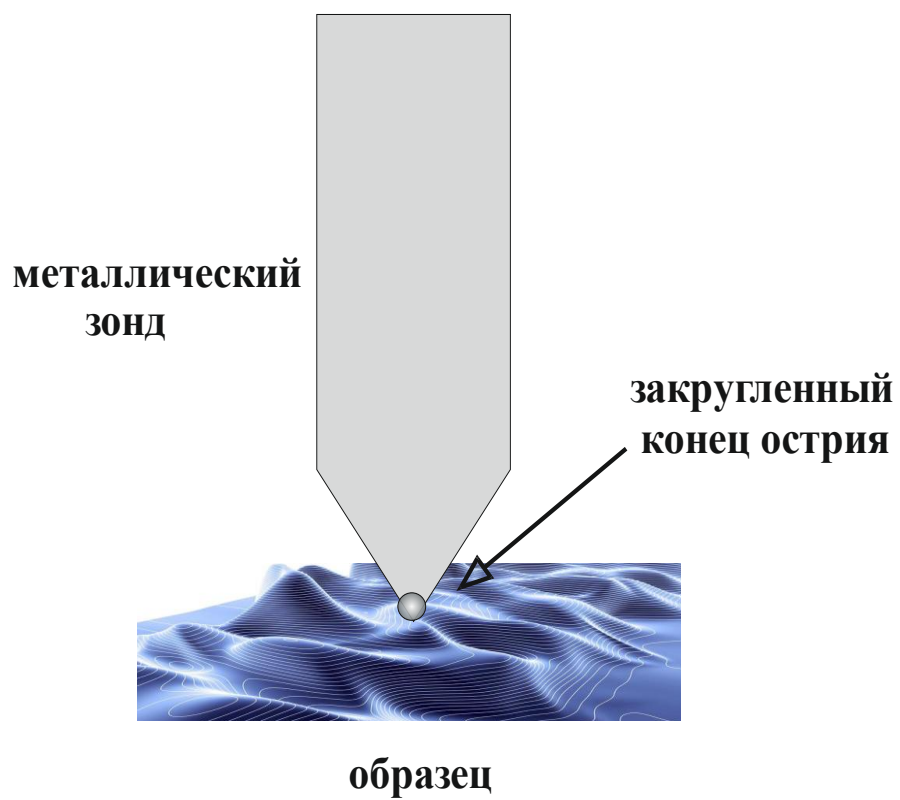


Рис. 3.2. Металлическая наносфера в качестве острия зонда имеющего радиус кривизны нанометрового масштаба.

туннельного микроскопа включает в себя механическую манипуляцию заряженным металлическим острием с радиусом кривизны нанометрового масштаба над поверхностью исследуемого образца (Рис.3.2), 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.

Отметим здесь, что в настоящее время существуют схемы реализаций сканирующей ближнеполевой микроскопии, где в качестве острия зонда используются не цельные заостренные металлические острия, а именно наночастицы, прикрепленные к плоской поверхности конечной части зонда. В параграфе 3 второй главы было детально рассмотрено влияние заряженной сферической металлической наночастицы (с единичным зарядом  $z = 1$ ) на спектральные свойства кремниевой наночастицы, где штарковский сдвиг энергетических уровней был оценен порядка 0.2эВ (30нм). С использованием того же аналитического подхода и формулы (6) для вычисления величины  $\Delta E_1$ :

$$\Delta E_1 = \frac{Deq}{R_q^2} \frac{3}{\epsilon + 2} \left( \frac{\langle z_h \rangle - \langle z_e \rangle}{D} \right)$$

можно рассчитать изменение величины штарковского сдвига при увеличении расстояния от исследуемого образца (Рис.3.3). Как видно из рисунка, при удалении от поверхности образца на дистанцию в 1нм, величина штарковского сдвига уменьшается в два раза и для случая кремниевого материала образца спектральный сдвиг составляет  $\approx 15$ нм. Такое значение 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. Отметим также, что в вычислениях мы рассматривали влияние минимального единичного заряда  $z = 1$ . Оптические отклики от исследуемой наномасштабной области могут быть линейной и нелинейной природы:

- сигналы второй и третьей гармоник
- сигналы однофотонной и многофотонной флуоресценции
- сигналы комбинационного рассеяния

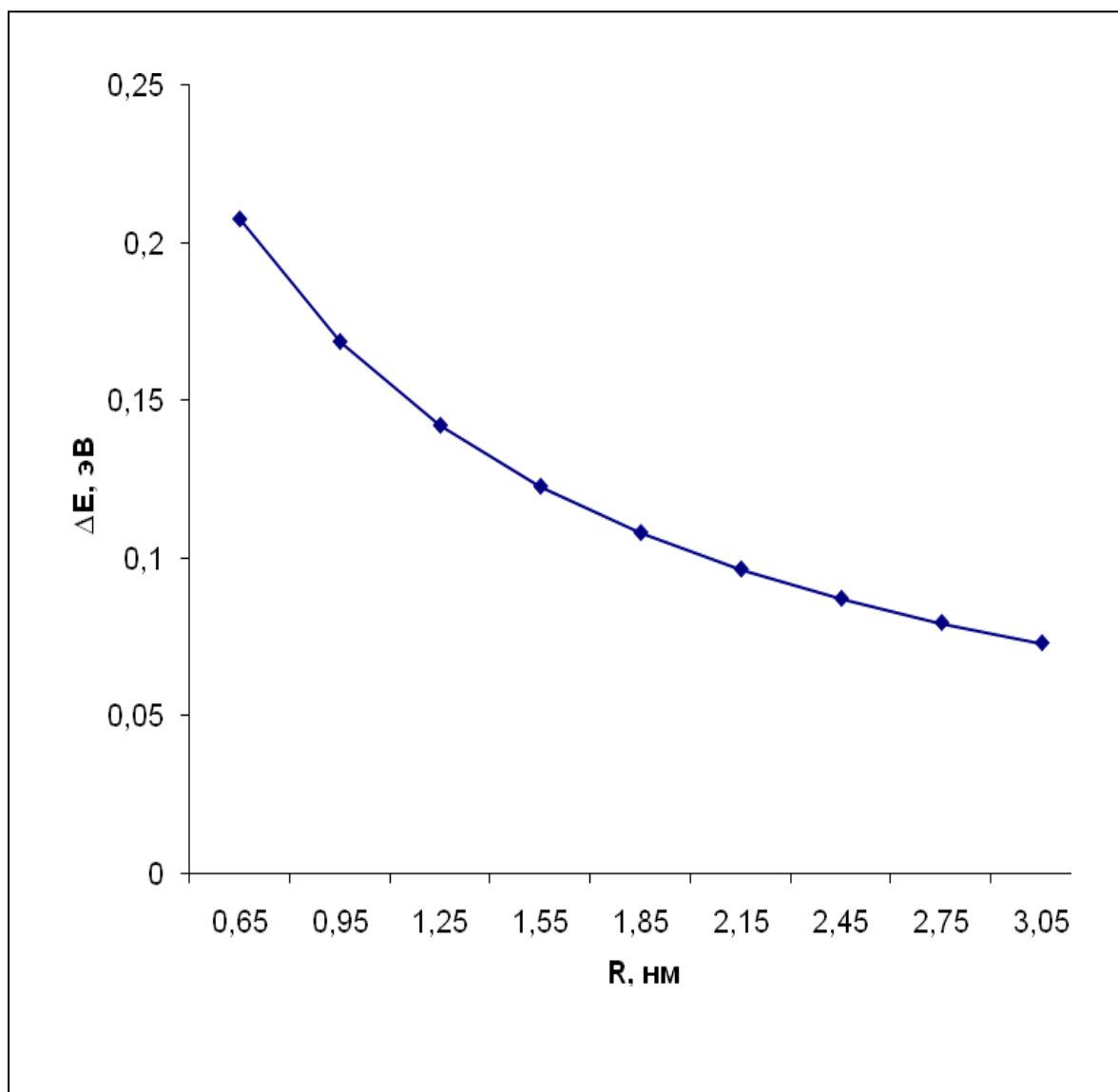


Рис. 3.3. Изменение величины штарковского сдвига при удалении от поверхности исследуемой области образца.

Соответственно, так как спектральный состав детектируемого оптического сигнала определяется тем, какой конкретный химический элемент находится в нанолокализованной области, а также структурой нанообъекта, то предлагаемая схема комбинированной микроскопии обладает значительно расширенными аналитическими возможностями. При этом, становится принципиально возможной реализация оптической микроскопии с пространственным разрешением в единицы нанометров, так как в предлагаемой схеме разрешение определяется уже не оптическими элементами, возможности которых существенно ограничены дифракционным пределом, а исключительно наноразмерной геометрией туннельного зазора.

С другой стороны, подавляющее число туннелирующих электронов образуют некую токовую "трубку". Эта трубка берет начало от наиболее близко расположенного к образцу атома острия зонда и "упирается" в ближайшую к нему область на поверхности. Диаметр такой трубки, а, следовательно, и "пятна - области" на исследуемом образце, ангстремного порядка (рис.3.4). Сверхплотный пучок энергетических электронов из игольчатого электрода может вызвать на подложке локальный разогрев. Локальное повышение температуры по радиусу вдоль поверхности от оси пучка для изотропных подложек можно оценить по формуле:

$$\delta T(r) = \frac{UI}{4\pi k l} \left( 2 \frac{l}{r} \left( 1 - e^{-r/l} \right) - e^{-r/l} \right).$$

где  $U$  - напряжение, приложенное к электродам;  $I$  - туннельный ток;  $k$  - коэффициент термической проводимости подложки;  $l$  - длина неупругого рассеяния электронов в подложке.

Электростатическое поле порождает также нормальное к поверхности электродов механическое напряжение, которое может быть достаточным для локальной пластической деформации металлической подложки [182]. При этом, более жесткий игольчатый электрод может оставаться неизменным. Эта наведенная механическая напряженность, в свою очередь, модулирует и электронно-оптическую структуру локальной области исследуемого образца.

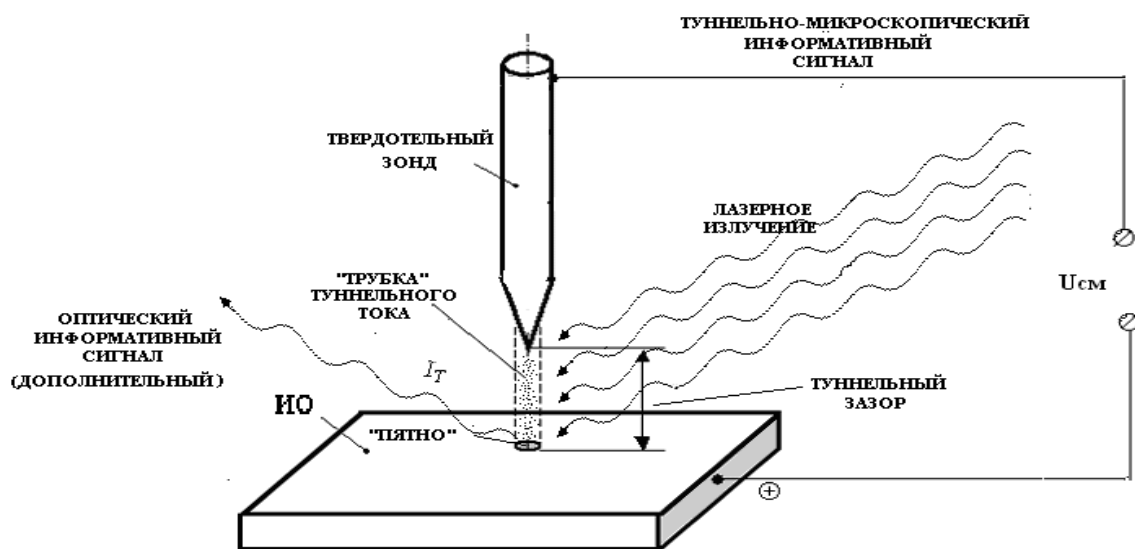


Рис.3.4. Схематическое изображение комбинированной оптико-туннельной микроскопии с локализованной областью считывания оптического сигнала.

Таким образом, совмещение в одном устройстве с одной стороны – техники, создающей специфичное условие туннельной микроскопии, обеспечивающее (латеральное) выделение области субнанометрического масштаба на поверхности исследуемого образца, а с другой стороны – регистрация высокоинформативного специфичного оптического сигнала именно из этой области, предоставит возможность многоплановых наноисследований.

С этой целью разработан адаптированный к соответствующей лазерной технике и реализующий необходимую зондово-туннельную конфигурацию исследовательский стенд [183, 184]. Стенд формируется совмещением лазерной техники с электромеханической конструкцией для прецизионных перемещений, их электронных блоков и компьютера, с соответствующей программой управления, обработки и отображения информации. Если для обеспечения электромеханики необходимыми сигналами в стенде используется электронный блок опытного лабораторного туннельного микроскопа, то программное обеспечение должно быть доработано с учетом наличия и оптико-электронных сигналов.

Оригинальной и наиболее важной частью стенда является электромеханика прецизионного позиционирования. Она должна обеспечивать предварительный вертикальный подвод твердотельного зонда к исследуемой поверхности на расстояние (десятки нм), при котором появляется туннельный ток, и, в перспективе, латеральное сканирование поверхности. Этот регистрируемый ток – один из информативных каналов стенда, одновременно запускает и электронную систему отслеживания постоянства предварительно заданной величины туннельного тока, а значит и зондово-туннельного зазора. Конструкция электромеханики обеспечивает моторизованный вертикальный подвод зонда к поверхности образца. Такая архитектура обеспечивает возможность необходимого сравнительно легкого доступа к туннельному зазору и проведение соответствующих исследований. На Рис.3.5 приведено схематическое изображение конструкции электромеханической части стенда. Прецизионный подвод игольчатого зонда к поверхности ИО осуществляется посредством шагового двигателя (ШД), оснащенного разработанным самодельным редуктором-преобразователем вращения вала ШД в поступательное движение. Этот двигатель грубого подвода/отвода обеспечивает шаг около 220нм. Он, в сочетании с разработанным алгоритмом сближения (веденным как подпрограмма в открытом к доступу LabVIEW-программное обеспечение стенда) надежно позволяет формировать необходимый зондово-туннельный зазор. Созданный предварительный усилитель (ПУ) преобразовывает туннельный ток (от сотых долей до нескольких нА) в напряжение. Электрическая схема такова, что позволяет держать зонд под потенциалом земли.





Для тонкого позиционирования относительно зонда предметного столика с закрепленным на нем образце использован трубчатый пьезосканер фирмы НТ МДТ (Зеленоград). Сам зонд крепится на пьезомодуляторе зазора. Станина изготовлена из стекло-текстолита, а подставка — из кварцевого стекла. Введение в конструкцию магнитных фиксаторов ШД и пьезомодулятора зазора позволяет вручную легко проводить исходное позиционирование зонда относительно поверхности ИО. Работа стенда управляется созданной соответствующей LabVIEW -программой. Использование этой программной среды и незакрытого кода, позволяет в ходе исследований оперативно корректировать логику экспериментов, что безусловно расширяет исследовательские возможности стенда. С учетом того, что прецизионная электромеханическая часть содержит почти все необходимые для зондовых микроскопов функциональные узлы, в настоящее время проводится работа по модернизации его, электронной и программной части исследовательского стенда. Это приведет к разработке и конструированию сканирующего туннельного микроскопа «ручного» лабораторного изготовления. Одновременно, нами собран и функционирует твердотельный лазер с пикосекундной длительностью импульсов. Совмещение этих двух устройств позволит нам в обозримом будущем в полной мере реализовать схему комбинированного лазерно-туннельного микроскопа сверхвысокого пространственного разрешения.

### §3.2. Неординарные оптические свойства кристалла $MgF_2$ как метаматериала

Наблюдающийся в последнее время большой интерес к средам с одновременно отрицательными диэлектрической и магнитной проницаемостями [185–190] имеет как теоретический аспект, так и прикладной. Степень взаимодействия поля электромагнитной волны определяется двумя характеристиками вещества: диэлектрической проницаемостью  $\epsilon$  и магнитной проницаемостью  $\mu$ . Оптические свойства вещества характеризуются показателем преломления  $n$ , который связан с  $\epsilon$  и  $\mu$  простым соотношением:  $n = \pm\sqrt{\epsilon\mu}$ . Для всех известных материалов перед квадратным корнем должен стоять знак «+», и поэтому их показатель преломления положителен. Однако в 1968 г. Веселаго теоретически рассмотрел гипотетическое вещество с отрицательным преломлением  $n$ , при этом полагая что  $\epsilon$  и  $\mu$

одновременно отрицательны [185]. Однако у всех известных веществ показатель преломления положителен и за нескольких лет интенсивных поисков Веселаго не нашел ни одного материала с подходящими электромагнитными свойствами. Только лишь благодаря последним достижениям в области материаловедения интерес к таким средам вновь возродился, в частности, когда была продемонстрирована [191] возможность искусственного создания подобных сред. В работах [192,193] отмечается возможность создания плоской линзы на основе такой специфичной среды. Подробный теоретический анализ взаимодействия источника как ближнего, так и дальнего поля с линзой из метаматериала показал, что такая линза, может фокусировать как ближние, так и дальние поля [193, 194], то есть, в отличие от оптической линзы из традиционных материалов, не подчиняется дифракционному пределу. Вследствие неординарных оптических свойств, обусловленных отрицательным преломлением, такую плоскую фокусирующую систему назвали суперлинзой. В 2004 г. Э. Грбич и Д. Элефтериадес из Университета Торонто экспериментально показали, что метаматериал, сконструированный так, чтобы иметь  $\epsilon = -1$ , и  $\mu = -1$  в диапазоне радиочастот, действительно может разрешить объекты в масштабе меньшем, чем дифракционный предел [195]. В 2005 г. К. Соуколис из университета штата Айова и М.Вегенер из университета Карлсруэ экспериментально продемонстрировали [196], что можно сделать метаматериал пригодный для длин волн в инфракрасном диапазоне (1,5 мкм), несмотря на то, что при столь малых длинах волн резонанс на магнитной компоненте поля становится весьма слабым.

В настоящее время пока еще не сконструирован материал, который при длинах волн видимого света имеет  $\mu = -1$ . Однако отметим, что при расстоянии между объектом и изображением намного меньшим, чем длина волны, необходимо выполнение только лишь условия  $\epsilon = -1$ , а значением  $\mu$  можно пренебречь. Группа Р. Блэйки из университета Кентербери в Новой Зеландии и группа К. Джанга из Калифорнийского университета в Беркли, продемонстрировали сверхразрешение в оптической системе [197,198]. При оптических длинах волн собственные резонансы металла могут приводить к отрицательной диэлектрической постоянной. Поэтому очень тонкий слой металла при длине волны, где  $\epsilon = -1$ , может действовать как суперлинза. И Блэйки, и Джанг использовали слой серебра толщиной около 40 нм, чтобы получить изображение пучков света с длиной волны 365 нм, испускаемых сформированными отверстиями, меньшими, чем длина волны света. Отметим, что плоские линзы могут быть созданы также при использовании других типов сред, а именно, из немагнитных анизотропных оптически одноосных кристаллов, у которых одна из компонент диэлектрического тензора положительна, другая—отрицательная.

Кристаллы, имеющие разные знаки компонент диэлектрического тензора  $\varepsilon_{ij}$ , в силу открытого характера ПВВ, обладают рядом неординарных оптических свойств [199]. Показано, в частности, что поверхность волновых векторов (ПВВ) у них имеет необычный вид, а именно, является не замкнутой поверхностью, а открытой. Другой особенностью такой среды является специфичная взаимная ориентация волнового вектора и вектора Пойнтинга [200], что и дает возможность фокусировки пучка с помощью плоскопараллельной пластины. Отметим, что, как показано в [201,202], в определенной спектральной области разные знаки компонент диэлектрического тензора имеют некоторые природные материалы, например, кристаллы  $\text{MgF}_2$ ,  $\text{KMgF}_2$  и  $\text{TiO}_2$ .

В связи с этим были изучены оптические свойства кристалла  $\text{MgF}_2$  [203-206], обусловленные присутствием отрицательной компоненты у  $\varepsilon'_{ij}$  (штрихом обозначена действительная часть) и, следовательно, открытого характера ПВВ.

Для выявления особенностей отражения от поверхности кристалла  $\text{MgF}_2$  были проведены измерения коэффициента отражения, которые проводились на спектрофотометре «Specord» М-80 в спектральной области  $(200 \div 800) \text{ см}^{-1}$ . Ориентированные образцы кристалла  $\text{MgF}_2$  были вырезаны в форме плоскопараллельных пластин толщиной 1 мм.

На Рис 3.7 приведен частотный спектр коэффициента отражения в области от 200 до  $800 \text{ см}^{-1}$  в случае, когда оптическая ось перпендикулярна поверхности кристалла и угол падения  $\vartheta=20^\circ$ . На Рис.3.8. представлены результаты, аналогичные Рис.3.7. но при угле падения  $70^\circ$ . Штриховкой над осью частот показаны области, в которых  $\varepsilon'_\perp < 0$ , а под осью частот - области, в которых  $\varepsilon'_\parallel < 0$  ( $\varepsilon_\parallel, \varepsilon_\perp$ - компоненты диэлектрического тензора вдоль оптической оси и в перпендикулярном направлении соответственно). В обоих случаях коэффициент отражения в областях где  $\varepsilon'_\perp < 0$ , становится намного больше, чем в средах с закрытой волновой поверхностью. Рис. 3.9 соответствует случаю, когда  $\vartheta=20^\circ$ , а оптическая ось лежит в плоскости поверхности кристалла. При этом частота фиксирована, а угол  $\psi$  между оптической осью и линией пересечения поверхности кристалла с плоскостью падения меняется в пределах от 0 до  $\frac{\pi}{2}$ . С увеличением  $\psi$  коэффициент отражения, в отличие от обычных сред с положительным  $\varepsilon'$ , убывает.

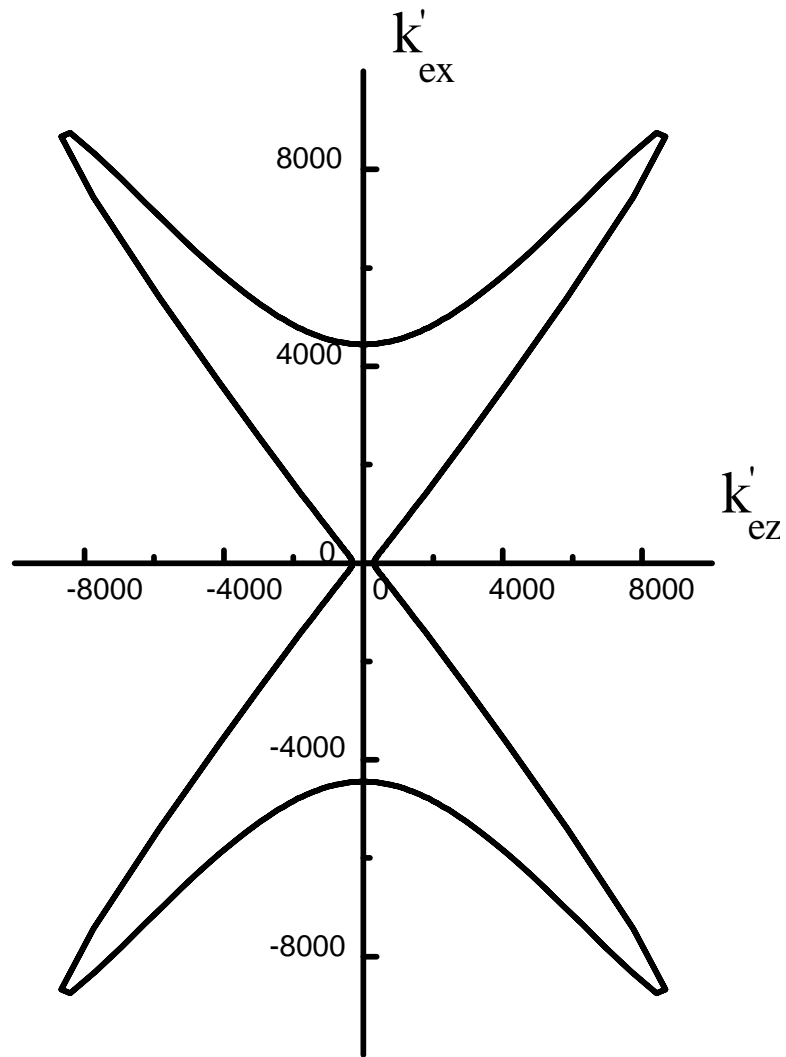


Рис.3.6. Сечение поверхности волновых векторов однородных необыкновенных волн в кристалле плоскостью, проходящей через оптическую ось. Частота падающей волны  $\omega = 270\text{см}^{-1}$ ,  $\varepsilon'_{\perp} = -7,309$ ,  $\varepsilon''_{\perp} = 0,998277$ ,  $\varepsilon'_{\parallel} = 6,862$ ,  $\varepsilon''_{\parallel} = 0,297$ .  $\vec{k}'_e$ ,  $\vec{k}''_e$  - действительная и мнимая части волнового вектора.

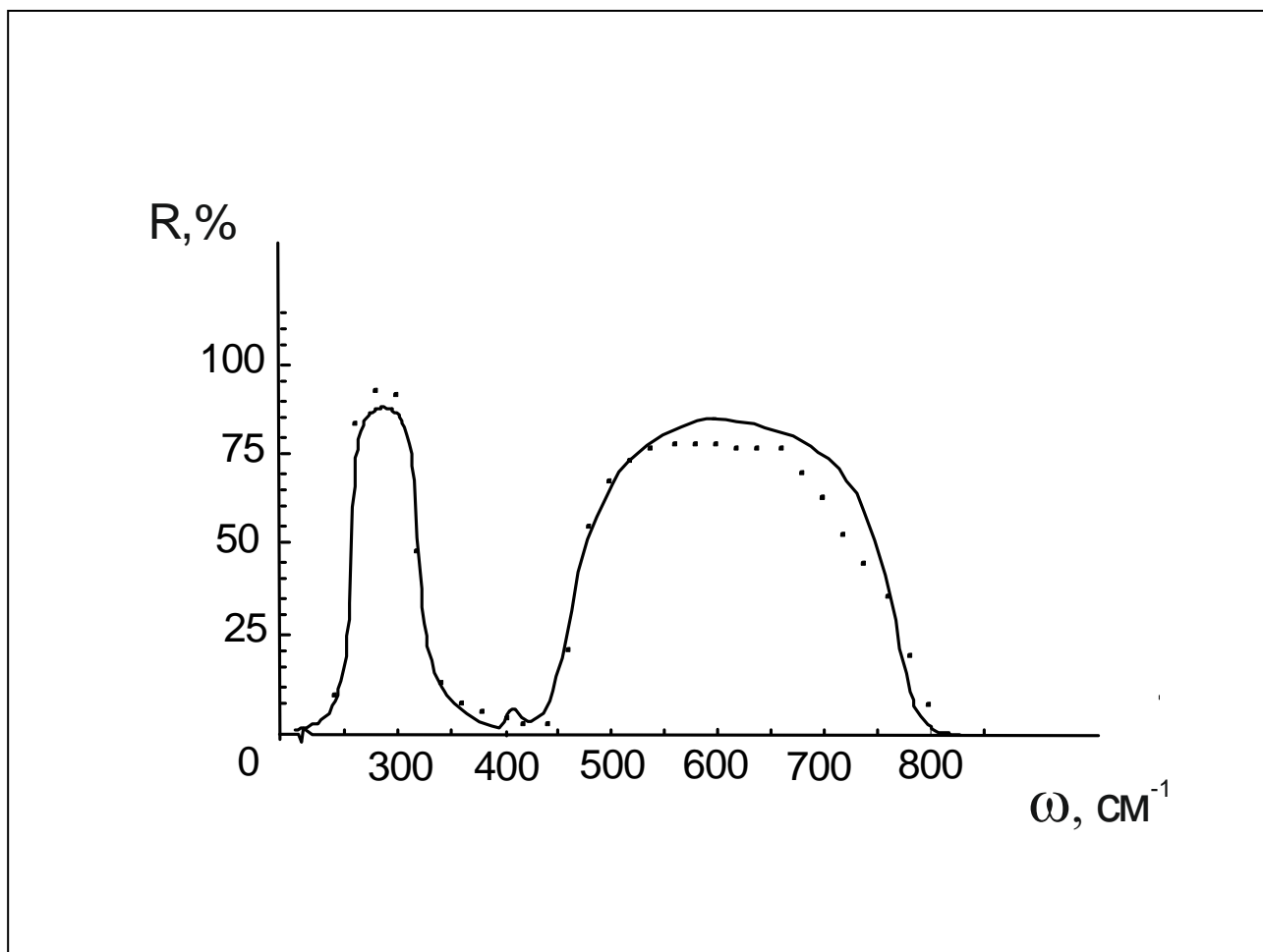


Рис.3.7. Частотная зависимость коэффициента отражения для кристалла при угле падения  $\theta=20^\circ$ . Точками указаны экспериментальные значения, сплошная линия – расчетная кривая. Оптическая ось кристалла перпендикулярна его поверхности.

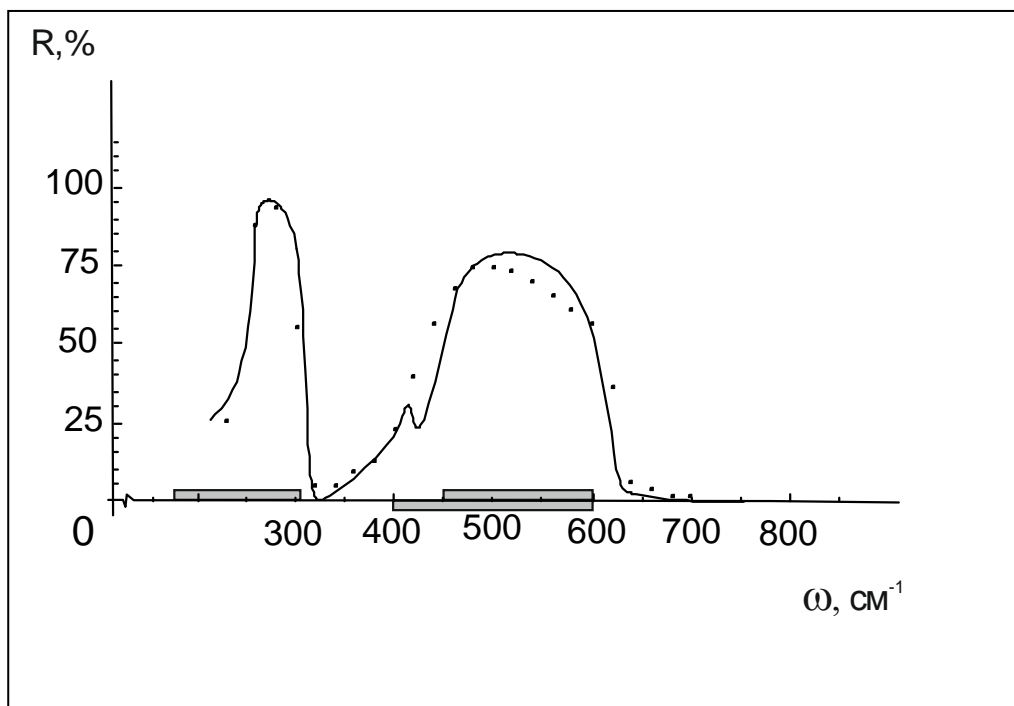


Рис.3.8. Частотная зависимость коэффициента отражения для кристалла при угле падения  $\vartheta=70^\circ$ . Точками указаны экспериментальные значения, сплошная линия – расчетная кривая. Оптическая ось кристалла перпендикулярна его поверхности.

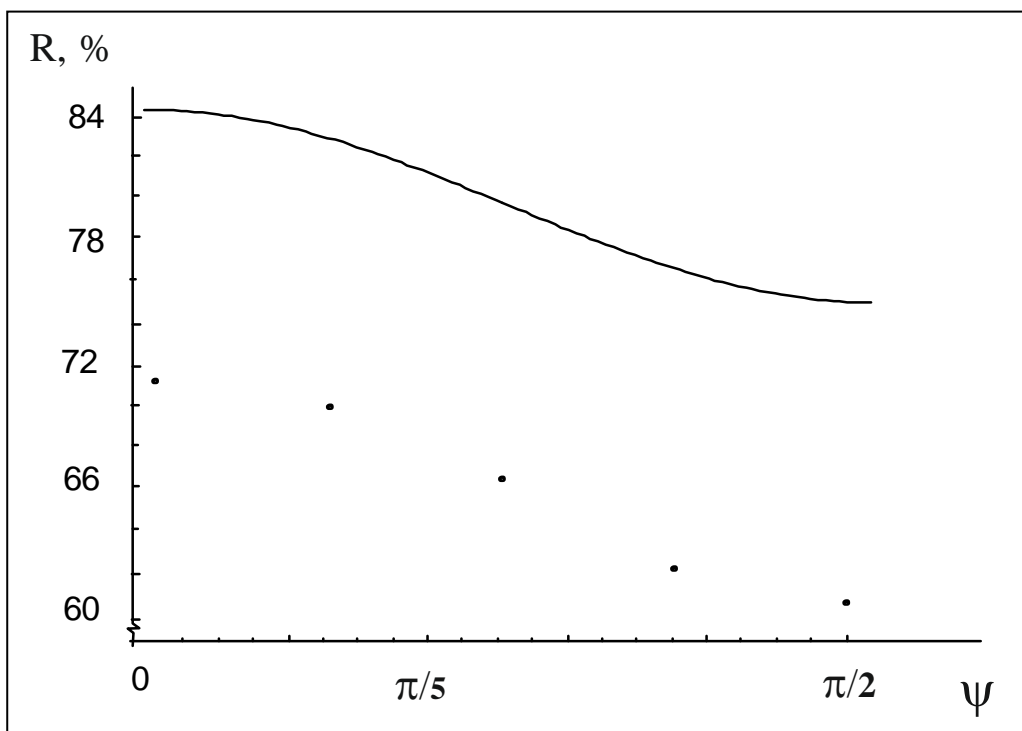


Рис.3.9. Зависимость коэффициента отражения  $R$  от угла  $\psi$  между оптической осью кристалла (лежащей в плоскости ее границы) и линией пересечения плоскости падения с поверхностью кристалла. Точками указаны экспериментальные значения, сплошная линия - расчетная кривая. Частота падающей волны  $\omega = 500\text{см}^{-1}$ ,  $\varepsilon'_{\perp} = -3,7228$ ,  $\varepsilon''_{\perp} = 1,28$ ,  $\varepsilon'_{\parallel} = -2,7819$ ,  $\varepsilon''_{\parallel} = 0,4937$ .



### §3.3. Возможности микроскопии сверхвысокого оптического разрешения с использованием метаматериалов

В работе [200] была показана возможность фокусировки излучения плоскопараллельной пластиной из кристалла  $MgF_2$ . Пусть световой источник  $A$  находится на расстоянии  $OA = h_1$  от границы раздела (Рис.3.10). Точка пересечения  $B$  преломленного луча с нормалью к границе будет находиться на расстоянии

$$OB = h_2 = h_1 \frac{tg \alpha}{tg \beta}.$$

Из граничных условий задачи прохождения плоской монохроматической волны через пластинку и отражения от нее:  $a_{ij} E_j = A_i, i, j = 1, 2, 3, 4$ , получено выражение [200]:

$$tg \beta = \frac{|S_{ez}|}{|S_{ex}|} = \frac{\left| \frac{\varepsilon_{\perp}}{\varepsilon_{\parallel}} \right|^2 \left( \varepsilon'_{\parallel} k'_x + \varepsilon''_{\parallel} k''_x \right)}{k'_{ez} \varepsilon'_{\perp} + k''_{ez} \varepsilon''_{\perp}}.$$

Имея в виду, что в описанной схеме после преломления распространяется лишь необыкновенная волна ( $k''_x = 0$ ), получаем:

$$\frac{tg \alpha}{tg \beta} = \frac{|\varepsilon_{\parallel}|}{|\varepsilon_{\perp}|} \frac{\sqrt{\varepsilon_{\perp} \left( 1 + \frac{\sin^2 \alpha}{|\varepsilon_{\parallel}|} \right)}}{\sqrt{1 - \sin^2 \alpha}}. \quad (15)$$

Это выражение при малых углах  $\alpha$  меняется чрезвычайно мало, и только в значениях четвертого знака после запятой, что иллюстрировано на Рис.3.12., где представлена зависимость  $tg \alpha / tg \beta$  от  $\alpha$ . Из-за такого поведения отношения  $tg \alpha / tg \beta$ , практически неизменно расстояние  $h_2$  до точки, т. е., оно чрезвычайно слабо зависит от  $\alpha$ , и в результате, излучение будет собираться в точке  $B$ . Таким образом, имеет место фокусировка пучка с малым растром  $\alpha$  при его преломлении на плоской границе одноосного кристалла с открытой ПВВ.

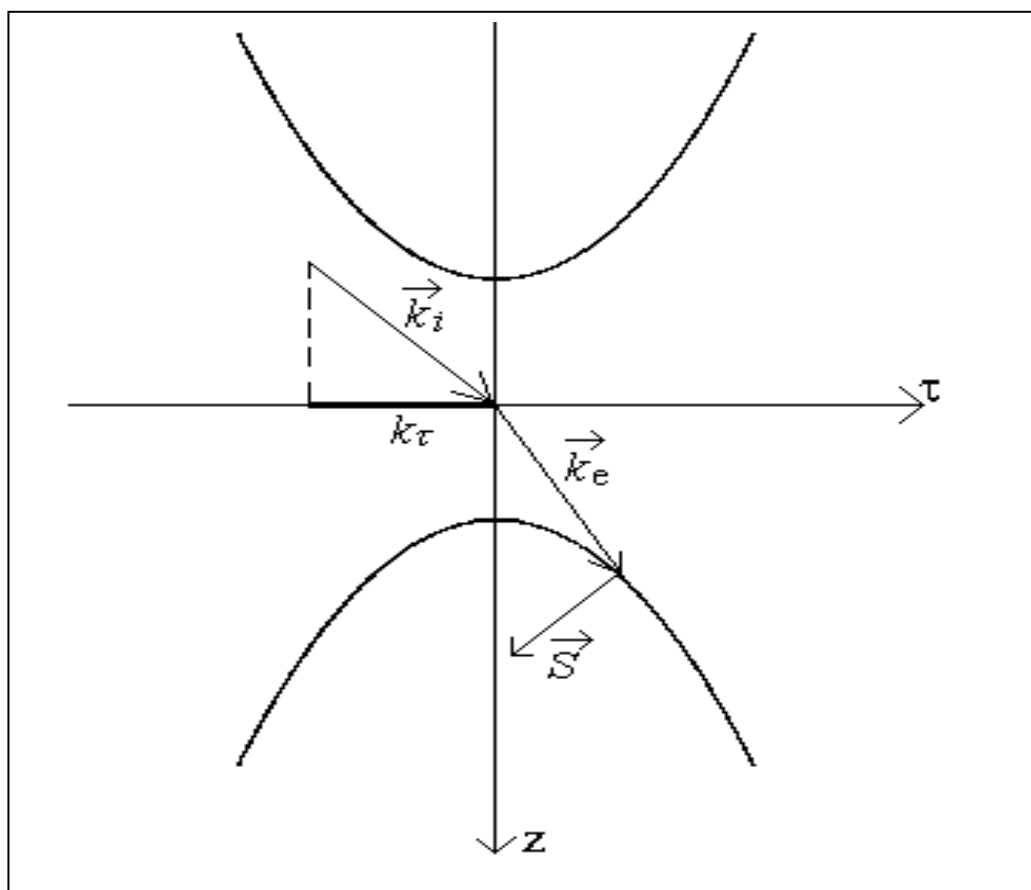


Рис.3.10. Взаимные расположения волнового вектора и вектора Пойнтинга для кристалла с открытой ПБВ.

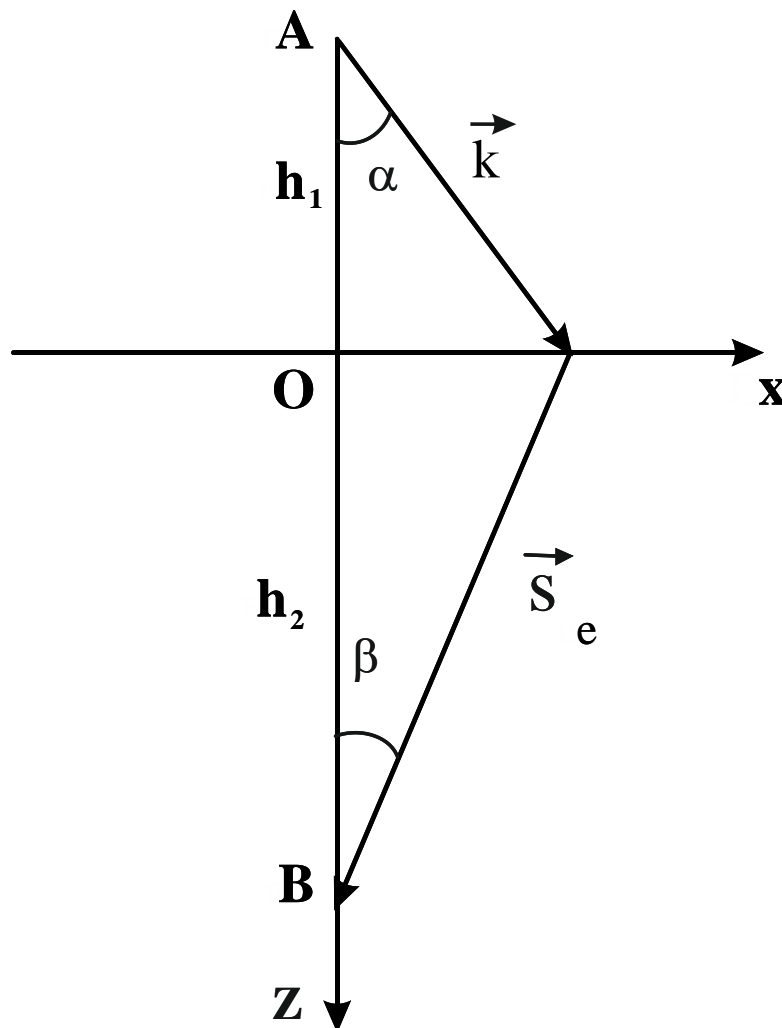


Рис.3.11. Фокусировка пучка, падающего из точечного источника **A** на плоскую границу кристалла **OX**.  $\vec{k}$  и  $\vec{S}$  – соответственно направления фазовой скорости и распространения энергии в кристалле.

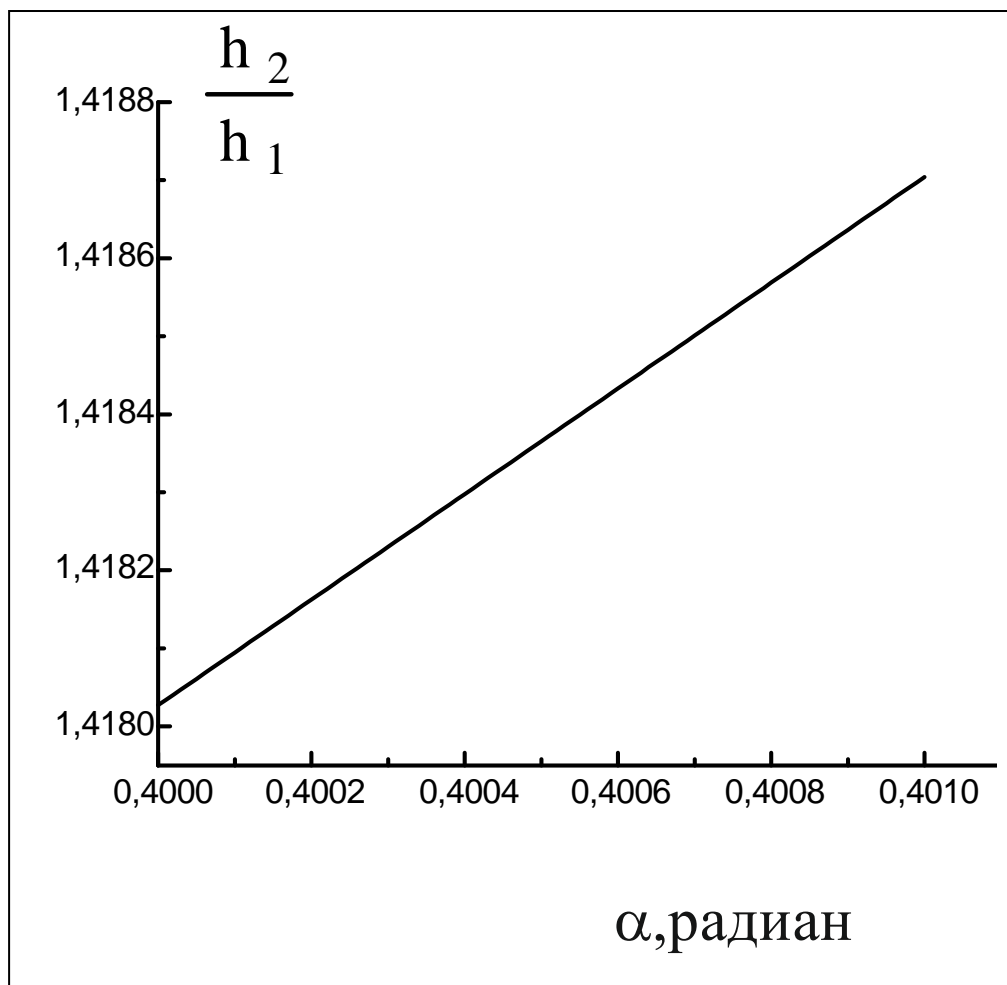


Рис.3.12. Зависимость отношения  $h_2/h_1$  от угла падения.

Параметры кристалла:  $\varepsilon'_{\perp} = 0,042624$ ,  $\varepsilon''_{\perp} = 19,825$ ,  $\varepsilon'_{\parallel} = -7,649$ ,  $\varepsilon''_{\parallel} = 1,90067$ ,  
 частота падающей волны  $\omega = 450\text{см}^{-1}$ .

Отметим, что описанная схема фокусировки происходит, если кристалл вырезан так, что оптическая ось перпендикулярна поверхности кристалла.

Следует заметить, что в материалах, в которых ПВВ представляет собой гиперboloид вращения, при углах падения близких к касательной гиперболы, где волновой вектор увеличивается, а длина волны уменьшается, может быть реализована более качественная фокусировка световых пучков. Соответственно, данное свойство может быть использовано при конструировании оптических микроскопов сверхвысокого разрешения [205,206]. Как известно, при использовании стандартных линз разрешение микроскопа ограничено дифракционными явлениями и в наилучшем случае, если применять критерий Релея, латеральное разрешение составляет порядка  $\lambda/3$ . Разрешение микроскопа определяется из выражения  $p\lambda/N_A$ , где  $\lambda$  -длина волны,  $N_A$  - числовая апертура, а множитель  $p$  зависит от деталей оптической схемы. По аналогичной формуле можно определить размер фокусного пятна гауссовского лазерного пучка, для которого параметр  $p$  равен 1.22. Согласно вышеприведенному выражению, меньшие размеры фокусного пятна, и тем самым качественная фокусировка, может быть достигнута при малых значениях длины волны  $\lambda$ , или же при больших значениях волнового вектора  $\mathbf{k}$ . Как показано на Рис.3.6, в отличие от обычных сред, описываемых эллипсоидом Френеля, в средах с открытой ПВВ можно достигнуть весьма больших значений волнового вектора  $\mathbf{k}$ , в случае если угол  $\alpha$  расположен достаточно близко к касательной гиперболы. Приведенная 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 (Рис. 3.13). На Рис. 3.14. приведена другая схема с использованием радиально поляризованного пучка с кольцеобразным распределением поля в поперечном сечении. В обоих случаях реализуется фокусировка пучка на выходную поверхность пластины, где в соответствии с предлагаемой схемой микроскопа, должен быть размещен исследуемый образец. Качество фокусировки можно оценить из данных Рис.3.12; при этом отметим, что более качественная фокусировка достигается при малых значениях  $h_1$ . Численный расчет точности фокусировки вдоль оптической оси схемы, представленной на Рис.3.14, показывает, что при значении  $h_1 = 0.5$  см и расходимости пучка 1мрад.,  $\Delta h_2$  составляет 0.5 мкм. Так как в расчетах была использована длина волны  $\lambda=5$ мкм, которая расположена в спектральной области, где одна из компонент тензора диэлектрической проницаемости кристалла  $MgF_2$  отрицательна, то в этом случае точность фокусировки составляет  $\lambda/10$ .

Используется точечный источник света и маска кольцеобразной формы.

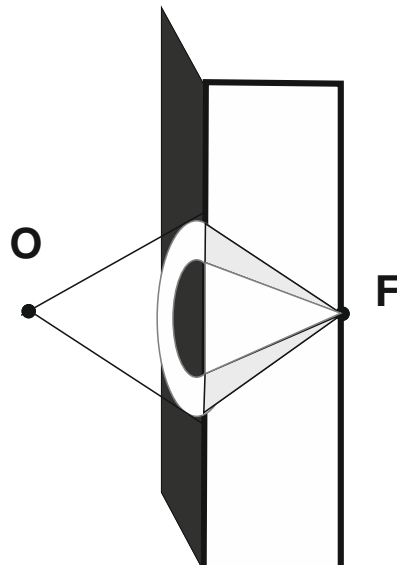


Рис.3.13. Схема микроскопа сверхвысокого разрешения с использованием точечного источника света и маски кольцеобразной формы.

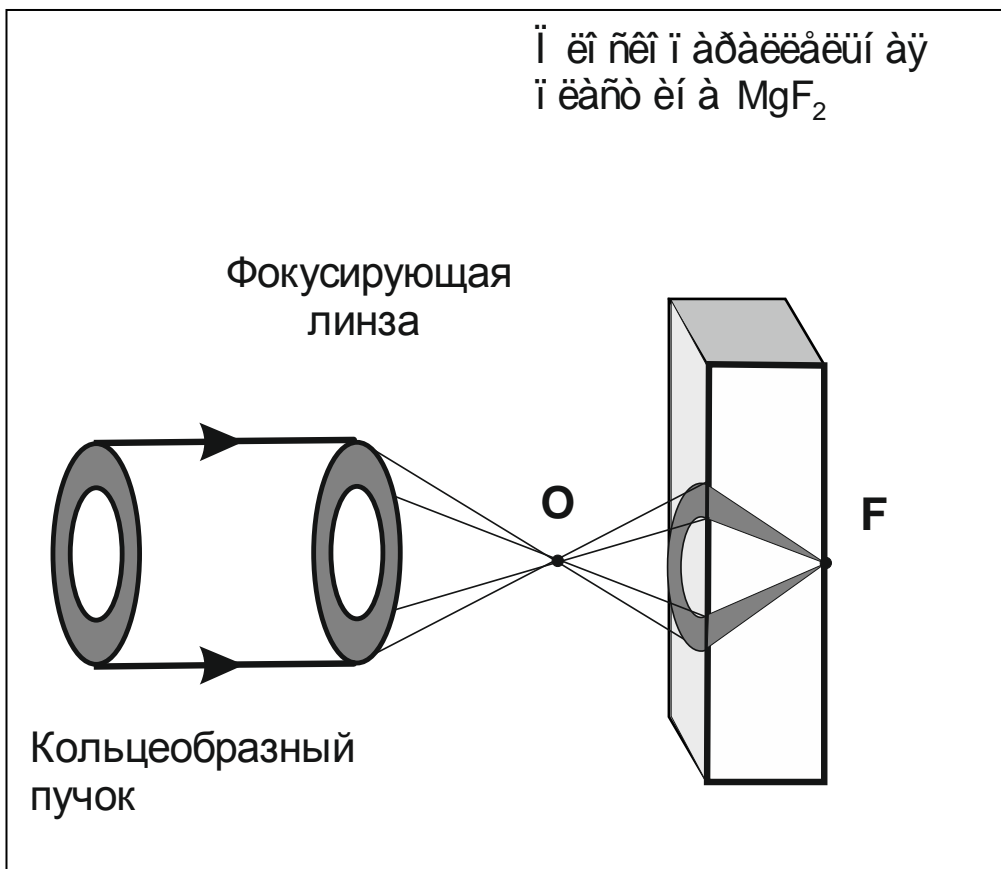


Рис.3.14. Схема микроскопа сверхвысокого разрешения с использованием пучка с кольцеобразным распределением поля в поперечном сечении.

Отметим здесь, что пространственное разрешение вдоль оптической оси стандартного микроскопа составляет еще меньшую величину, чем  $\lambda/3$  и вычисляется по формуле  $d = 2\lambda n/(N_A)^2$ , где  $n$  - коэффициент преломления среды,  $\alpha$  — апертурный угол (угол между оптической осью объектива и наиболее отклоняющимся лучом, попадающим в объектив),  $\lambda$  - длина волны,  $N_A = n \sin \alpha$  - числовая апертура объектива. Как отмечалось выше, наилучшие достигнутые значения пространственного разрешения вдоль оптической оси микроскопа составляет 500нм, т.е. в видимой области составляет  $\sim \lambda$ . Таким образом, в предлагаемой схеме возможно существенное увеличение разрешения оптического микроскопа.

#### **§4. Возможности микроскопии сверхвысокого оптического разрешения с использованием поверхностных волн**

Преодоление дифракционного предела можно осуществить в тех схемах оптической микроскопии, где возможна реализация локализации оптического поля в нанометрической области. Первым решением данной задачи была схема БСОМ, где основной инновацией было изготовление оптической апертуры, локализованной на вершине заостренного оптического волокна-зонда, покрытого тонким слоем металла [207]. Эта конфигурация, включающая схему поддержания постоянного нанометрического зазора, была использована с большим успехом во многих прикладных задачах. Отметим, что разрешение БСОМ принципиально ограничено толщиной слоя напыляемого на поверхность кварцевого светового волокна металла, которое и определяет диаметр апертуры. Кроме того, коэффициент пропускания света в такой схеме чрезвычайно мал - порядка  $10^6$ .

Ввиду наличия таких ограничений были проведены поиски новых методов, для осуществления локализации оптического поля в нанометровой области. В работе [208] предложена схема БСОМ, в которой было предложено использование локализованного поля одной металлической наночастицы, возбужденного в режиме плазмонного резонанса. Новотны и др. [209] была предложена безапертурная схема в которой использовалась усиление поля в непосредственной близости от вершины сверхострого металлического наконечника для возбуждения флуоресценции с помощью двухфотонного возбуждения.



Денк и др. [210] показали, что для этой цели также могут быть использованы диэлектрические наконечники с большим показателем преломления; при этом, для достижения достаточно хорошего разрешения, предлагалось использование трехфотонного возбуждения. Отметим, что в вышеуказанных многофотонных схемах легко произвести выделение полезного сигнала от фона посредством спектральной фильтрации, так как детекция и освещение осуществляется на разных длинах волн. В работе [211] была продемонстрирована возможность возбуждения поверхностных волн в металлической среде с цилиндрической геометрией. Далее было предложено использование возбуждения светом цилиндрических поверхностных электромагнитных волн для локализации поля в вершине произвольно заточенного металлического цилиндра [212] и других сужающихся металлических структур [213-216]. При этом наибольшая локализация поля происходит при вершине такой структуры в размерах соразмеримых с диаметром вершины. В работе [217] была теоретически исследована возможность возбуждения и локализации поверхностных волн волоконно-оптическом зонде в схеме БСОМ. Однако отметим, что такая схема трудно реализуема на практике, ввиду наличия проблемы обеспечения схемы возбуждения поверхностной волны. В данном случае резонансное возбуждение поверхностной волны может быть реализовано в том случае, когда волновой вектор волноводной моды становится равным волнового вектора поверхностной волны. Это означает, что данная схема аналогична известной конфигурации Кречмана [218], которая весьма критична к геометрическим параметрам. Обратим внимание также на наличие большой вероятности переизлучения поверхностной волны обратно в объемную, ввиду процессов рассеяния на неоднородностях металлического покрытия нанесенного на поверхность зонда по ходу распространения к вершине. Второе обстоятельство связано с тем, что напыляемый на поверхность оптического волокна металлический слой состоит из гранул размером до 50 нм и поверхностные волны при достижении длины волны значения соразмерного указанной величине, естественно, будут интенсивно рассеиваться на такого рода шероховатостях.

Нами была экспериментально исследована возможность возникновения высококонцентрированных локальных оптических полей с использованием свойств поверхностных электромагнитных волн [219]. В частности, была исследована особенность распространения поверхностных плазмонов -поляритонов в геометрии, возникающей при касании двух металлических поверхностей.

Структура, состоящая из двух соприкасающихся металлических шаров с различными радиусами  $R_1$  и  $R_2$  показана на Рис. 3.15. Для такой системы удобно использовать

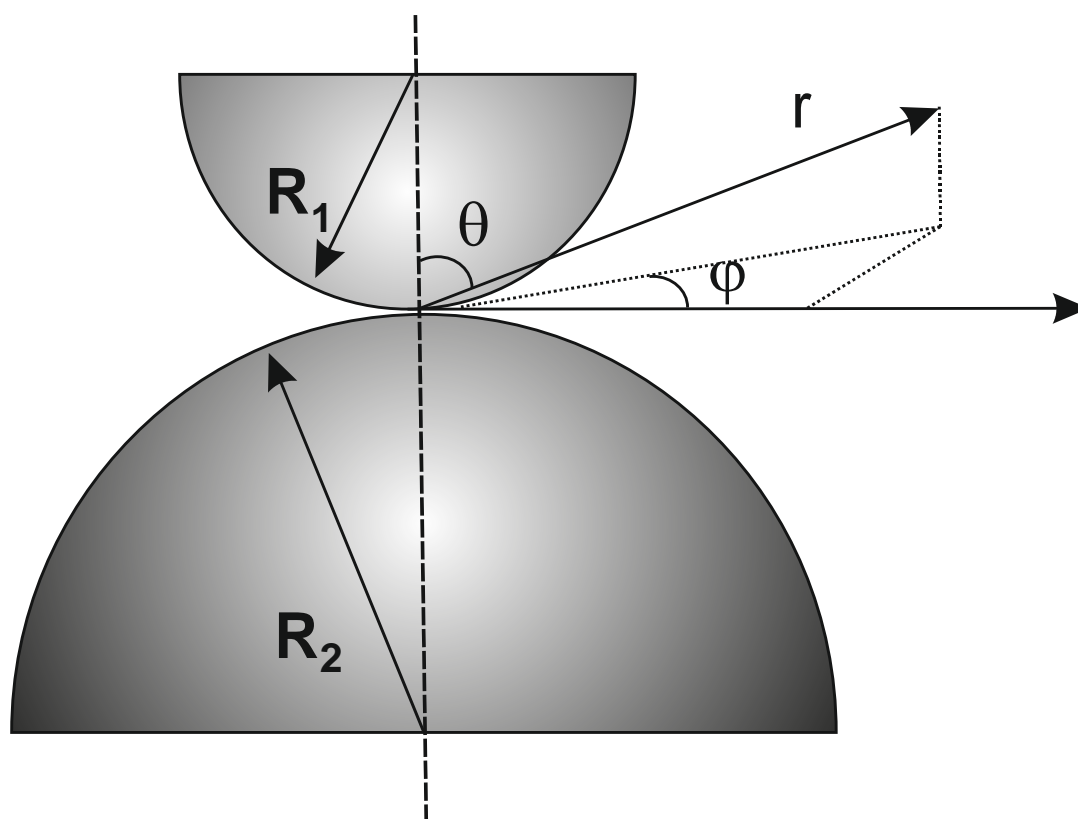


Рис. 3.15. Структура, состоящая из двух соприкасающихся металлических шаров с различными радиусами  $R_1$  и  $R_2$ .

сферическую систему координат  $r, \theta, \varphi$  ( $r \geq 0, 0 \leq \theta \leq \pi, 0 \leq \varphi \leq 2\pi$ ). В данном случае, если предположить что только компонента  $\varphi$  не равна нулю, волновое уравнение имеет вид [219]:

$$\begin{aligned} & \frac{\partial^2 H_\varphi}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial H_\varphi}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 H_\varphi}{\partial \theta^2} + \frac{\cos \theta}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial H_\varphi}{\partial \theta} - \frac{1}{r^2 \sin^2 \theta} H_\varphi \\ & + \varepsilon_j \frac{\omega^2}{c^2} H_\varphi = 0 \\ & j = 1, 2 \end{aligned}$$

Здесь  $\omega$  - частота волны,  $c$  - скорость света. Решения для возможных радиальных-угловых компонент электрического поля в такой структуре имеют вид [219]:

$$\begin{aligned} E_r^{(1)}(r, \alpha) &= \frac{ic \eta}{\varepsilon_2 \varpi r^{5/2}} A \cos\left(\frac{\eta}{r} + \Psi_0\right) \exp\left(-\frac{\eta}{r} \alpha\right) \exp(i\omega t); \\ & \text{для } \frac{r}{2R_2} \leq \alpha \leq \frac{\pi}{2} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} E_r^{(2)}(r, \alpha) &= -\frac{ic \eta}{\varepsilon_1 \varpi r^{5/2}} \left\{ B \exp\left(\frac{\eta}{r} \alpha\right) - C \exp\left(-\frac{\eta}{r} \alpha\right) \right\} \cos\left(\frac{\eta}{r} + \Psi_0\right) \exp(i\omega t); \\ & \text{для } -\frac{r}{2R_1} \leq \alpha \leq \frac{r}{2R_2} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} E_r^{(3)}(r, \alpha) &= -\frac{ic \eta}{\varepsilon_2 \varpi r^{5/2}} D \cos\left(\frac{\eta}{r} + \Psi_0\right) \exp\left(\frac{\eta}{r} \alpha\right) \exp(i\omega t); \\ & \text{для } -\frac{\pi}{2} \leq \alpha \leq -\frac{r}{2R_1} \end{aligned}$$

Здесь,  $\varepsilon_2$  -диэлектрическая проницаемость металла,  $\varepsilon_1$  -диэлектрическая проницаемость окружающей среды.

Таким образом, для напряженности электрического поля имеем:  $E \sim r^{-5/2}$ . Напряженность магнитного поля в данной схеме соответственно:  $H \sim r^{-1/2}$ . Отметим здесь, что для случая  $R_2 \rightarrow \infty$  мы имеем случай сферы соприкасающейся с плоскостью.

Теоретический анализ других геометрических структур показывает, что система из двух соприкасающихся сфер является наиболее оптимальной для наблюдения эффекта локализации поверхностных полей, так как в этой структуре увеличение волновых полей происходит наиболее эффективно. Здесь, для напряженности магнитного и электрического

поля имеем  $H \sim r^{-1/2}$ ,  $E \sim r^{-5/2}$ , в то время как для клинообразной структуры напряженность магнитного поля не зависит от  $r$ , а напряженность электрического поля:  $E \sim r^{-1}$  [213]. В случае конической структуры  $H \sim r^{-1/2}$ ,  $E \sim r^{-3/2}$  [214].

При проведении экспериментальных исследований мы исходили из того, что между прижатыми друг к другу серебрянными слоями механический контакт осуществляется в отдельных точках (Рис. 3.16). Это является результатом шероховатостей реальных поверхностей, которые в исследуемом нами случае оптически полированных поверхностей имеют нанометрические размеры. Описанная выше теоретическая модель указывает, что в указанных точках соприкосновения будет происходить аномальная локализация электромагнитного поля поверхностной волны. Простейшим следствием такой локализации энергии электромагнитного поля может стать фотоповреждение металлического слоя вблизи контактных точек.

В эксперименте лазерное излучение представляло собой пучок с  $TEM_{00}$  пространственной модой, где распределение интенсивности в поперечном сечении гауссовское. Длина волны падающего излучения составляла 1.06 мкм, энергия импульса - 5 мДж, длительность - 30 пс поперечный радиус пучка - 2 мм. Методом вакуумного напыления на стеклянную пластину наносился слой серебра. Толщина слоя составляла 500 нм, что обеспечивает полупрозрачность структуры. Из полученных таких пластин отбирались те, которые после 40-50 импульсов лазерного облучения не были подвержены фотоповреждению. Далее, серебрянные слои прижимались друг к другу с помощью механического давления, как это представлено на Рис 3.17. Контроль величины прижима, то есть расстояния между слоями серебра, осуществлялся визуально, наблюдением за возрастанием радиусов интерференционных колец. Величина прижима увеличивалась настолько, чтобы диаметры интерференционных колец намного (минимум в пять раз) превышали диаметр лазерного пучка. В этих условиях между прижатыми друг к другу серебрянными слоями будут существовать области нанометрических размеров, которые можно идентифицировать с теоретически проанализированной системой из двух соприкасающихся шаров.

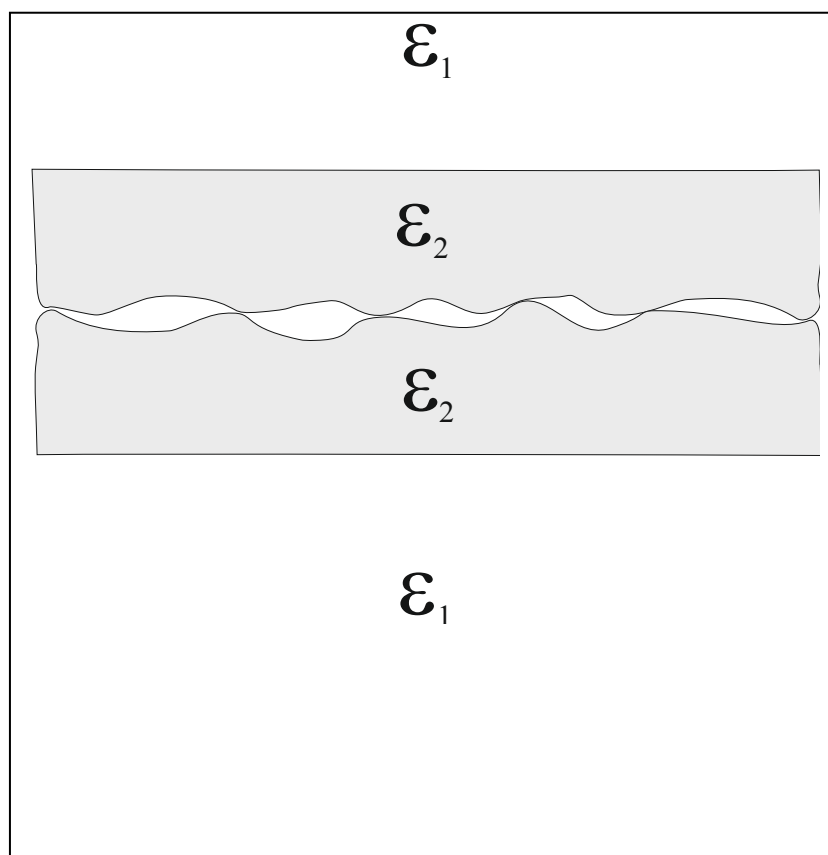


Рис.3.16. Схематическое представление механического контакта между серебряными слоями.

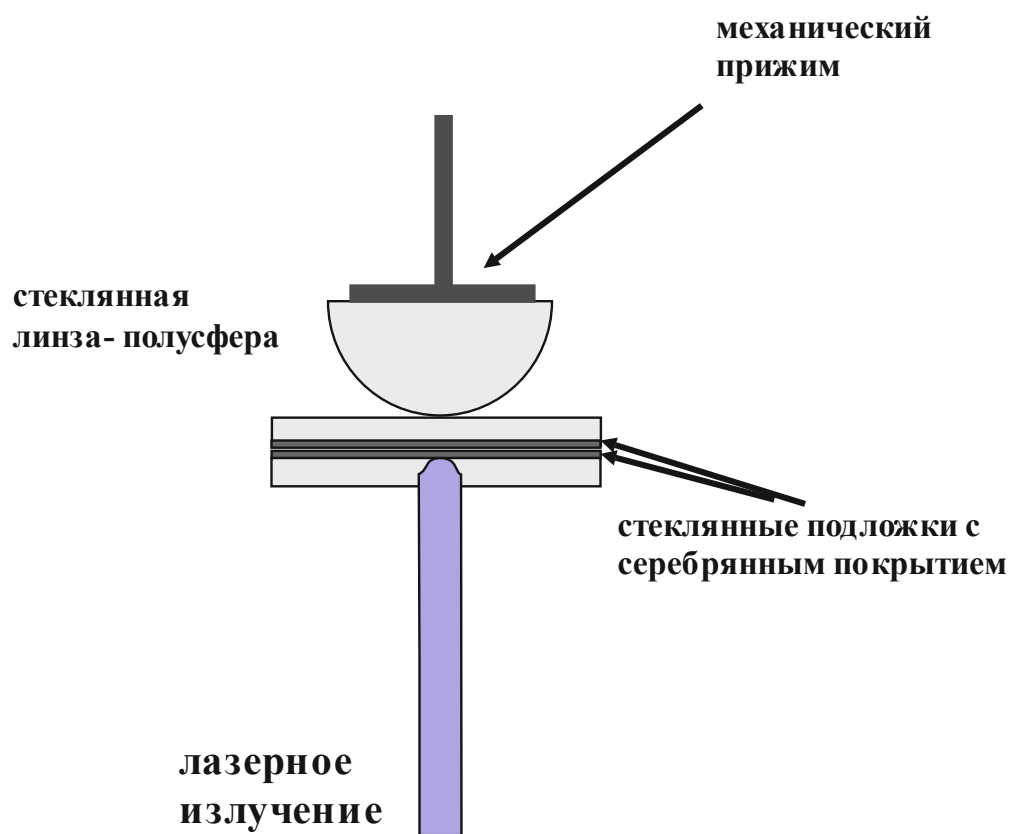


Рис.3.17. Схема эксперимента.

На указанную структуру перпендикулярно плоскостям металлического слоя подложки падает лазерный импульс (Рис. 3.17). Параметры лазерного импульса были те же, что и у импульса, использованного при отборе образцов. В исследуемой структуре, в области максимального прижима, лазерный импульс вызывает сильное фотоповреждение образцов (Рис. 3.18). 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. Отметим, что в описанной экспериментальной схеме наличие второго прижатого слоя для световой волны означает увеличение толщины слоя. Между тем, очевидно, что увеличение толщины металлического слоя, в контексте обычных тепловых процессов, должно привести к увеличению устойчивости к фотоповреждению. Таким образом, описанный процесс фотоповреждения не может иметь тривиального объяснения. Следовательно, можно предположить, что наблюдаемый в эксперименте эффект является следствием возбуждения поверхностных плазмон-поляритонов. В этом случае, как было показано в теоретическом рассмотрении, возможна локализация поляритона в окрестностях точек соприкосновения и аномальное возрастание волновых полей, что и объясняет фотоповреждение металлических слоев.

На Рис. 3.18 приведена характерная картина наблюдаемых фотоповреждений. В периферийной области действия лазерного пучка происходит взрывное испарение серебрянного покрытия с поверхности пластин и последующее осаждение серебра в окрестностях точек соприкосновения, что приводило к образовыванию достаточно четких кольцеобразных структур. В центральной области, где интенсивность падающего на образец излучения максимальна, фотоповреждения визуально не наблюдались, ввиду того что в данной области максимально также механическое давление на серебрянные слои. Сильное механическое давление которое ведет к прессовке напыленного серебра и соответственно к сглаживанию имеющихся шероховатостей серебрянных слоев. Таким образом, полученный экспериментальный результат подтверждает возможность локализации поверхностной волны в определенных локальных областях нанометрических размеров, что можно использовать для разработки новых схем сканирующего плазмонно-оптического микроскопа, обладающего сверхвысоким пространственным разрешением.

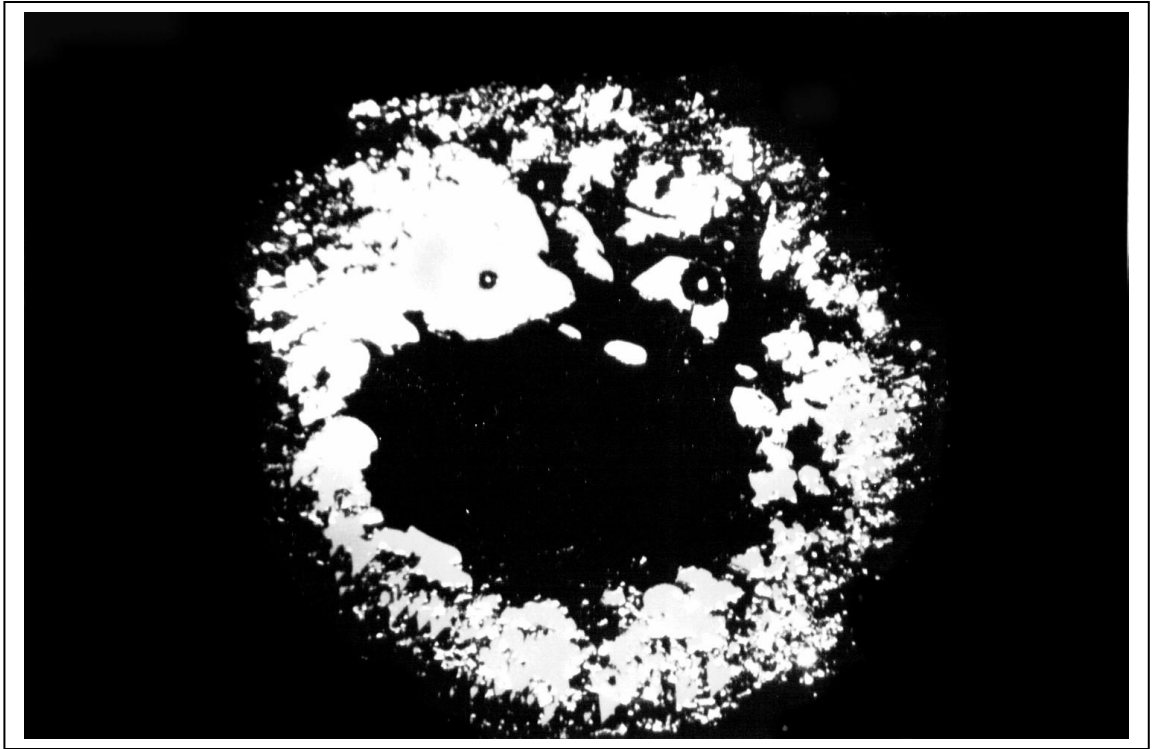


Рис. 3.18. Фотографическое изображение фотоповреждения серебряных слоев в области контакта.



### Выводы главы 3.

Предложена новая схема комбинированной микроскопии с совмещением особенностей туннельной и оптической микроскопии, где пространственное разрешение будет определяться геометрией заостренного зонда туннельного микроскопа. Показана возможность реализации данной схемы при регистрации штарковского спектрального сдвига в стационарном неоднородном электрическом поле.

Исследованы неординарные особенности отражения от диэлектрического оптического материала - кристалла  $MgF_2$ , обусловленные наличием отрицательной компоненты действительной части диэлектрической проницаемости среды  $\epsilon$ . Проведены измерения особенностей отражения излучения от поверхности кристалла  $MgF_2$ , показано наличие аномально высокого коэффициента отражения в спектральной области с отрицательной компонентой  $\epsilon$ . Предложена и рассчитана новая схема оптической микроскопии, с пространственным разрешением по оптической оси, составляющим порядка  $\lambda/10$ , которое значительно превышает аксиальное разрешение микроскопа.

Экспериментально исследована возможность возникновения локальных высококонцентрированных оптических полей с использованием свойств поверхностных плазмонов-поляритонов. Исследована особенность возбуждения и локализации поверхностных плазмонов-поляритонов в геометрии, возникающей при касании двух шероховатых поверхностей. Экспериментально показана возможность аномальной локализации поверхностной волны в определенной наноразмерной области, что можно использовать для разработки новых схем сканирующего плазмонно-оптического микроскопа, обладающего сверхвысоким пространственным разрешением.

## ГЛАВА 4

### ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ЛАЗЕРОВОЗБУЖДАЕМОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ БИОТКАНИ. ПРИМЕНЕНИЯ В БИОМЕДИЦИНЕ

В настоящее время современные методы лазерного флуоресцентного анализа биологических систем позволяет проводить оперативный и неинвазивный анализ временных, спектральных, поляризационных особенностей флуоресценции органических молекул, что дает важную информацию о их молекулярных свойствах, а также позволяет определить биофизические и биохимические параметры субклеточных и надклеточных органических структур.

В основе метода лазерного флуоресцентного анализа биотканей и биожидкостей лежит регистрация фотонов, испускаемых органическими молекулами при переходе из возбужденного электронного состояния в основное состояние. На Рис.4.1 приведена схема энергетических состояний органических молекул, где через  $S_0$  обозначены основное и  $S_n$  - возбужденные синглетные состояния,  $T_n$  - триплетные состояния. При относительно невысоких значениях интенсивности, под действием светового поля органические молекулы переходят в возбужденное состояние путем однофотонного поглощения квантов лазерного излучения, обычно видимого или ближнего ультрафиолетового спектральных диапазонов. Релаксация в основное состояние (флуоресценция) при переходе с первого синглетного состояния  $S_1$  в основное состояние - G происходит за характерное время  $10^{-8}$  с, в то время как при переходе с первого триплетного состояния  $T_1$  - G (фосфоресценция) происходит за временной интервал от  $10^{-8}$  до  $10^2$  с.

Метод флуоресцентного анализа биотканей и биожидкостей находит широкое применение также в медицине для ранней диагностики различных заболеваний, посредством высокочувствительного определения изменений в химическом составе биологических систем, а также, характерных изменений комплекса биохимических и биофизических процессов.

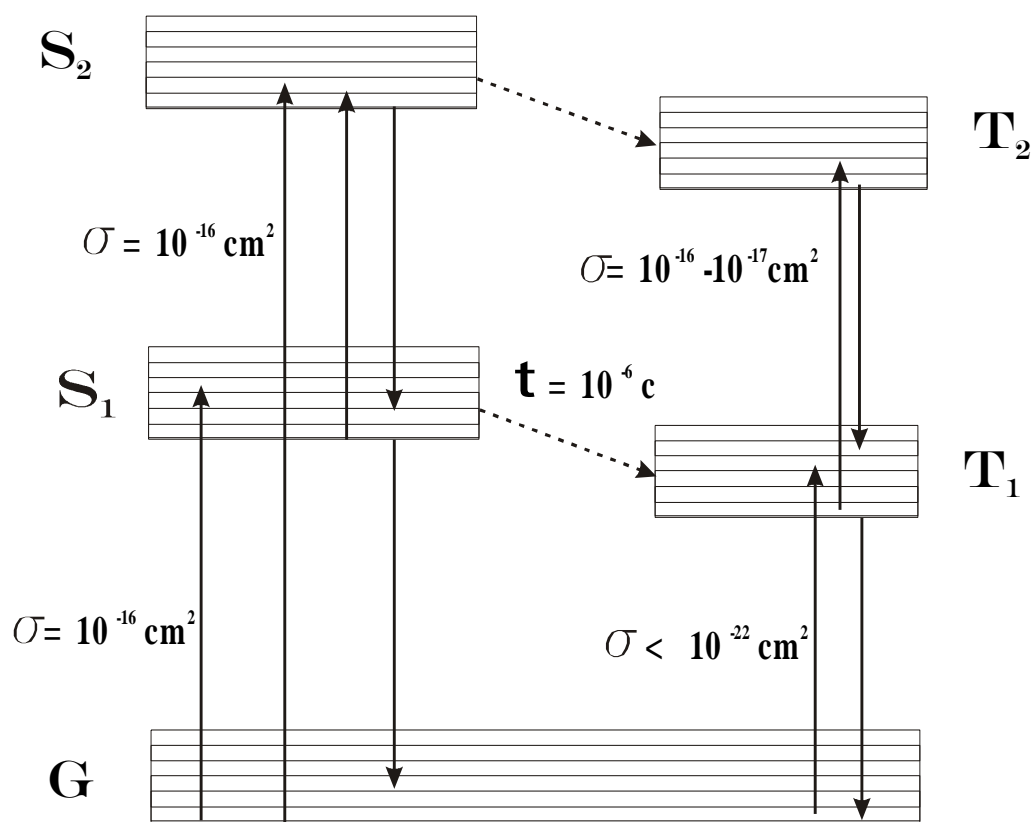


Рис.4.1. Схема энергетических уровней органических флуорофоров, характерных времен жизни и сечений переходов.

#### **§4.1. Спектральные особенности флуоресценции биоткани при лазерном возбуждении**

Исследования спектральных особенностей флуоресценции биотканей и биожидкостей в первую очередь были инициированы и обусловлены потребностями практической медицины, где основная область применения флуоресцентного анализа - это диагностика патологических процессов в организме; при этом метод позволяет следить за состоянием живых систем в реальном времени, не повреждая их.

Исследования флуоресценции тканей с целью применения в медицине были начаты Поликармом [220] еще в начале 20-го века. В этих работах был выявлен повышенный уровень флуоресценции от некротических участков злокачественных опухолей (рак, саркома), расположенной в красной области спектра и обусловленный эндогенными порфиринами. Подобная флуоресценция наблюдалась так же в случаях некротизирующейся аденокарциномы молочной железы и фибросаркомы лица, причем она исчезала при распаде опухоли [221]. Далее были проведены визуальные исследования флуоресценции различных видов опухолей при возбуждении в ультрафиолетовой области спектра, (возле 365 нм) [222]. Были зарегистрированы различия между злокачественными опухолями (саркома гигантоклеточная, конкрод, опухоль Шлинке) и доброкачественными новообразованиями (фиброма, полип, папиллома, фибролипома, атерома, зуб корня языка, остеома, хондрома). Для злокачественных опухолей наблюдалась очень слабая, еле заметная флуоресценция - преимущественно фиолетового цвета. У доброкачественных опухолей наблюдалась флуоресценция относительно интенсивной амплитуды голубого и желтого цвета. Спектральные различия зависели от кровонаполнения опухоли, например, доброкачественные опухоли гемангиомы имели очень слабую флуоресценцию. Аналогичные исследования, с применением фотоэлектрической регистрации, были проведены Карякиным с сотр. [223,224]. Исследование спектрального состава флуоресценции тканей легкого, пищевода и желудка онкологических больных показало, что спектры излучения при длине волны возбуждения нормальных и опухолевых клеток для всех органов одинаковы и представляют собой широкие полосы с расплывчатыми максимумами, положение которых варьируется от 475 до 515 нм. При этом интенсивность флуоресценции раковой опухоли оказалась в несколько раз меньше, чем флуоресценции нормальной ткани. В случае сильного прорастания опухоли проявляется полоса флуоресценции с максимумом на 620нм, которая обусловлена порфиринами. Подробные спектральные исследования, проведенные с

использованием более чувствительной экспериментальной техники, показали наличие двух флуоресцентных пиков 630/690нм, с характерным для входящего в состав гемоглобина протопорфирина-9 распределением интенсивности между ними. Следует отметить, что наличие флуоресценции в красной области спектра присуще не только злокачественным новообразованиям. Ввиду того что она обусловлена порфиринами, ее можно наблюдать и в тех случаях, когда имеются условия для распада гемоглобина, например, на раневых поверхностях, язвах, на краю десен и спинке языка и вследствие патогенной деятельности бактерий и микробов [ 225 ].

Применимость флуоресценции оптического диапазона в гастроэнтерологической диагностике была исследована в работе [226]. Исследования проводились с помощью микрофлуориметра, позволяющего одновременно регистрировать излучение при значениях длин волн, соответствующих максимумам в спектрах флуоресценции кофермента НАД•Н и ФП (460 и 520 нм соответственно). Детекция сигнала флуоресценции осуществлялась во время гастроскопии непосредственно и после извлечения биоптатов. Было определено, что интенсивность флуоресценции НАД•Н и ФП была в 4-5 раз ниже, чем для обследованных с нормальной слизистой. Слабые различия были установлены также в случаях хронического гастрита, неосложненной язве желудка и полипах. В работе [227] были исследованы спектрально-флуоресцентные особенности нормальных и злокачественных тканей для случаев карциномы легких и опухоли молочной железы. Фотовозбуждение флуоресценции проводилось излучением аргонового лазера на длинах волн излучения 488 и 459.6 нм. Были определены различия в интенсивностях, в форме спектрального профиля и в расположении флуоресцентных пиков, которые появились за счет изменения концентраций эндогенных флуорофоров.

Изменение спектрального состава собственной люминесценции злокачественных опухолей отмечалось и у животных. Напримкр в опухолевых тканях подопытных крыс наблюдалось уменьшение интенсивности синей флуоресценции при  $\lambda_{\text{возб}} = 337$  нм азотным лазером [228]. При возбуждении на длине волны  $\lambda_{\text{возб}} = 488$  нм для нормальной ткани почек крысы зарегистрирован спектр флуоресценции с максимумом при 531 нм и “крылья” при 574 и 620 нм, в то время как для опухолевой ткани спектр сдвинут в коротковолновую область ( $\lambda_{\text{макс}} = 521$ нм) и сохраняется только одно “крыло” при 618нм [229]. Были зарегистрированы различия в кинетике затухания и поляризационных спектрах

флуоресценции, которые, авторы обуславливают изменениями в центрах связывания флавинов и порфиринов.

Получение первых экспериментальных результатов по флуоресцентной диагностике злокачественных новообразований различной локализации стимулировало разработку волоконно-оптических схем для подвода лазерного излучения соответствующей длины волны и энергии, с одновременной регистрацией сигнала флуоресценции от исследуемых участков тканей [230, 231].

В диссертационной работе были исследованы спектры автофлуоресценции тканей животных [232] на экспериментальной установке, приведенной на Рис. 4.2. Подвод лазерного излучения к образцам тканей осуществлялся через центральное кварцевое многомодовое волокно (Рис 4.3) с диаметром 200 мкм, а сбор флуоресцентного отклика - посредством шести симметрично расположенных аналогичных оптических волокон с тем же диаметром. Величина сигнала флуоресценции получаемого в указанной схеме критична к дистанции до поверхности исследуемого объекта и при всех измерениях эта дистанция поддерживалась неизменной.

Сектры автофлуоресценции различных органов лабораторных крыс приведены на Рис.4.4. При этом измерялась величина  $A_{\text{норм}}$  - амплитуды флуоресценции, нормированной на энергию возбуждающего лазерного излучения. Изменение длины волны регистрации спектрометра проводилось в автоматическом режиме; полученные спектры программно обрабатывались и хранились в персональном компьютере.

Как видно из приведенных результатов, наблюдаются различия в амплитуде сигналов для некоторых органов, которые находятся не в точном соответствии с прямым измерением абсолютного количества эндогенных флуорофоров. Так, в случае волоконно-оптических измерений, амплитуды автофлуоресценции имели сравнительно низкий уровень для печени и селезенки. Такое различие спектров может быть объяснено как результат различия оптических параметров различных биотканей, в первую очередь коэффициента поглощения. Отметим что поглощательная способность биоткани различна как для возбуждающего лазерного излучения, так и автофлуоресценции.

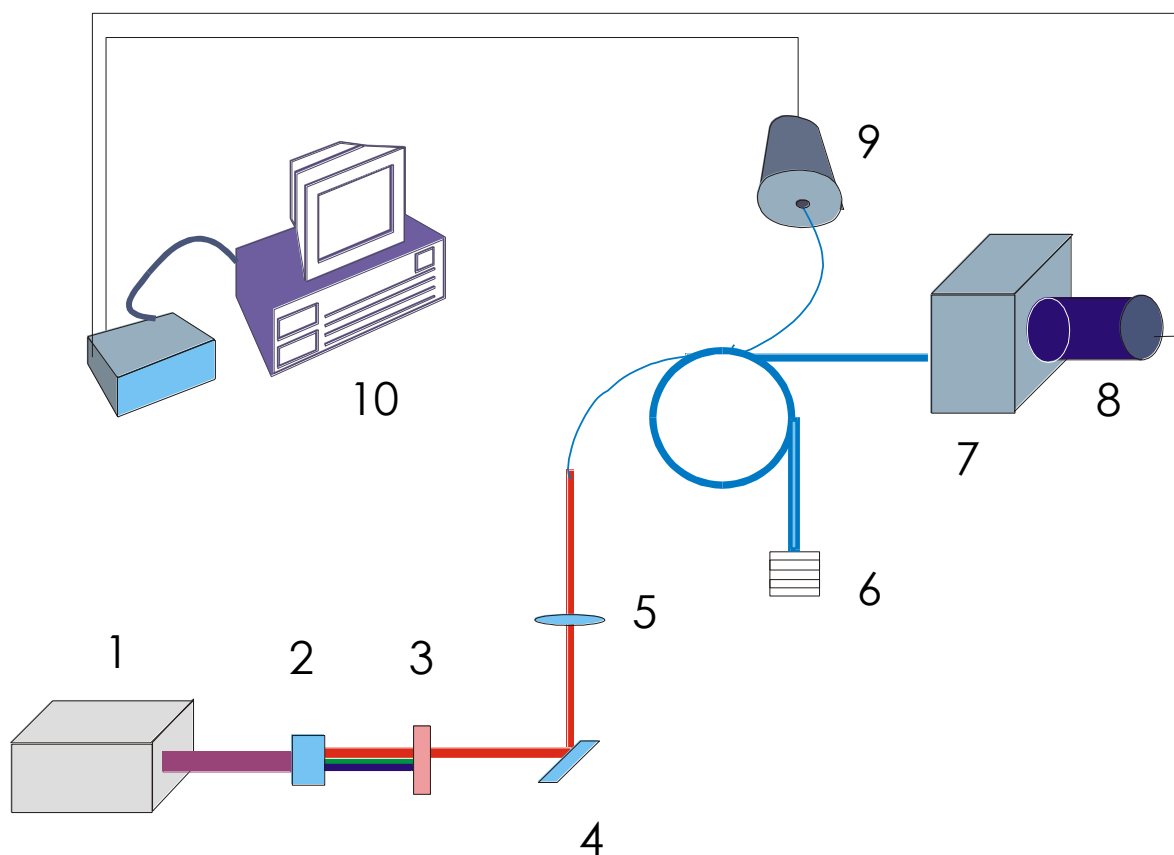


Рис. 4.2. Схема экспериментальной установки: 1- АИГ Nd лазер, 2 - блок нелинейных кристаллов, 3 - блок спектральных фильтров, 4 - диэлектрическое зеркало, 5- сферическая фокусирующая линза, 6 - исследуемый образец, 7- спектрометр, 8, 9 - фотоприемники, 10 - персональный компьютер с блоком АЦП .

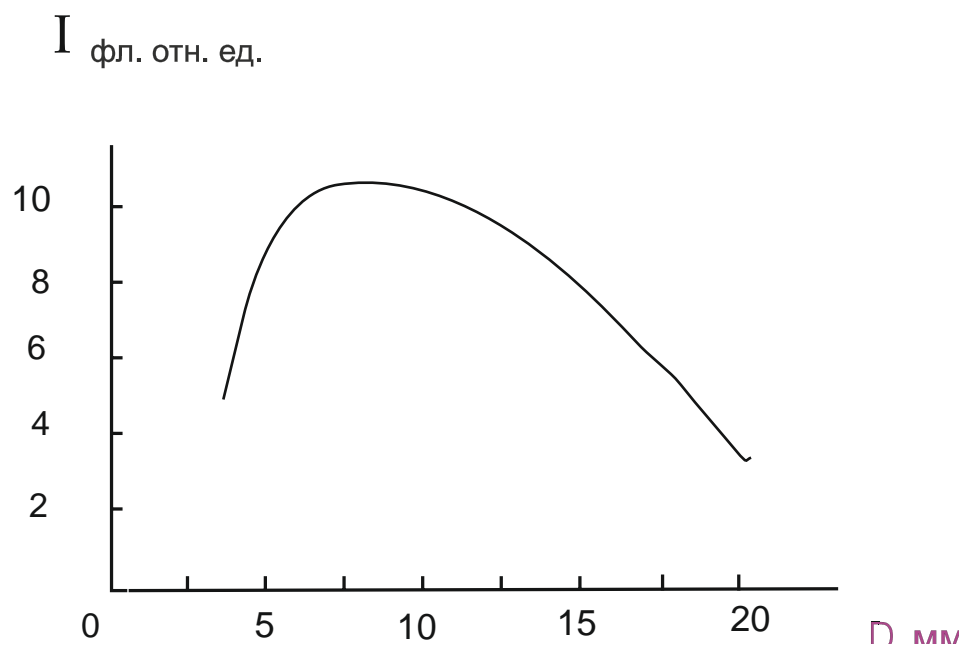
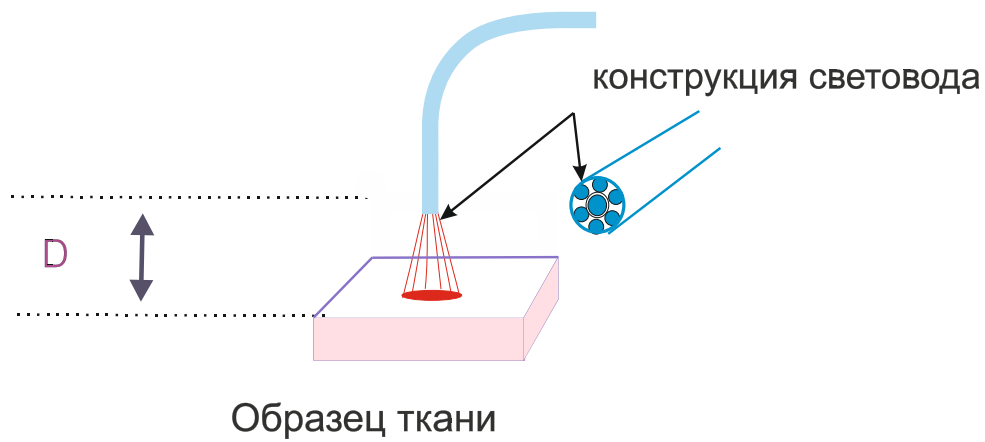
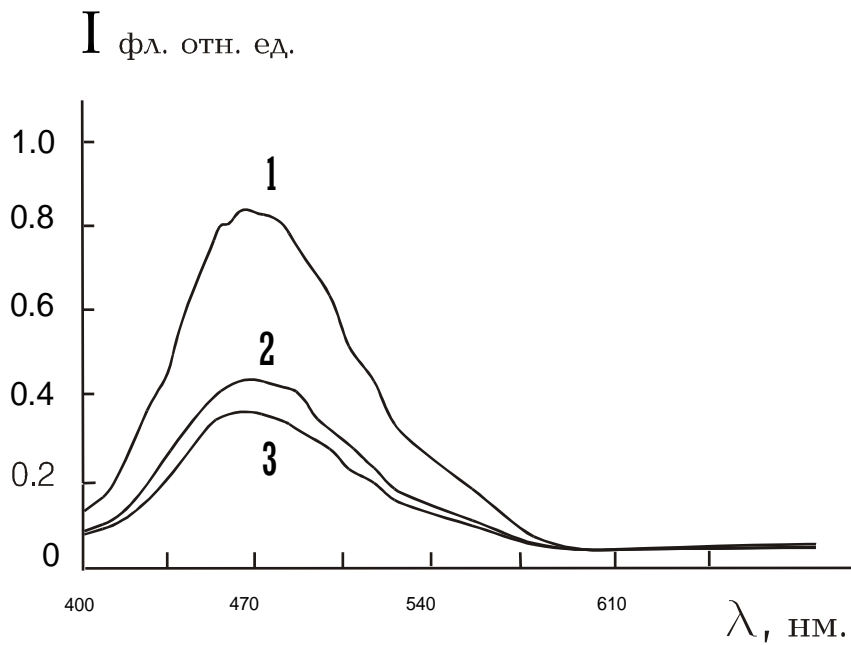
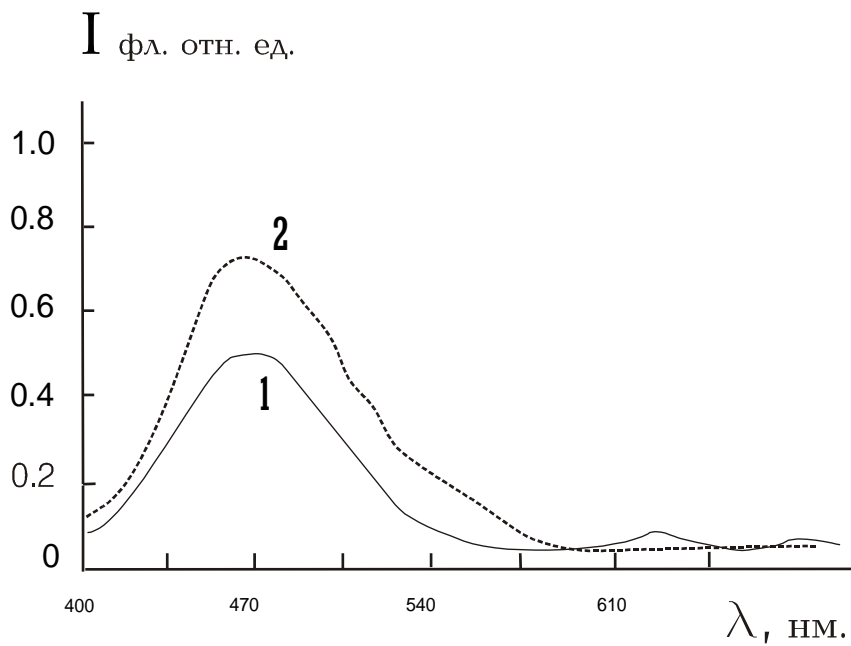


Рис. 4.3. Схема волоконно-оптического подвода излучения и сбора флуоресценции, а также зависимость интенсивности флуоресценции от дистанции до поверхности образца.





а)



б)

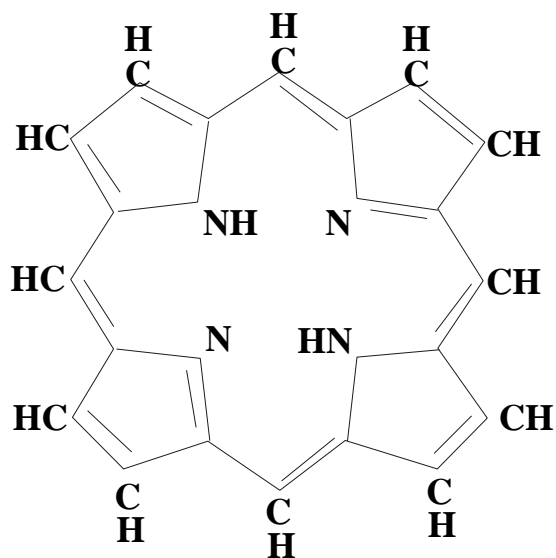
Рис. 4.4. Спектры автофлуоресценции: а) - кожи (1), селезенки (2), печени (3); б) - нормальной мышечной ткани (2) и саркомы 45 (1) лабораторных крыс в условиях “*in vivo*”. Длина волны лазерного возбуждения  $\lambda = 355\text{ нм}$ .

#### **§4.2. Флуоресценция биоткани сенсibilизированной туморотропными красителями**

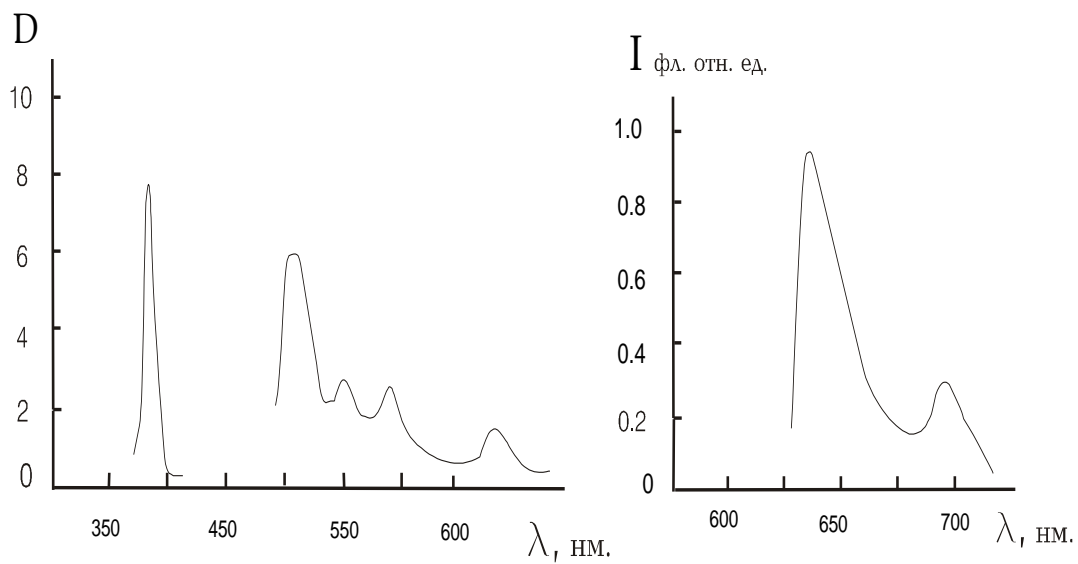
С целью повышения спектрального контраста между здоровой и измененной опухолевой тканью путем внесения дополнительных спектральных различий применяется стандартная методика, основанная на введении в организм флуоресцентных зондов - фототропных красителей с высоким квантовым выходом флуоресценции и которые допущены для введения в организм человека. В начальных работах по экспериментальному исследованию применимости указанного метода в онкологии широко использовалась натриевая соль флуоресцеина. В работе [233] было установлено, что после одноразового внутривенного введения флуоресцеина у здорового человека данный краситель полностью выделяется из организма в течение 70 часов, в то время, как у больных с злокачественной опухолью флуоресценция обнаруживается даже через весьма продолжительное время (~2000ч.). Флуоресцентная диагностика с использованием флуоресцеина была успешно использована для выявления опухолей мозга человека [234] и животных [235].

Спектральные особенности флуоресцеина были использованы также для дифференциальной диагностики заболеваний опухолей глаз (с использованием метода люминесцентной микроскопии) [236] и желудка [237]. Однопроцентный раствор красителя вводился с помощью зонда и доставлялся в пораженные участки желудка. Интенсивность флуоресценции регистрировалась с помощью специального эндоскопа, снабженного источником УФ излучения. Исследования 144 больных, как с язвами, так и с злокачественными опухолями показали, что люминесцентная эндоскопия в комбинации со спектральным анализом дает возможность в 98.7% случаев отличить злокачественное изъязвление от доброкачественного.

Для оптического диагностирования онкологических заболеваний возможно применение и других флуорофоров. Использование акридин оранжевого флуорофора дало хорошие результаты при люминесцентно-цитологического способа диагностики онкологических заболеваний [238,239]. Была показана возможность применимости флуоресценции красителя метилен голубого в случаях опухолей желчного пузыря [240]. После разрешения к клиническому использованию в США метода с использованием препарата на основе производной гематопорфирина (ППП) (рис.4.5) для фотодинамической терапии (ФДТ) злокачественных опухолей и дальнейшим широким распространением метода ФДТ во всем мире, стала актуальной задача исследования флуоресцентно-спектральных особенностей



а)

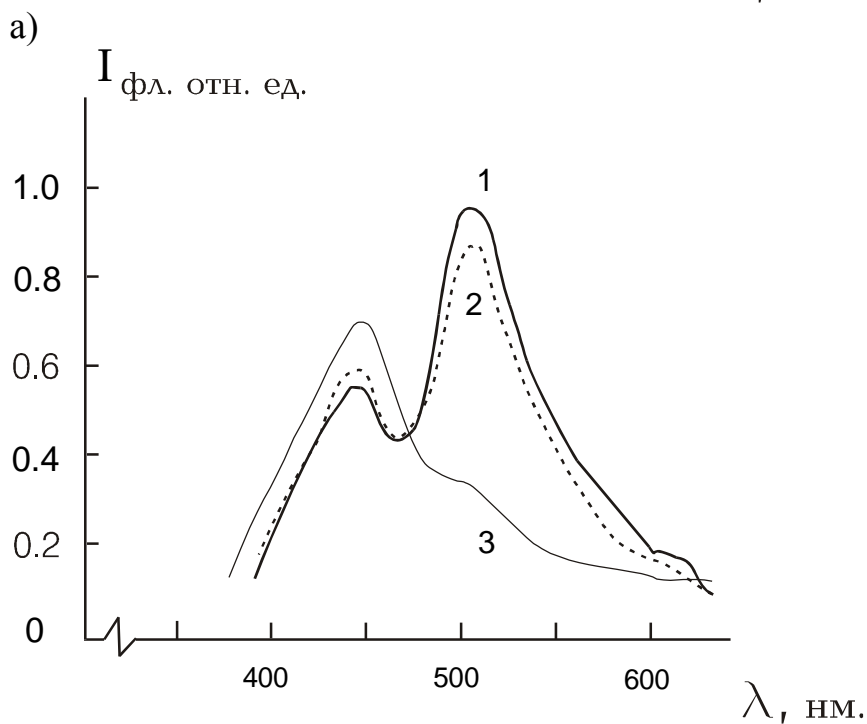
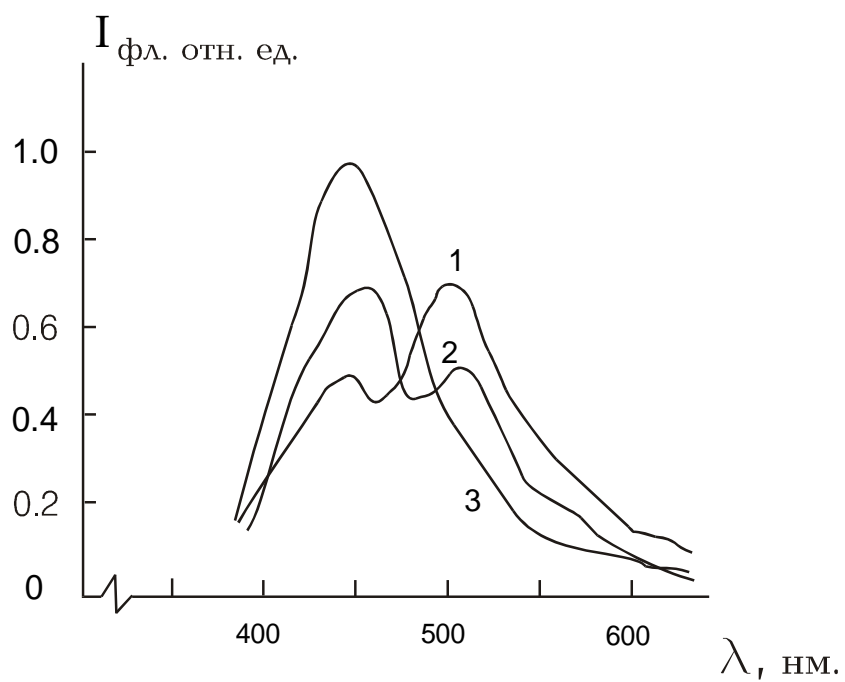


б)

Рис.4.5. Структурная схема молекулы порфина а) и б) спектры поглощения и излучения *n* - (сульфофенил) - порфирина (при  $\lambda_{\text{возб}} = 360\text{нм}$ ).

сенсibilизированных ППП тканей с целью выявления применимости препарата также для целей флуоресцентной диагностики. В работе [241] были детально исследованы спектральные особенности ППП при лазерном возбуждении с длиной волны 360нм и продемонстрирована возможность осуществления оптической биопсии. Для получения максимального флуоресцентного контраста было предложено ввести параметр контраста, учитывающий как понижение уровня автофлуоресценции в злокачественных опухолях, так и флуоресцентного вклада введенного в организм ППП. Особый интерес в последние годы вызвало возможность применения в ФДТ аминолевулиновой кислоты (АЛК), которая после введения в организм обеспечивает интенсивный синтез туморотропного фотоагента протопорфирина-9, с его последующим селективным накоплением в опухолевых тканях [242,243]. В работе [244] продемонстрирована возможность флуоресцентной диагностики с АЛК. при накачке лазером на красителе с длиной волны 400нм.

На Рис.4.6 приведены спектры флуоресценции тканей, полученные нами в условии *in vivo*, после инъекции флуоресцеина лабораторным крысам, при фотовозбуждении на длине волны  $\lambda = 355\text{нм}$  третьей гармоники YAG:Nd лазера [232]. Приведенные на рисунке кривые отражают кинетику накопления и вывода красителя из нормальной и опухолевой тканей. Как видно из рисунка через 4ч после введения красителя наблюдается новый пик флуоресценции на длине  $\lambda=520\text{ нм}$ , который по мере выведения красителя из организма уменьшается по амплитуде (через 32ч практически отсутствует). Видно, что вследствие селективного накопления красителя флуоресценция опухолевых тканей на временной дистанции 32ч при  $\lambda = 520\text{ нм}$  сильнее, а при  $\lambda = 470\text{ нм}$  слабее по сравнению с нормальными тканями. Наблюдаемое увеличение характерных спектральных различий дает основание для использования твердотельного YAG:Nd лазера в онкологической клинике.



б)

Рис. 4.6. Спектры флуоресценции нормальной а) и опухолевой б) ткани лабораторных крыс после 4ч (1), 8ч (2) и 32ч (3) от момента инъекции флуоресцеина, в условиях “*in vivo*”. Длина волны лазерного излучения 355нм.

### §4. 3. Особенности и физические механизмы тушения автофлуоресценции в сенсibilизированной биоткани

В многокомпонентных биологических системах, каковыми являются биоткань и биожидкость, для достоверного анализа явлений протекающих с участием светового облучения необходимо учитывать возможные параллельные каналы взаимодействия, когда одновременно участвуют несколько фототропных агентов. Таковыми процессами могут быть перепоглощение флуоресценции исследуемого биообъекта, эффект переноса энергии электронного возбуждения и т. д. Так, например, в работе [245] флуоресцентным методом исследовано тушение триптофанилов сывороточного альбумина человека и быка, при их комплексобразовании с хлорином  $e_6$ . С использованием расчетных значений для переноса энергии электронного возбуждения оценено расстояние между хромофорами белков и молекулами пигмента, которое составило  $\sim 1.5$  нм, что указывает на их локализацию в центральном домене белковых глобул.

Хорошо известно, что при возбуждении тканей и плазмы крови животных и людей ультрафиолетовым светом в спектральном диапазоне 300-400нм наблюдается ярко выраженная широкополосая синяя флуоресценция с пиком в области 440-480 нм. Спектральный состав собственной флуоресценции тканей близок к флуоресценции коферментов НАД•Н и НАДФ•Н (рис.4.7). В работе [246] биохимическими методами показано, что собственная флуоресценция сыворотки крови в области 440-400нм, при возбуждении в области 350-360нм, практически полностью обусловлена данными коферментами. Спектры поглощения фотосенсибилизаторов хлорина  $e_6$  и флуорената приведенные на Рис.4.8 указывают на возможность процессов переноса энергии электронного возбуждения с пиридиннуклеотидов в системах с их одновременным присутствием, ввиду наличия заметного перекрывания спектров излучения НАД•Н и спектров поглощения указанных фотосенсибилизаторов. Наличие в биологической ткани достаточно эффективного процесса переноса энергии может привести к тушению собственной флуоресценции ткани в синей области, изменению спектров действия и возбуждения флуоресценции и т. д.

НАД•Н (восстан. форма)

НАД<sup>+</sup> (окисленная форма)

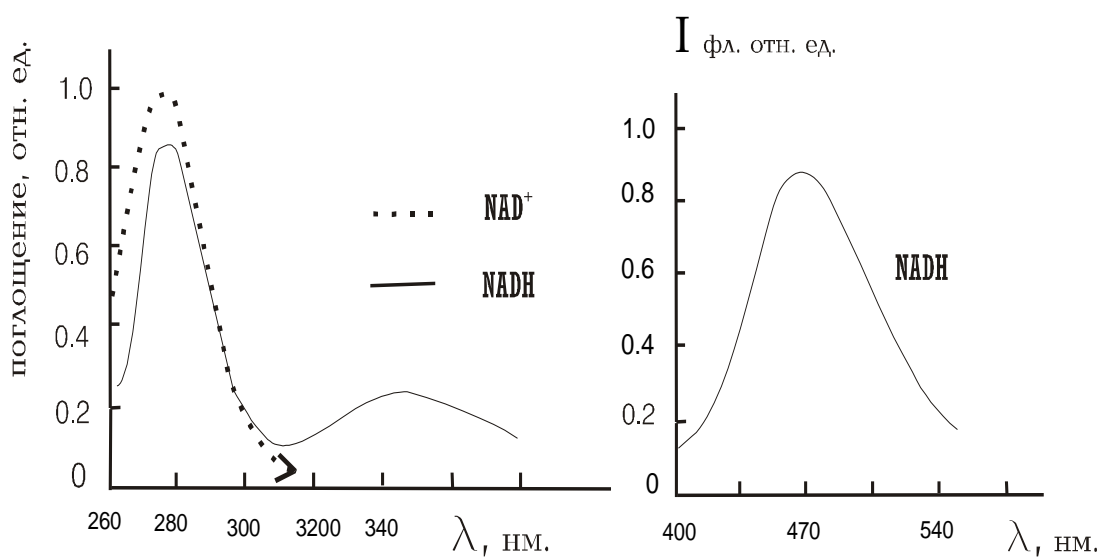
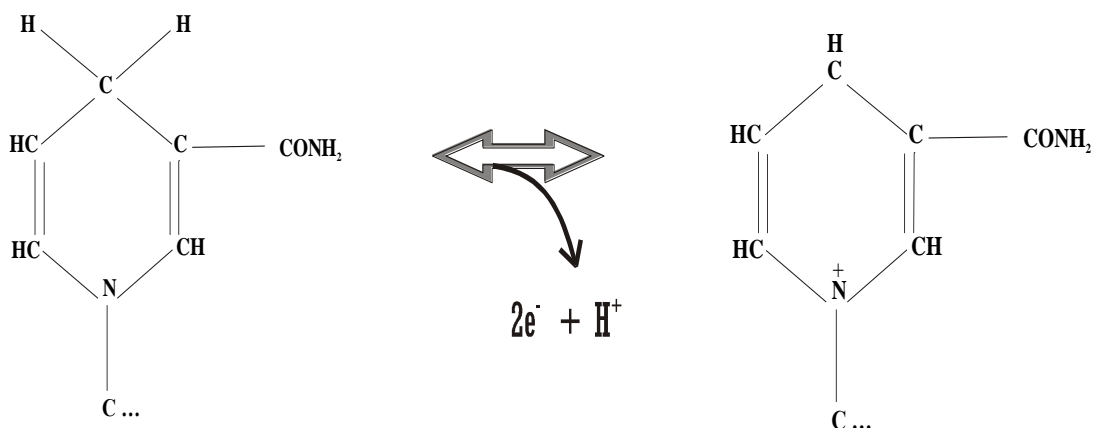


Рис. 4.7. Флуоресцентные характеристики НАД•Н. Нижние кривые представляют спектры поглощения НАД•Н и НАД<sup>+</sup> и спектр излучения НАД•Н.

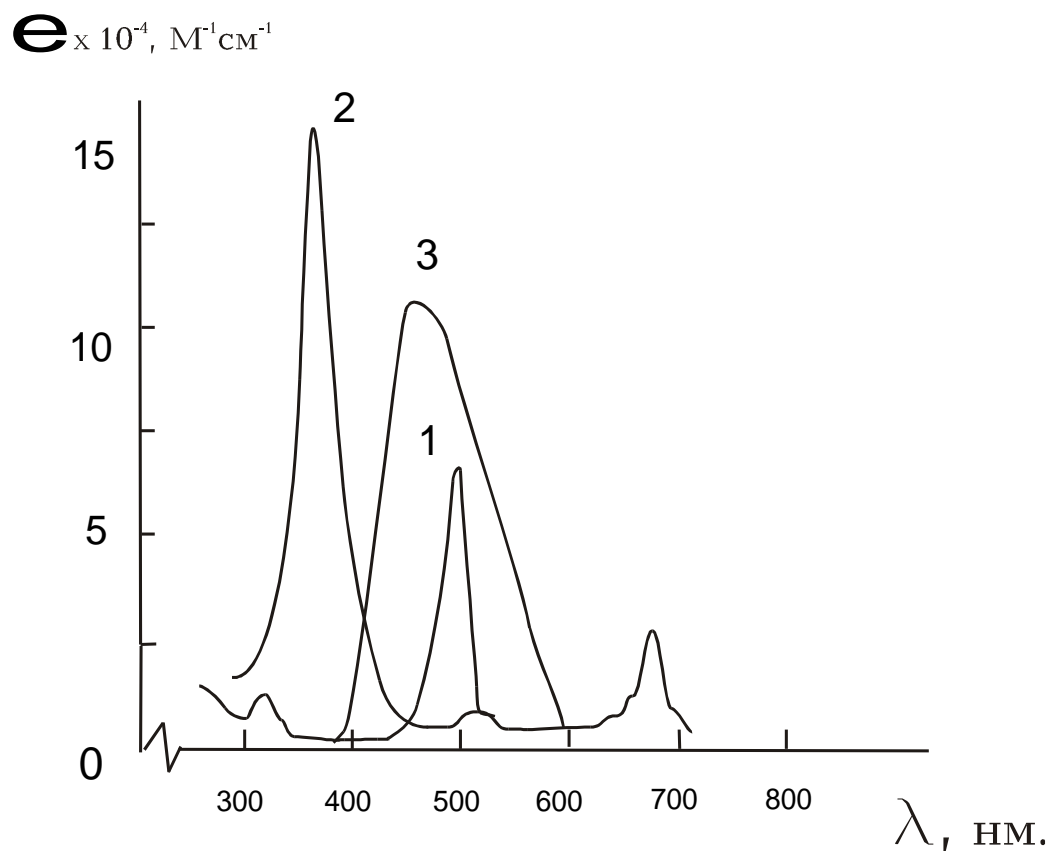


Рис. 4.8. Спектры поглощения водных растворов флуоресцеина (кривая 1), хлорина  $e_6$  (кривая 2) и флуоресценция водного раствора НАД•Н (кривая 3), при длине волны лазерного возбуждения  $\lambda = 355nm$ .



Характеристическое расстояние переноса энергии электронного возбуждения  $R_0$  для систем НАД•Н – пигмент, можно оценить используя известное теоретическое выражение [247]:

$$R_0 = \frac{9000k^2\varphi_d \ln 10}{128\pi^5 Nn} \int F_d(\lambda)\varepsilon_a(\lambda)\lambda^4 d\lambda \quad ,,$$

где  $k^2$  - фактор, описывающий взаимную ориентацию в пространстве дипольных моментов переходов донора и акцептора,  $\varphi_d$  - квантовый выход донора в отсутствие акцептора,  $N$  - число Авогадро,  $n$  - показатель преломления среды,  $\int F_d(\lambda)\varepsilon_a(\lambda)\lambda^4 d\lambda$  - интеграл перекрывания, отражающий степень спектрального перекрывания между испусканием донора и поглощением акцептора. Здесь  $F_d(\lambda)$  - нормированная интенсивность флуоресценции донора в заданном спектральном диапазоне,  $\varepsilon_a(\lambda)$  - коэффициент экстинкции акцептора. Вычислив интеграл перекрывания из спектров, приведенных на Рис.4.8 и подставляя значение  $\varphi_d = 0.017$  для водного раствора НАД•Н и  $k = 2/3$  для случая хаотической ориентации дипольных моментов, получаем  $R_0 = 2$  нм для пары НАД•Н - хлорин  $e_6$  и  $R_0 = 2.9$  нм для пары НАД•Н - флуоресцеин.

Для комплекса НАД•Н - флуоресцеин нами были проведены отдельные измерения по концентрационному тушению в водном растворе [248]. Экспериментально полученные зависимости интенсивности флуоресценции водного раствора НАД•Н от концентрации вводимого в раствор флюорената, а также теоретическая кривая, рассчитанная для случая переноса энергии при равномерном распределении молекул донора и акцептора в растворе, при возбуждении  $\delta$  импульсом приведены на Рис.4.9. При этом относительный квантовый выход флуоресценции донора определяется выражением [247]:

$$I_{da}/I_d = 1 - \sqrt{\pi} \gamma \exp(\gamma) [1 - \operatorname{erf}(\gamma)] ,$$

где  $\gamma = [A] / [A_0]$  и  $[A_0] = 300 / (2\pi^{3/2} N R_0^3)$ ,  $I_{da}$  и  $I_d$  - интенсивности флуоресценции донора в присутствии и отсутствии акцептора.

Согласованность расчетной и экспериментальной кривых подтверждает предположение об индуктивно - резонансном переносе энергии электронного возбуждения и

одновременно указывает на то, что НАД•Н и флюоренат в водных растворах не образуют молекулярных комплексов, в которых перенос мог бы проходить гораздо эффективнее.

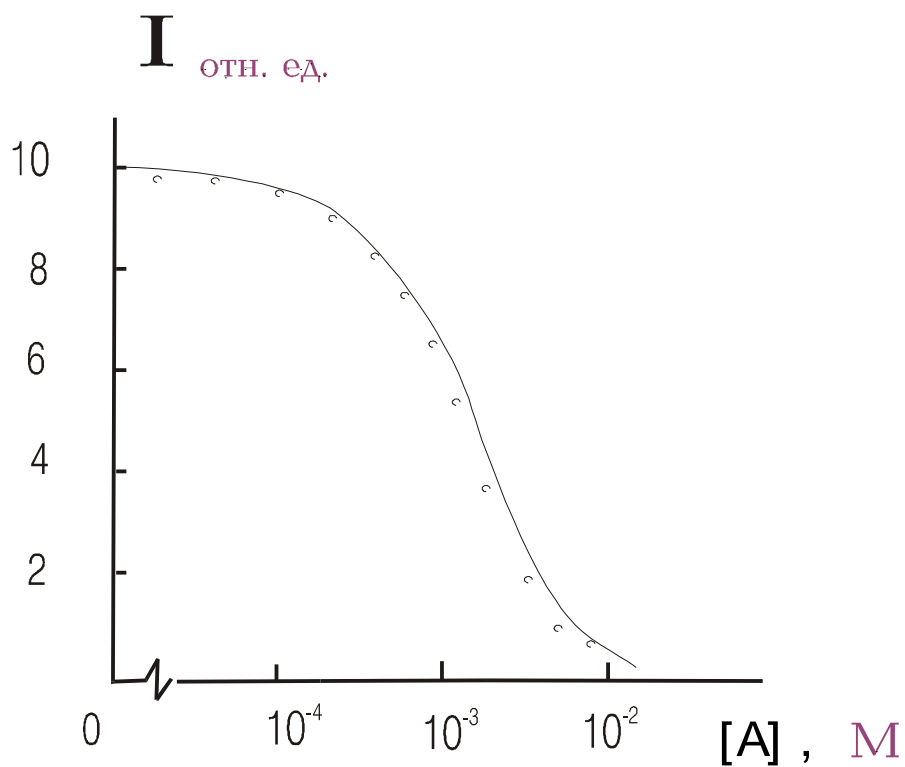


Рис.4.9. Зависимость интенсивности флуоресценции 0.5 мм слоя водного раствора НАД•Н ( $[A]= 1\text{мкМ}$ ,  $\lambda_{\text{фл}} = 440\text{нм}$ ) от концентрации флуоресцеина. Сплошная линия - расчетная кривая.

Необходимо отметить, что тушение начинается при концентрации флюорената  $10^{-4}$  М, тогда как при обычно вводимых в организм дозах в среднем достигаются концентрации примерно на два порядка меньше данной величины.

Однако, в отметим здесь, что характер фотофизических процессов, имеющих место в растворах, может претерпеть существенные изменения при их протекании в тканях организма. Как показали измерения (Рис.4.10), при окрашивании мышечных тканей  $10^{-6}$  М раствором флюорената в условиях “*ex vivo*”, происходит равномерное тушение автофлуоресценции тканей приблизительно на 30% в спектральном диапазоне 400-490 нм. Ввиду того что пик сильной полосы поглощения флуоресцеина расположен при  $\lambda = 490$  нм, и на этой длине волны при указанной концентрации нет характерного провала в спектре флуоресценции, вызванного поглощением, то можно сделать вывод о том, что в тканях равномерное тушение вызвано индуктивно - резонансным переносом энергии электронного возбуждения. Проведенные нами эксперименты показали также что перепоглощение флуоресценции начинает проявляться и приводит к наблюдаемой деформации спектра автофлуоресценции при окрашивании тканей концентрированным ( $10^{-3}$  М) раствором красителей (Рис.4.11). Ввиду того что пик сильной полосы поглощения флуоресцеина расположен при  $\lambda = 490$  нм, а хлорина  $e_6$  при  $\lambda = 400$  нм, можно сделать вывод о том, что в тканях при низких концентрациях красителей тушение в основном вызвано переносом энергии электронного возбуждения. В предыдущем параграфе (Рис.4.6), было показано что после инъекции флуоресцеина подопытным крысам в условиях “*in vivo*” наблюдается новый пик флуоресценции на длине  $\lambda = 520$  нм, обусловленный введенным красителем, который по мере выведения красителя из организма, уменьшается по амплитуде и одновременно восстанавливается начальный уровень собственной флуоресценции ткани с пиком при  $\lambda = 470$  нм. Похожий результат был получен нами при окрашивании тканей в условиях “*ex vivo*” как флуоресцеином, так и хлорином  $e_6$ .

Данные экспериментальные результаты дополнительно подтверждают существование переноса энергии от эндогенных флуорофоров к введенному в ткань красителю. Как было показано экспериментами в растворе, при введении в организм обычных доз красителя, модели однородного распределения молекул красителя соответствует концентрация красителя  $10^{-6}$  М, при которой эффективное тушение не может проявляться.

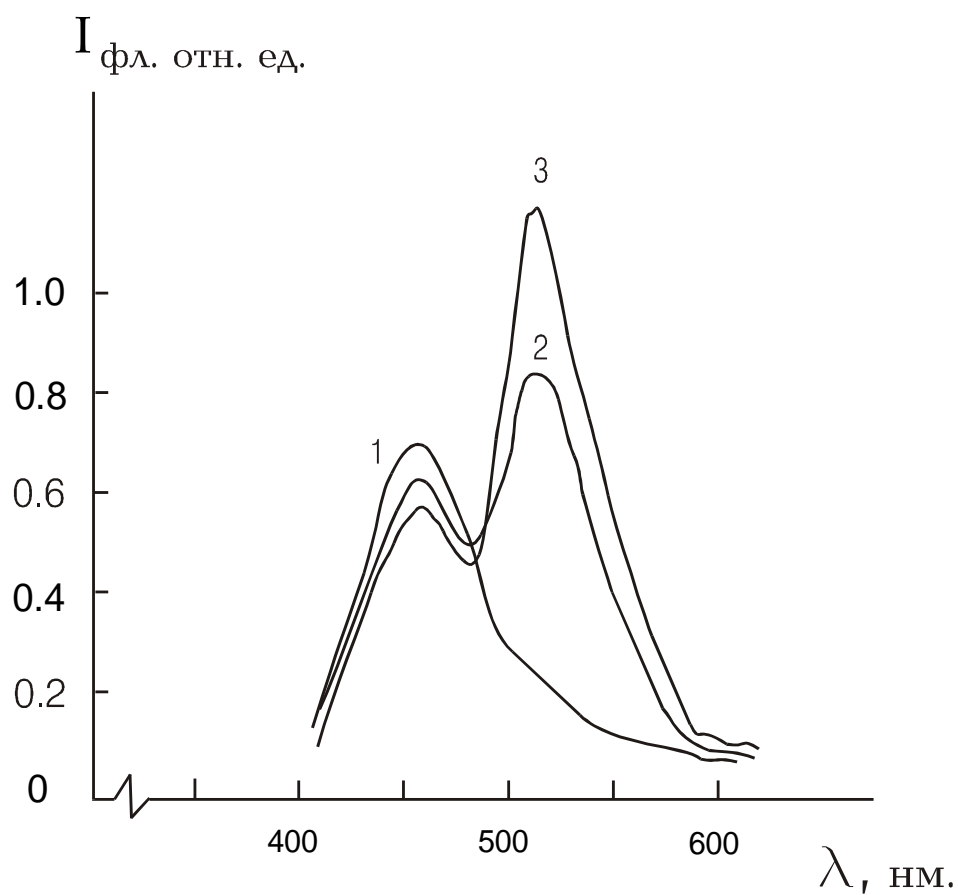


Рис.4.10. Спектры флуоресценции мышечных тканей курицы после окрашивания водным раствором флуоресцеина различной концентрации; (1) -неокрашенная ткань, (2) -  $10^{-6}$  М, (3) -  $10^{-4}$  М . Длина волны лазерного возбуждения  $\lambda = 355$ нм.

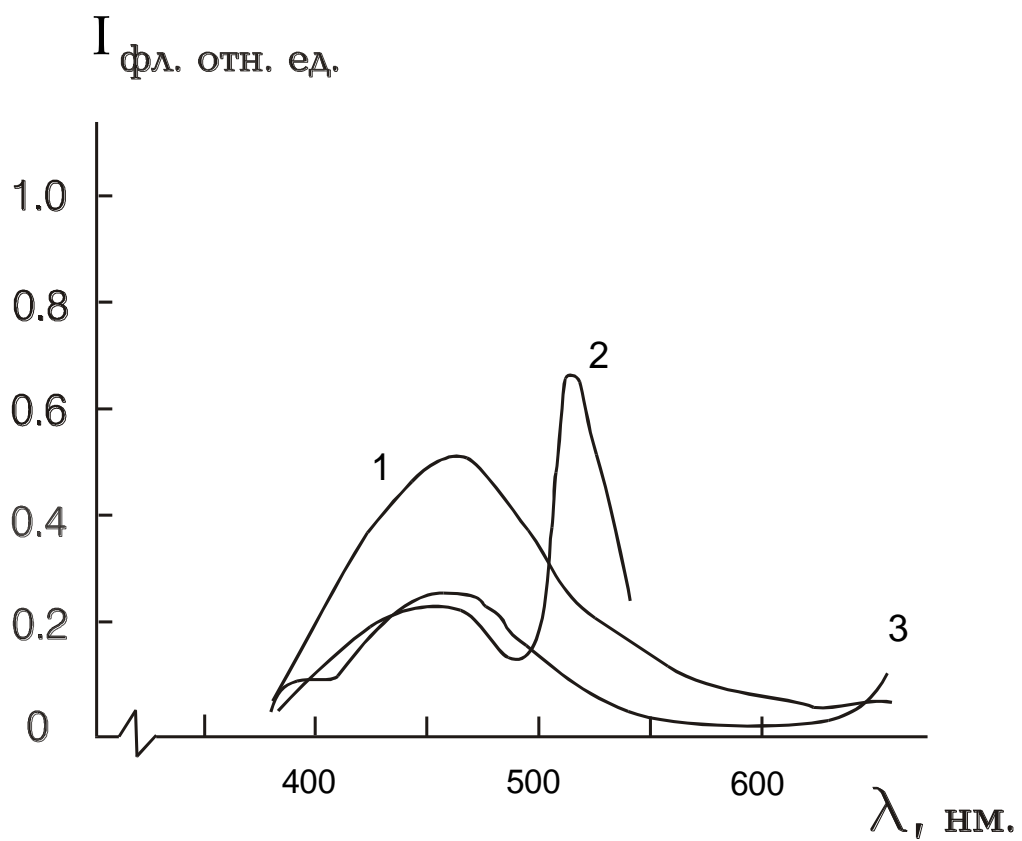


Рис.4.11. Спектры флуоресценции - неокрашенной (1) и окрашенных концентрированным  $10^{-3}\text{M}$  раствором флуоресцеина (2) и хлорина  $e_6$  (3) мышечных тканей курицы. Длина волны лазерного возбуждения 355нм.

Значительное тушение автофлуоресценции, наблюдаемое в тканях как “*in vivo*”, так и “*ex vivo*” экспериментах при указанной концентрации можно объяснить, предположив, что в тканях организма либо существуют определенные центры локализации молекул красителя и пиридиннуклеотидов, которые приводят к значительным концентрационным неоднородностям, либо же образуются комплексы кофермент - белок - краситель. Ввиду того что расстояние между молекулами красителя и кофермента, связанными с одним и тем же белком, ограничено размерами белков (~10 нм), то в этом случае так же возможно эффективное тушение. Заметим при этом, что как флюоренат [232], так хлорин [245], легко связываются с белковыми молекулами. Отметим также что индуктивно - резонансный перенос энергии электронного возбуждения является одним из возможных механизмов для объяснения наблюдаемого в ряде онкологических заболеваний понижении уровня автофлуоресценции в синей области спектра, природа которого до сих пор остается невыясненной. Появление сильного красного свечения опухолевой ткани обусловлено повышенной концентрацией эндогенных порфиринов. Наши исследования показывают, что одной из причин тушения флуоресценции пиридиннуклеотидов может явиться индуктивно - резонансный перенос энергии к порфиринам. В пользу этого говорят так же экспериментальные данные о преимущественном накоплении молекул гематопорфирина в отдельных участках клетки, в частности в митохондриях, где в свою очередь отмечается повышенная концентрация задействованных в процессе дыхания молекул НАД•Н.

#### **§4.4. Возможности использования лазервозбуждаемой флуоресценции в онкологической диагностике**

Задача раннего диагностирования онкологических заболеваний, которая имеет ключевое значение ввиду существенного повышения вероятности выздоровления при своевременном начале терапевтических процедур, может найти эффективное решение с развитием методов флуоресцентной биопсии. Значимость метода оптико-флуоресцентной диагностики в задаче наиболее раннего распознавания злокачественных новообразований продемонстрирована работами ряда исследовательских групп [249-251].

Для исследования спектрально-люменесцентных особенностей тканей человека нами были использованы длины волн излучения двухчастотного твердотельного наносекундного лазера [101]. Выбор твердотельного Nd:YAG лазера обусловлен тем, что в отличие от обычно используемых для диагностики опухолей газовых и жидкостных лазеров при применении в клинических условиях, указанный лазер более удобен, поскольку относительно доступен, имеет большой ресурс работы и прост при техническом обслуживании.

При проведении экспериментальных исследований был использован 10% раствор препарата флюоренат (НПО “Вирион”, Томск), который вводили внутривенно в концентрации 10мг активного вещества на кг веса. Образцы биологических тканей были взяты из органов больных, которым был введен флюоренат за 6, 12, 18 часов до операции (основная группа), а также больных, которым не вводили краситель (контрольная группа). Спектральное исследование образцов тканей молочной железы, желудка, кишечника, а так же мягких тканей конечностей человека проводилось через 1.5 - 2 часа после операции. Отдельно было экспериментально проверено отсутствие изменения спектральных характеристик ткани в течение четырех часов между резекцией и флуоресцентным обследованием. Измерения проводились в 5-10 точках одного образца для получения достоверной усредненной картины спектров. Дистанция от конца волновода до исследуемой области образца поддерживалась неизменной и составляло 10мм, диаметр лазерного пучка на поверхности образца в этом случае составлял 2 мм. Для получения более точных результатов оптической биопсии, был использован параметр контраста  $K = A_{оп}/A_{норм}$ .

На Рис.4.12 приведены спектры лазервозбуждаемой флуоресценции нормальной ткани и саркомы верхней части левого легкого человека, полученные нами при облучении лазерным излучением с двумя разными длинами волн 355нм и 440нм в отдельности [252,253]. В таблице 4.1 приведены результаты волоконно-оптического диагностирования некоторых опухолей человека в условиях “*ex vivo*”, при тех же длинах волн облучения. исследованных случаев доброкачественных опухолей. Для случаев опухоли молочной железы для основной и контрольной групп величины параметра контраста  $K$  близки в пределах ошибки измерений. Как видно из таблицы, контрастное накопление красителя не проявляется так как данная группа пациентов предварительно прошла курс радио или же

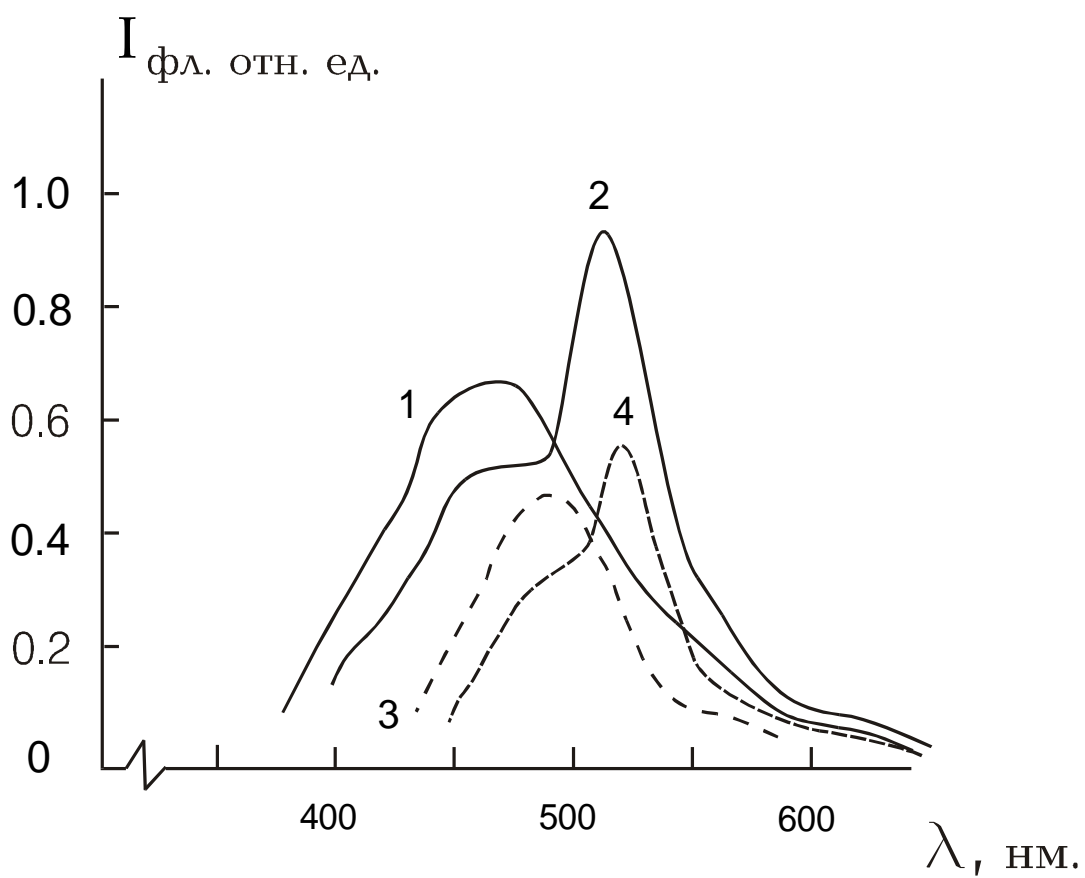


Рис. 4.12. Спектры флуоресценции нормальной ткани (1), (3) и саркомы верхней части левого легкого (2), (4) человека, после 6ч от момента инъекции флуоресцеина. Длина волны лазерного возбуждения 355нм (1), (2) и 440нм (3), (4).



<b>Диагноз</b>	<b>Число случаев</b>	<b><math>\lambda</math> нм</b>	<b>К</b>	<b>Т в часах</b>
<b>Опухоль молочной железы</b>	<b>3</b>	<b>440</b>	<b><math>1.0 \pm 0.3</math></b>	<b>н/и</b>
	<b>3</b>	<b>440</b>	<b><math>1.2 \pm 0.3</math></b>	<b>6</b>
	<b>5</b>	<b>440</b>	<b><math>1.2 \pm 0.3</math></b>	<b>12</b>
	<b>2</b>	<b>440</b>	<b><math>1.2 \pm 0.4</math></b>	<b>18</b>
	<b>3</b>	<b>355</b>	<b><math>1.3 \pm 0.4</math></b>	<b>н/и</b>
	<b>3</b>	<b>355</b>	<b><math>1.3 \pm 0.4</math></b>	<b>6</b>
	<b>5</b>	<b>355</b>	<b><math>1.4 \pm 0.4</math></b>	<b>12</b>
	<b>2</b>	<b>355</b>	<b><math>1.3 \pm 0.4</math></b>	<b>18</b>
<b>Саркома</b>	<b>4</b>	<b>440</b>	<b><math>2.5 \pm 0.6</math></b>	<b>6</b>
	<b>5</b>	<b>440</b>	<b><math>3.8 \pm 1</math></b>	<b>12</b>
	<b>4</b>	<b>355</b>	<b><math>2.0 \pm 0.4</math></b>	<b>6</b>
	<b>3</b>	<b>355</b>	<b><math>2.2 \pm 0.4</math></b>	<b>12</b>
<b>Опухоль желудочно-кишечного тракта</b>	<b>4</b>	<b>440</b>	<b><math>1.0 \pm 0.3</math></b>	<b>н/и</b>
	<b>6</b>	<b>440</b>	<b><math>3.5 \pm 1</math></b>	<b>12</b>
	<b>4</b>	<b>355</b>	<b><math>1.3 \pm 0.3</math></b>	<b>н/и</b>
	<b>6</b>	<b>355</b>	<b><math>3.0 \pm 0.6</math></b>	<b>12</b>
<b>Липома</b>	<b>3</b>	<b>440</b>	<b><math>1.2 \pm 0.3</math></b>	<b>12</b>
<b>Базалиома</b>	<b>2</b>	<b>440</b>	<b><math>1.2 \pm 0.4</math></b>	<b>12</b>

(н/и – не вводился)

Таблица 4.1. Зависимость параметра контраста К для различных опухолей и при различном временном интервале Т между вводом туморотропного препарата флюоренат и регистрацией флуоресценции.

химиотерапии, то этот результат может быть обусловлен следствиями терапии, то есть наличием фиброза в тканях и характерными нарушениями кровоснабжения. Для случаев рака желудка, кишечника и саркомы мягких тканей, при облучении излучением на длине волны 440нм величина параметра контраста К достигала максимальных значений 3.5 - 3.8, в то время как при облучении на  $\lambda = 355\text{нм}$  была несколько меньшей (2-3). Ввиду того что 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 образцов биоткани.

#### **§4.5. Спектральные свойства флуоресценции фотосенсибилизаторов второго поколения хлорина $e_6$ и $z$ -тетрасульффталацианина в биотканях при лазерном возбуждении**

Для целей лазерной фотодинамической терапии злокачественных опухолей в последние годы предложено использование фототропных сенсбилизаторов красителей второго поколения. Данные красители характеризуются наличием сильного поглощения в красной и ближней инфракрасной области спектра, что соответствует области минимального поглощения всей совокупности поглощающих компонент биоткани (в основном гемоглобина и воды) в данной спектральной области.

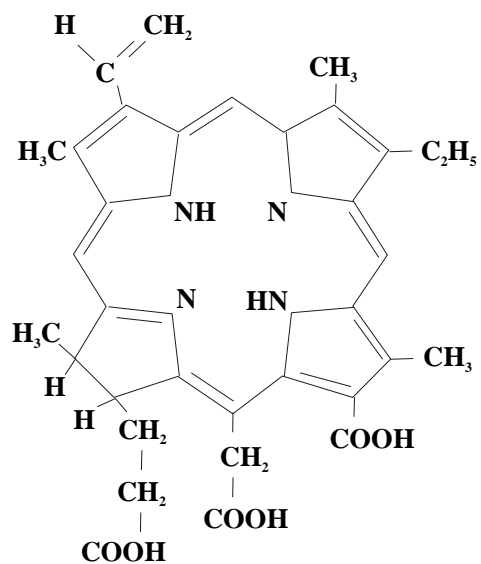
Отметим здесь что при использовании фотосенсибилизаторов второго поколения помимо стандартного противоопухолевого действия посредством активации фотохимического канала образования синглетного кислорода имеется также возможность образовывать фотохимическим путем гидроксильные радикалы в клетках, что в свою очередь инициирует дополнительное противоопухолевое действие. Следовательно применение этих, так называемых реагентов фото-Фентона, повышает суммарную эффективность фототерапии опухолей.

При данном подходе существует два направления получения подобных химических соединений:

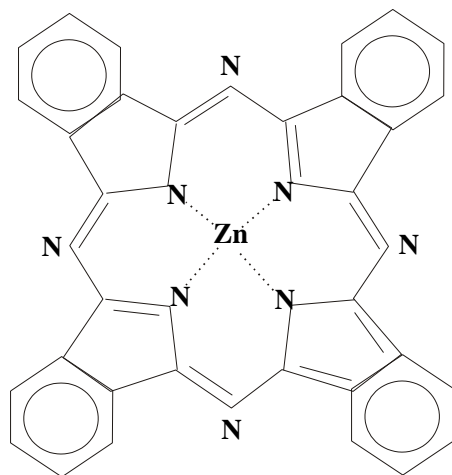
- селективная химическая трансформация природных хлорофиллов и бактериохлорофиллов,
- получение искусственных тетрапиррольных соединений: бензопорфиринов, фталоцианинов, нафталоцианинов, пурпуринов.

Более привлекателен первый путь, ввиду распространенности природных компонент, их дешевизны и экологически чистого производства. Отметим что производные хлорофилла по химической структуре близки эндогенным порфиринам и относительно безвредны для организма человека. В работе [254] исследованы новые соединения типа хлорина и бактериохлорина, полученных трансформацией производной хлорофилла а - пурпурина 18 и определены те из них, которые обладают максимальной водорастворимостью. Детальное исследование противоопухолевых свойств бактериохлоринов, имеющих поглощение в ИК спектральной области возле 800 нм, проведено в работе [255]. В настоящее время, при использовании упомянутых высокоэффективных для терапевтических целей фототропных красителей второго поколения, становится весьма злободневной решение задачи реализации оперативного контроля дозы облучения в течение световой терапии а также определение пространственного распределения молекул туморотропного красителя в конкретных препарлируемых участках ткани и предоперационная оптическая диагностика опухолей, в том числе достоверное определение границ опухоли.

В связи с этим, нами были исследованы [256] спектрально - флуоресцентные свойства используемых в фотодинамической терапии опухолей препаратов - хлорина  $e_6$ , полученного экстрагированием из натурального сырья а также химически синтезированного ZnTCФ, структурные формулы которых представлены на Рис.4.13. На Рис.4.14 приведены спектры флуоресценции различных органов лабораторных крыс полученные в условиях “*in vivo*”, после 6 часов от момента ввода хлорина  $e_6$  и при длине волны лазерного возбуждения  $\lambda = 355\text{нм}$ . Флуоресцентные спектры данных препаратов полученные для биоткани, зарегистрированы при возбуждении на длинах волн  $\lambda = 355\text{нм}$  и  $660\text{нм}$  и приведены на Рис.4.15. Отметим здесь, что при регистрации флуоресценции в красной области спектра (в нашем случае:  $665 - 725\text{нм}$ ) уровень фонового излучения относительно низкий, ввиду практического отсутствия в этой области спектра автофлуоресценции эндогенных флуорофоров. Такая особенность значительно повышает флуоресцентный контраст и соответственно увеличивает чувствительность метода, что позволяет детектировать гораздо меньшие концентрации туморотропного красителя. В случае длины волны возбуждения  $\lambda = 660\text{нм}$  флуоресценция расположена в непосредственной близости от лазерного пика и для спектральной фильтрации сигнала флуоресценции был использован спектральный фильтр KC19 (коэффициент пропускания  $10^{-4} \%$  и  $90\%$  для  $\lambda = 660\text{нм}$  и  $\lambda = 700 \text{нм}$ , соответственно).



а.



б.

Рис. 4.13. Структурные формулы хлорина  $e_6$  (а) и  $z$ -тетрасульффталоцианина (б).

Для выявления применимости использования хлорина  $e_6$  для целей оптической диагностики опухолей нами была исследована временная динамика величины флуоресцентного контраста [257]; при этом параметр относительного накопления красителя в ткани был сформирован в виде:  $A = I_{666}^* / I_{470}^* - I_{666} / I_{470}$ , где  $I_{666}$  и  $I_{470}$  ( $I_{666}^*$  и  $I_{470}^*$ ) - интенсивности флуоресценции при  $\lambda = 666$  нм (пик флуоресценции хлорина  $e_6$  в ткани) и  $\lambda = 470$  нм (пик тканевой автофлуоресценции, при лазерном возбуждении на  $\lambda = 355$  нм), полученные из органов животных с введенным красителем и контрольной группы животных, соответственно. Флуоресцентный контраст, определяемый в виде  $K = A_{оп} / A_{норм}$ , где  $A_{оп}$ ,  $A_{норм}$  - амплитуды флуоресценции при  $\lambda = 666$  нм для опухоли и нормальных тканей, соответственно, достигал максимального значения  $K \gg 10$ , через временной интервал 18 - 27 часов после ввода красителя. Для сравнения отметим что контраст флуоресценции для случая ПГП составляет порядка трех [249]. Кинетика накопления и вывода хлорина  $e_6$  для случаев кожи и подкожной ткани аналогична. Однако, наблюдаются различия в амплитуде сигналов для определенных органов, которые не находятся в точном соответствии с прямым измерением абсолютного количества красителя. Так при, измерениях амплитуды флуоресценции имели сравнительно низкий уровень для печени и селезенки (Рис.4.14). Это различие в уровне флуоресценции может быть объяснено изменением способности биоткани как поглощать само лазерного излучение, так и разной степенью тушения флуоресценции посредством перепоглощения и безызлучательного переноса энергии оптического возбуждения.

Таким образом, лазерный флуоресцентный метод дает хорошую возможность для оперативного и простого определения фармакокинетики препаратов.

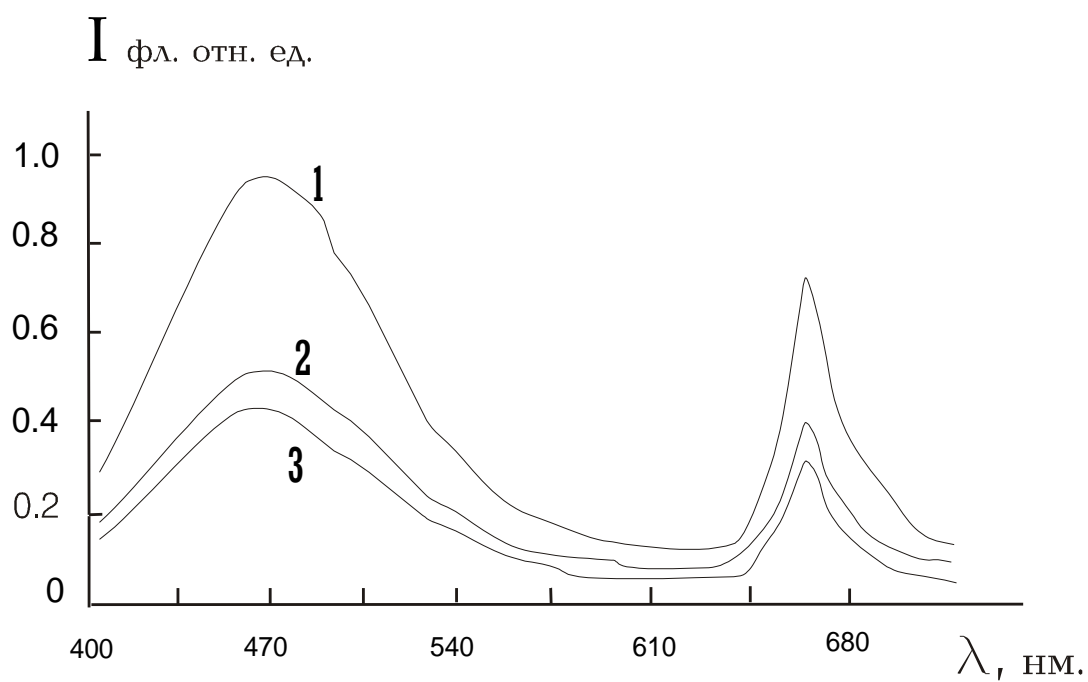
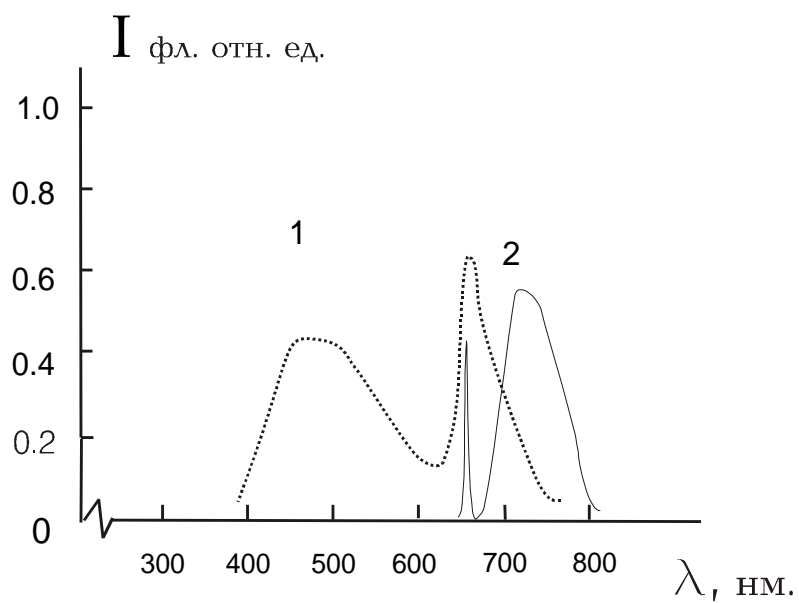
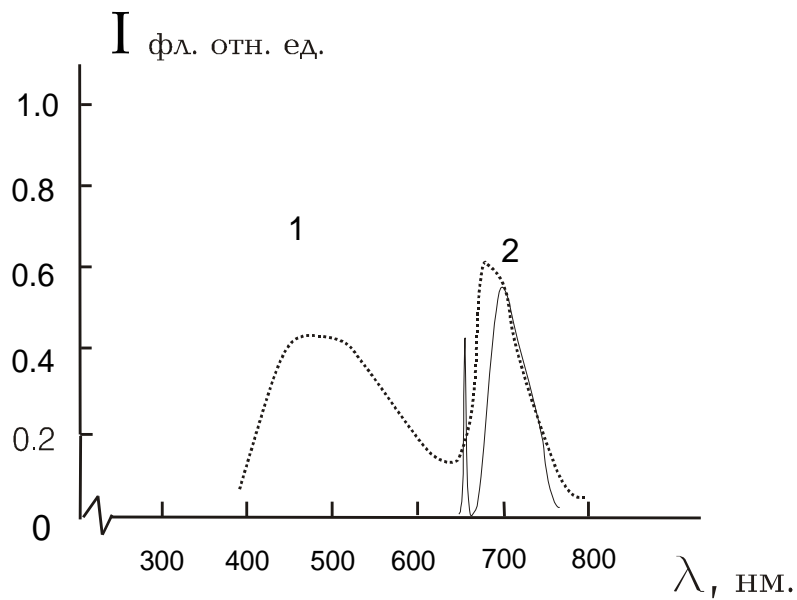


Рис. 4.14. Спектры флуоресценции: кожи (1), печени (2), селезенки (3); на временной дистанции 6ч после ввода хлорина  $e_6$  лабораторным крысам, в условиях *in vivo*. Длина волны лазерного возбуждения  $\lambda = 355\text{нм}$ .



**а.**



**б.**

Рис.4.15. Спектры флуоресценции биоткани после окрашивания а) хлорином  $e_6$  и б) ZnTCФ, при возбуждении на  $\lambda = 355\text{нм}$ , (1) и  $\lambda = 660\text{нм}$  (2).

Тип Биоткани	Время после инъекции хлорина $e_6$ в часах			
	6	18	27	50
Кожа	0.55	0.31	0.18	0.12
Мышечная ткань	0.3	0.18	0.11	0.07
Печень	0.74	0.4	0.23	0.13
Почка	0.62	0.34	0.18	0.1
Саркома-45	1.23	1.29	1.1	0.7

Таблица 4.2. Параметр  $A$  относительного накопления хлорина  $e_6$  в различных тканях и при различном временном интервале между вводом препарата и регистрацией флуоресценции.

#### §4.6. Апробация нового лазерного метода определения глубины



## проникновения опухоли в биоткани на модели опухоли

Разработка методик определения направлений роста опухоли в глубину ткани является одной из актуальных задач оптической биопсии злокачественных новообразований, в аспекте эффективного использования в клинической практике. Как нам известно, первая попытка решения данной задачи была предпринята в 1996г, в работе [258]. Была предложена модель оптического анализа, заключающаяся в изменении угла облучения исследуемого образца; при этом соответственно изменялась глубина облучения. Отметим что применимость предложенного метода ограничивается только лишь для случаев модели опухоли с определенной геометрической формой - а именно, только с формой прямоугольного бокса. При этом, из за сложности математического аппарата реконструкции исходной формы опухоли, корреляция расчетных и экспериментальных данных наблюдалась до глубин 3.5 мм. Альтернативное решение данной проблемы, на наш взгляд возможно реализовать при использовании методики [259], предложенной Альфано и др. в 1997г., которая основана на различие в степени деполяризации отраженного от тканей поляризованного света при различной степени проникновения фотонов в глубь биоткани. При применении довольно сложных математических алгоритмов реконструкции, по схеме данной методики, удалось достигнуть глубин анализа 3мм, что позволило авторам визуализировать сеть подповерхностных кровеносных сосудов.

Отметим что значительное число экспериментальных данных по флуоресцентной методике диагностирования опухолей получены при возбуждении фотосенсибилизаторов излучением в спектральной области  $\Delta\lambda = 350-450\text{нм}$ , с использованием эксимерных и газовых лазеров. Однако, как отмечалось выше, несколько перспективных фотосенсибилизаторов второго поколения характеризуются наличием сильного поглощения в красной - ближней инфракрасной области спектра, а также наличием нескольких полос поглощения в коротковолновой области спектра. Используя данное обстоятельство, а также зависимость глубины проникновения в ткань от длины волны светового зондирующего излучения нами предложена новая методика по определению распространения опухолевой ткани в глубину [260-262]. Рис.4.16 представляет схему анализа флуоресценции из различных глубин ткани. Фантом опухоли с расположением в различной глубине биоткани создавался изменением расположения прокрашенного туморотропным красителем одного слоя ткани среди определенного количества несенсибилизированных идентичных слоев той же толщины.

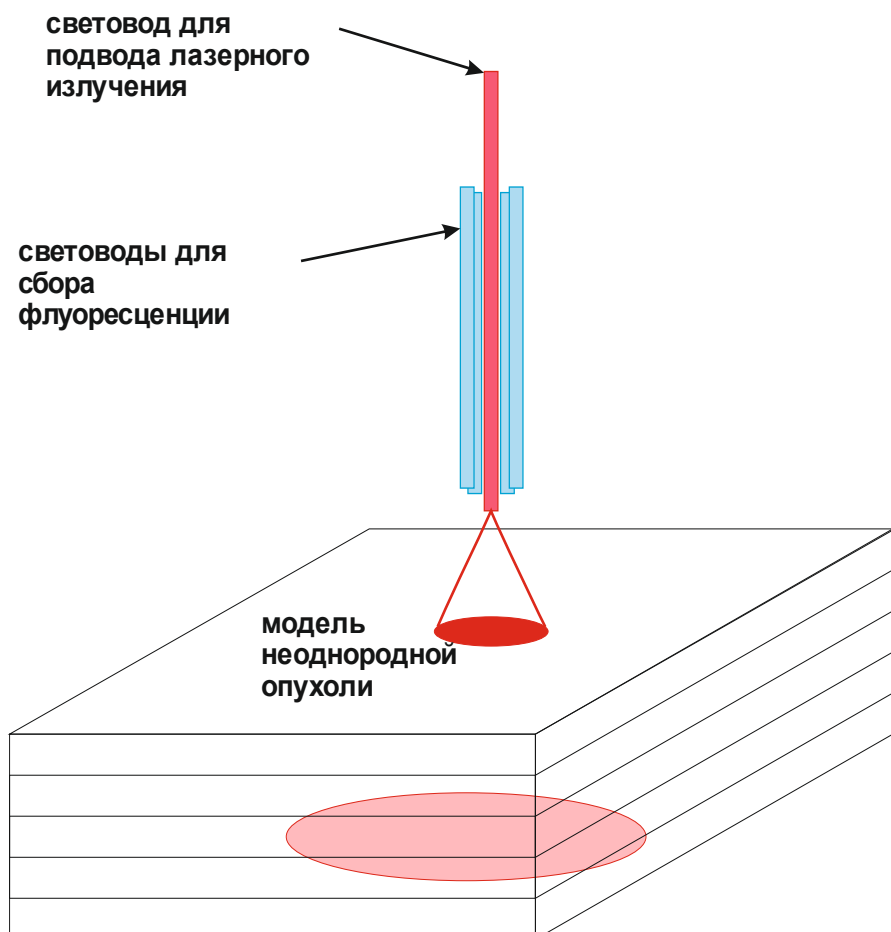


Рис. 4.16. Схема волоконно - оптического флуоресцентного анализа фантома опухоли с разрешением по глубине, где 1- центральный световод предназначен для подвода лазерного излучения, 2- шесть симметрично расположенных световодов предназначены для сбора флуоресценции.

В измерениях применялась волноводная система, где центральное волокно, с диаметром 400 мкм, использовалось для подвода лазерного излучения к поверхности образца биоткани, а шесть отдельных волокон с диаметром 200 мкм, которые были симметрично расположены вокруг центрального волокна, использовались для сбора сигнала флуоресценции.

Использованием различных длин волн лазерного возбуждения достигалась различная степень глубины проникновения излучения в биоткань. Так, при применении красителей хлорин  $e_6$  и ZnTCФ были выбраны две длины волны:  $\lambda = 355\text{нм}$  (основная полоса поглощения) и  $\lambda = 660\text{нм}$  (коэффициент экстинкции  $\epsilon_{657} \geq 4.8 \times 10^4 \text{М}^{-1} \text{см}^{-1}$ ). В случае длины волны  $\lambda = 660\text{нм}$ , как лазерное возбуждение, так и флуоресценция расположены в "окне прозрачности" биоткани, что ведет к значительному повышению оптической глубины обнаружения флуоресцентного агента. После спектральной фильтрации (фильтр КС-19) пики флуоресценции обоих красителей достаточно четко разделены от линии лазерного облучения и расположены при  $\lambda = 715\text{нм}$  и  $\lambda = 695\text{нм}$ , соответственно, для хлорина  $e_6$  и ZnTCФ. Рис. 4.17 указывает на различную степень ослабления сигнала флуоресценции по мере изменения глубины расположения сенсibilизированного образца биоткани в случае двух длин волн лазерного возбуждения:  $\lambda = 355\text{нм}$  (1) и  $\lambda = 660\text{нм}$  (2). Регистрации флуоресценции производилась на длине волны  $\lambda = 666$  и  $\lambda = 715$  нм, соответственно. Толщина каждого образца мышечной ткани была 2 мм. Глубина обнаружения флуоресцирующих агентов достигала 10 мм при  $\lambda = 660$  нм и 4мм при  $\lambda = 355$  нм.

Вычитая сигналы флуоресценции, полученные из этих двух объемов биоткани различной толщины, можно сделать заключение о присутствии флуоресцентных агентов отдельно в глубинном шестимиллиметровом объеме ткани. Следует отметить, что в демонстрационном эксперименте использовалось изменение величины коэффициента поглощения на двух длинах волн при применении одного конкретного фотосенсibilизатора, однако имеется ряд светочувствительных красителей - сенсibilизаторов, как, например, порфирины (включая аминолевулиновую кислоту (АЛК), из которой уже в организме синтезируется протопорфирин-9), хлорины, бактериохлорины и т. д., которые обладают двумя или больше полосами поглощения.

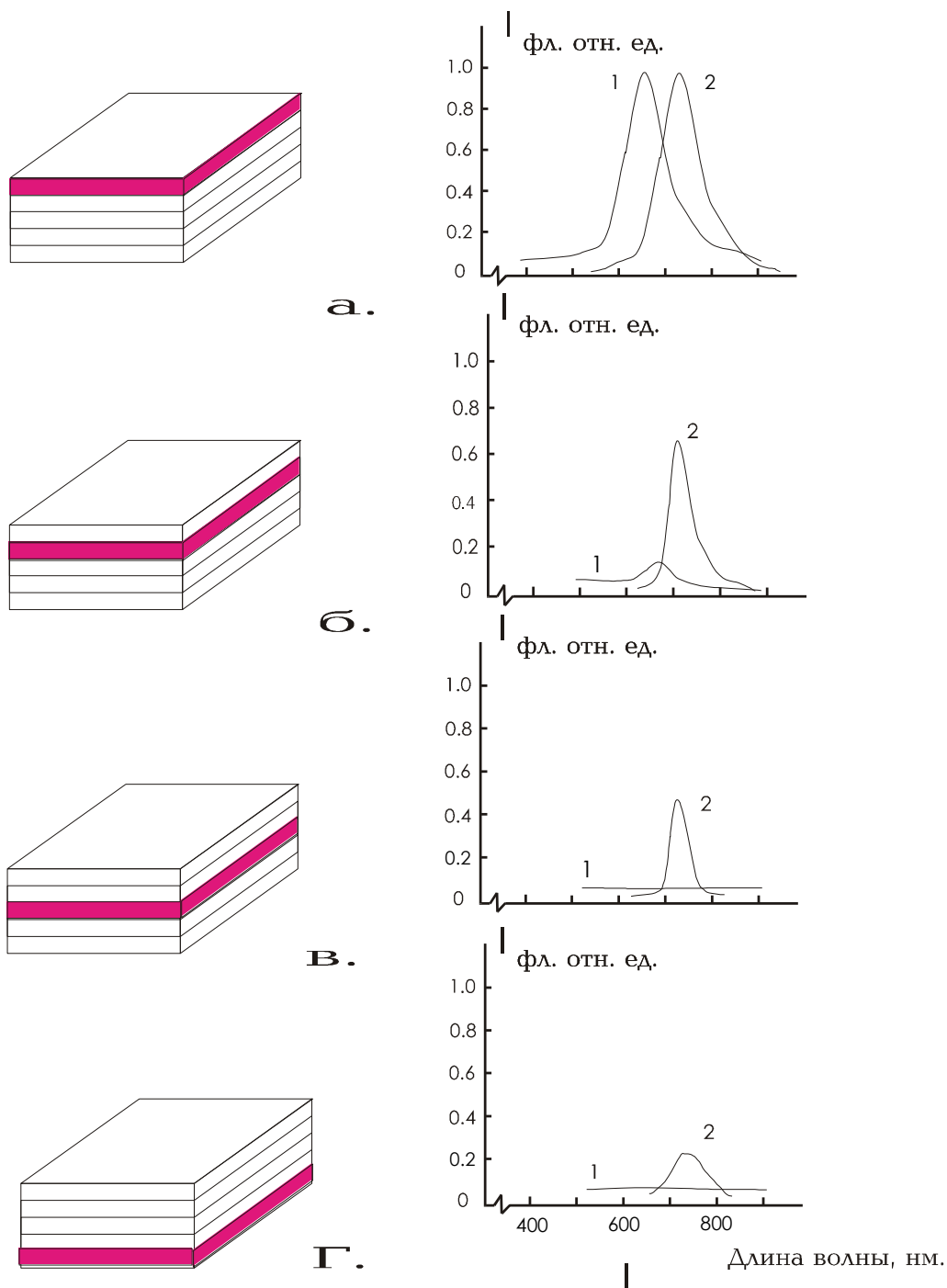


Рис. 4.17. Зависимости изменения интенсивности флуоресценции от глубины расположения сенсibilизированного слоя биоткани, при возбуждении при  $\lambda = 355\text{ nm}$  (кривая 1) и  $\lambda = 660\text{ nm}$  (кривая 2).

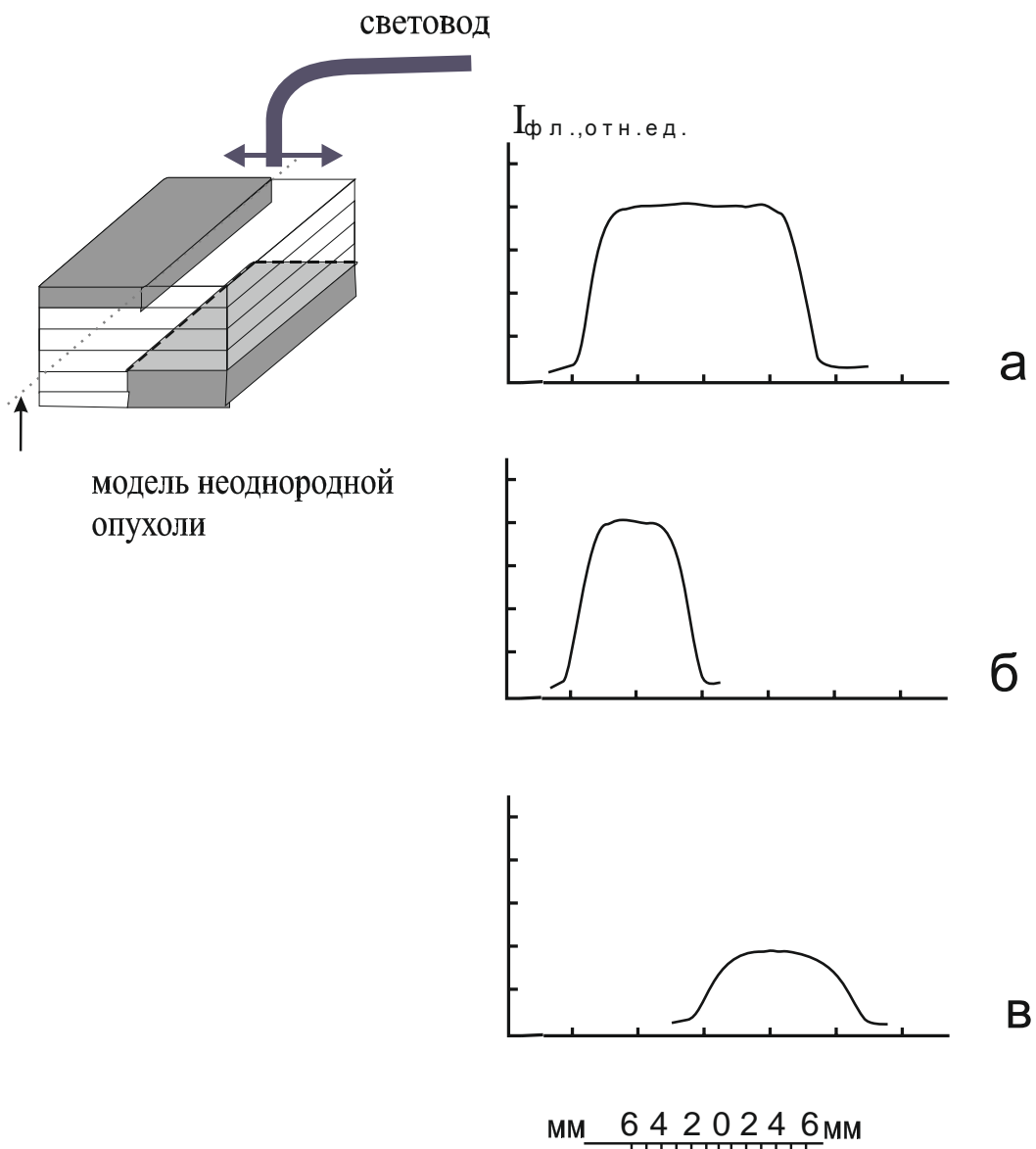


Рис.4.18. Зависимости интенсивности флуоресценции при сканировании фантома опухоли вдоль оси  $Z$ , а) - при возбуждении с  $\lambda = 660\text{нм}$ , б) - с  $\lambda = 355\text{нм}$ , в) - реконструированный профиль границы опухоли в глубине биоткани (4-10мм).

Поскольку при осуществлении флуоресцентной оптической биопсии требуется относительно небольшая доза красителя, то в принципе возможно увеличить число полос поглощения при фотосенсибилизации - путем создания смесей фотосенсибилизаторов. Таким образом можно увеличить разрешение по глубине и, следовательно, обеспечить возможность более точного определения распределения светочувствительных агентов в исследуемом образце биоткани.

На рис.4.18 представлена картина изменения флуоресцентного отклика от модели опухоли как в поверхностном слое, так и в глубине образца биоткани, при сканировании вдоль оси  $Z$ . В демонстрируемом случае окрашенные хлорином  $e_6$  четыре отдельных слоя мышечной ткани различной толщины подбирались таким образом, чтобы получить однородный флуоресцентный отклик от образца ткани суммарной толщиной  $\cong 10$  мм при сканировании вдоль оси  $Z$  (шаг сканирования 1 мм) и при длине волны возбуждения  $\lambda = 660$  нм (а).

Изменение длины волны возбуждения на  $\lambda = 355$  нм позволяет выявить распределение флуоресцентных агентов в поверхностном 4 миллиметровом слое (б). Вычитая полученные две кривые, мы получаем возможность реконструировать распределение красителя также во внутренней 4-10 мм глубинной зоне (в) и, таким образом, определить направления роста опухоли в глубинном слое биоткани.

Таким образом предложенная диагностическая техника дает новую возможность для клинических приложений: для обнаружения опухолевых клеток в различной глубине биоткани и, следовательно, для обнаружения направлений преимущественного роста опухоли прямыми флуоресцентными измерениями.

#### **Выводы главы 4**

Собрана волоконно-оптическая экспериментальная установка, на которой исследованы спектральные особенности нормальных и опухолевых биотканей методом лазеро- индуцированной флуоресценции без и при сенсбилизации туморотропными красителями.

На основе экспериментального и теоретического анализа выявлены физические аспекты процесса тушения автофлуоресценции в биотканях экзогенными фотосенсибилизаторами.

Выявлено и проанализировано влияние процесса переноса энергии электронного возбуждения на эффект снижения уровня автофлуоресценции в опухолевых тканях.

Продемонстрированы возможности флуоресцентной диагностики для ряда злокачественных опухолей у человека в клинических условиях, с помощью многочастотного YAG: Nd<sup>3+</sup> твердотельного лазера.

Исследованы спектры флуоресценции фотосенсибилизаторов второго поколения: хлорина *e*<sub>6</sub> и ZnTCФ; при этом показана возможность диагностики тканей на максимальной оптически достигаемой глубине.

Предложен и для экспериментальной модели опухоли продемонстрирован новый метод диагностирования с разрешением по глубине, с одновременным использованием лазерного возбуждения на различных длинах волн.

## ГЛАВА 5

### НЕЛИНЕЙНЫЕ ОПТИЧЕСКИЕ ЯВЛЕНИЯ В БИОТКАНИ

Воздействие светового поля высокой интенсивности кардинально меняет характер взаимодействия электромагнитного излучения с веществом. Особенности такого взаимодействия исследовались до сих пор в основном в материи небиологической природы. Однако, в последнее время значительно возрос интерес к подобным исследованиям также в области биологии и медицины, обусловленный, с одной стороны, разработкой и распространением достаточно простых источников лазерного излучения сверхкороткой длительности и, соответственно, высокой интенсивности, с другой стороны, резким ростом использования оптических методов в биомедицинских исследованиях и существенным расширением области применений лазерных источников излучения в клинической медицине.

Под воздействием высокоинтенсивного светового поля оптические параметры биотканей, такие как коэффициент поглощения ( $\gamma$ ), коэффициент рассеяния ( $\beta$ ), коэффициент преломления ( $n$ ), претерпевают значительные изменения и становятся зависимыми от интенсивности:

$$\gamma = \gamma_0 + \gamma_{NL}(I),$$

$$\beta = \beta_0 + \beta_{NL}(I),$$

$$n = n_0 + n_{NL}(I),$$

где введены зависящие от интенсивности дополнительные члены.

Данный механизм взаимодействия излучения с веществом проявляется в ряде нелинейных оптических явлений: зависимость коэффициента преломления от интенсивности может вызвать самофокусировку ( $\Delta n > 0$ ) или самодефокусировку ( $\Delta n < 0$ ) света в тканях; явления нелинейного поглощения и рассеяния могут вызвать соответственно самопросветление ( $\Delta\beta, \Delta\gamma > 0$ ) и самопомутнения ( $\Delta\beta, \Delta\gamma < 0$ ) среды; нелинейность коэффициентов  $n, \beta, \gamma$  может вызвать зависимость коэффициента отражения от интенсивности. Отметим также что в поле высокоинтенсивного светового излучения возможны также такие нелинейные явления, как генерация оптических гармоник, суммарной и разностной частоты, вынужденное комбинационное рассеяние, генерация оптического континуума и т.д.

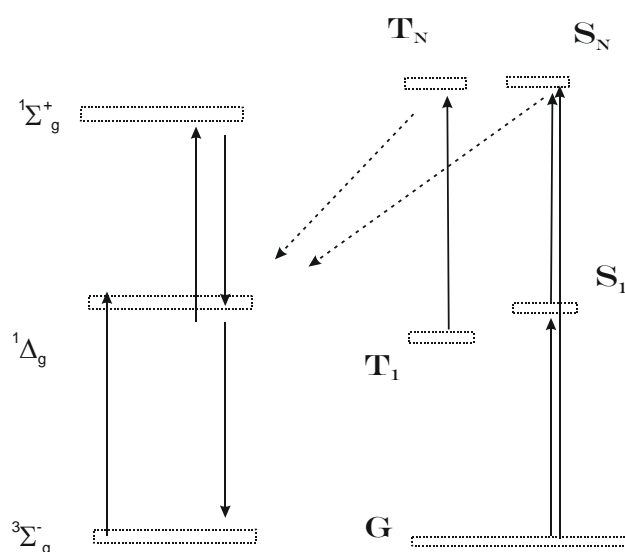


В последние годы ведутся активные научно-исследовательские работы по разработке и апробации новых методик применения высокоинтенсивного когерентного лазерного излучения в биологии и практических задачах лазерной медицины.

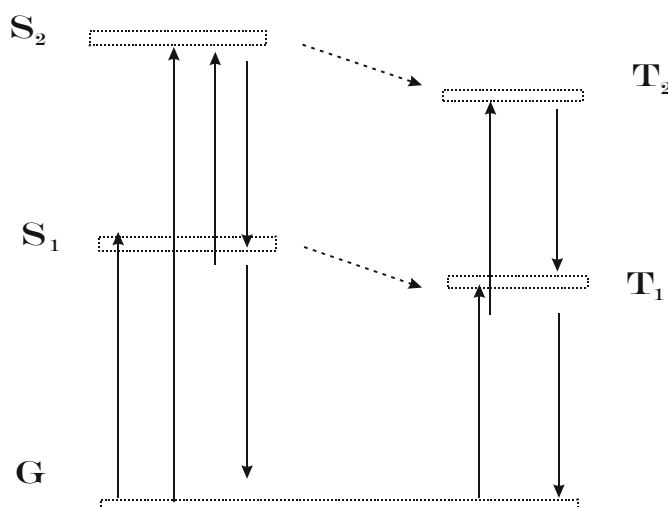
### **§5.1. Фотодеградация туморотропных красителей в сенсibilизированной биоткани при наносекундном лазерном облучении**

В настоящее время ведутся многочисленные интенсивные исследования по выявлению возможности использования лазерного излучения в медицине, в частности по использованию в терапии злокачественных опухолей. Отметим что противоопухолевое действие лазерного излучения в методе фотодинамической терапии в основном является результатом передачи энергии ультрафиолетового или видимого света, присутствующим в биоткани молекулам кислорода, посредством селективно накопленных в опухоли фоточувствительных органических молекул. При передаче энергии от возбужденных молекул сенсibilизаторов молекулам кислорода, находящимся в основном состоянии, образуется химически чрезвычайно активная форма кислорода - синглетный кислород. Активная форма кислорода известна своим сильным токсическим действием на клеточные структуры, вследствие чего и происходит непосредственное повреждающее действие на раковую клетку. Следует заметить, что описанная схема фототерапии происходит в условиях однофотонного поглощения света сенсibilизаторами при использовании непрерывных лазерных источников. Существенным недостатком такой схемы является то обстоятельство, что подбор противоопухолевых красителей с наличием значительного поглощения в области максимальной оптической прозрачности тканей (680-1000нм) затруднен вследствие того, что для указанных красителей энергетический уровень триплетного состояния ниже, чем для  $^1\Sigma^+g$  и  $^1g$  уровней синглетного кислорода (Рис. 5.1а), что приводит к резкому уменьшению фотогенерации синглетного кислорода.

Альтернативное направление фототерапии опухолей – это возбуждение высокорасположенных электронных состояний молекул туморотропного сенсibilизатора. При этом такой механизм фототерапии можно реализовать как нелинейным многофотонным, так и ступенчатым возбуждением.



а.



б.

Рис. 5.1. Схемы осуществления: а) -фотодинамического действия излучения на сенсibilизированную ткань и б)- двухступенчатого возбуждения органических молекул.

На рис. 5.1.б) схематически описано взаимодействие фотонов с органическими молекулами при двухступенчатом возбуждении. Математический аппарат описания взаимодействия интенсивного лазерного излучения с органическими молекулами был впервые предложен для описания и исследования другого нелинейного процесса – нелинейного поглощения излучения раствором с светопросветляющимся красителем [263]. В случае если одновременно рассматриваются синглетное и триплетное возбужденные состояния, а так же фотохимическое действие с высших возбужденных состояний, то система скоростных уравнений для зависящих от времени плотностей населенности возбужденных состояний имеет следующий вид [264]:

$$\begin{aligned}
 dN_1 / dt &= -I\sigma_1 N_1 + (k_{\phi l} + k_{\phi k}) N_2 + k_{T1} N_5 \\
 dN_2 / dt &= I\sigma_1 N_1 - (k_{\phi l} + k_{\phi k}) N_2 - I\sigma_2 N_2 - k_{MCK} N_2 + k_{Sn} N_3 \\
 dN_3 / dt &= I\sigma_2 N_2 - k_{Sn} N_3 - k_{C\Phi X} N_3 \\
 dN_4 / dt &= I\sigma_5 N_5 - k_{Tn} N_4 - k_{T\Phi X} N_4 \\
 dN_5 / dt &= k_{MCK} N_2 - I\sigma_5 N_5 + k_{Tn} N_4 - k_{T1} N_5 ,
 \end{aligned}
 \tag{5.1}$$

где  $I$  –поток фотонов,  $N_1, N_2, N_3, N_4, N_5$  - населенности соответственно  $S_0, S_1, S_n, T_1, T_n$  уровней,  $\sigma_{12}, \sigma_{23}, \sigma_{54}$  - сечения поглощения соответствующих переходов,  $k_{\phi l}, k_{\phi k}$  - скоростные константы девозбуждения первого возбужденного синглетного состояния посредством флуоресценции и внутренней конверсии соответственно,  $k_{MCK}$  - скоростная константа межсистемной конверсии ( $k_{MCK} = \nu_{MCK} / \tau_{S1}$ ),  $\nu_{MCK}$  -квантовый выход межсистемной конверсии,  $\tau_{S1}$  - время жизни  $S1$  состояния,  $k_{T1}$  - скоростная константа девозбуждения первого возбужденного триплетного состояния,  $k_{Sn}$  и  $k_{Tn}$  - скоростные константы девозбуждения соответствующих синглетных и триплетных возбужденных состояний.

Аналитическое рассмотрение системы скоростных уравнений (5.1) было проведено в работе [264] в которой было получено решение при следующих допущениях: населенности высших электронных состояний малы и соответственно можно пренебречь поглощением с этих состояний, времена жизни высших электронных состояний значительно короче, чем длительность импульса и для этих состояний применимо приближение:

$$dN_4 / dt \approx 0 \text{ и } dN_5 / dt \approx 0$$

При этом время жизни триплетного состояния  $T_1$  было принято бесконечным, ввиду того, что время девозбуждения  $T_1$  гораздо больше, чем длительность импульса и, следовательно:  $k_{T1} \approx 0$ .

В конечном виде система скоростных уравнений записывается в виде:

$$\begin{aligned} dN_1 / dt &= -I\sigma_1 N_1 + (k_{\phi_l} + k_{\phi_k}) N_2 \\ dN_2 / dt &= I\sigma_1 N_1 - (k_{\phi_l} + k_{\phi_k}) N_2 - I\sigma_2 N_2 - k_{MCK} N_2 + k_{S_n} N_3 \\ dN_5 / dt &= k_{MCK} N_2 - I\sigma_5 N_5 + k_{T_n} N_4 \end{aligned} \quad (5.2)$$

и решения упрощенной системы дают значения населенности для первого триплетного и синглетного состояний, после чего доля молекул, участвующих в фотохимических реакциях через высшие состояния, определяется в виде [264]:

$$P_{C\Phi X} = \int \varphi_{C\Phi X} I \sigma_2 N_2 dt \quad \text{и} \quad P_{T\Phi X} = \int \varphi_{T\Phi X} I \sigma_5 N_5 dt ,$$

где введен квантовый выход фотохимии через высшие триплетные и синглетные состояния:

$$\varphi_{C\Phi X} = k_{C\Phi X} / (k_{S_n} + k_{C\Phi X}) \quad \text{и} \quad \varphi_{T\Phi X} = k_{T\Phi X} / (k_{T_n} + k_{T\Phi X}).$$

Нами численными методами была решена данная система уравнений и получены непосредственные решения для вторых синглетных и триплетных состояний. На рис.5.2. приведены расчетные кривые населенностей при различных значениях длительности и фиксированной энергии одиночного импульса. Полученные значения населенностей позволяют в свою очередь получить величины  $P_{C\Phi X}$  и  $P_{T\Phi X}$  (рис.5.3), из которых следует, что необходимы достаточно высокие энергии импульса  $\approx$  кДж/см<sup>2</sup> для реализации фотохимии. Однако, отметим здесь, что фоторазрушения биообъектов имеют место уже при плотностях энергии  $\approx 10$  Дж/см<sup>2</sup>. Следовательно, приведенный анализ и рассуждения указывают на возможность осуществления многофотонной фотохимии только лишь при использованием цуга лазерных импульсов, где отдельные импульсы имеют относительно низкую энергию, однако в сумме они обеспечивают необходимую суммарную

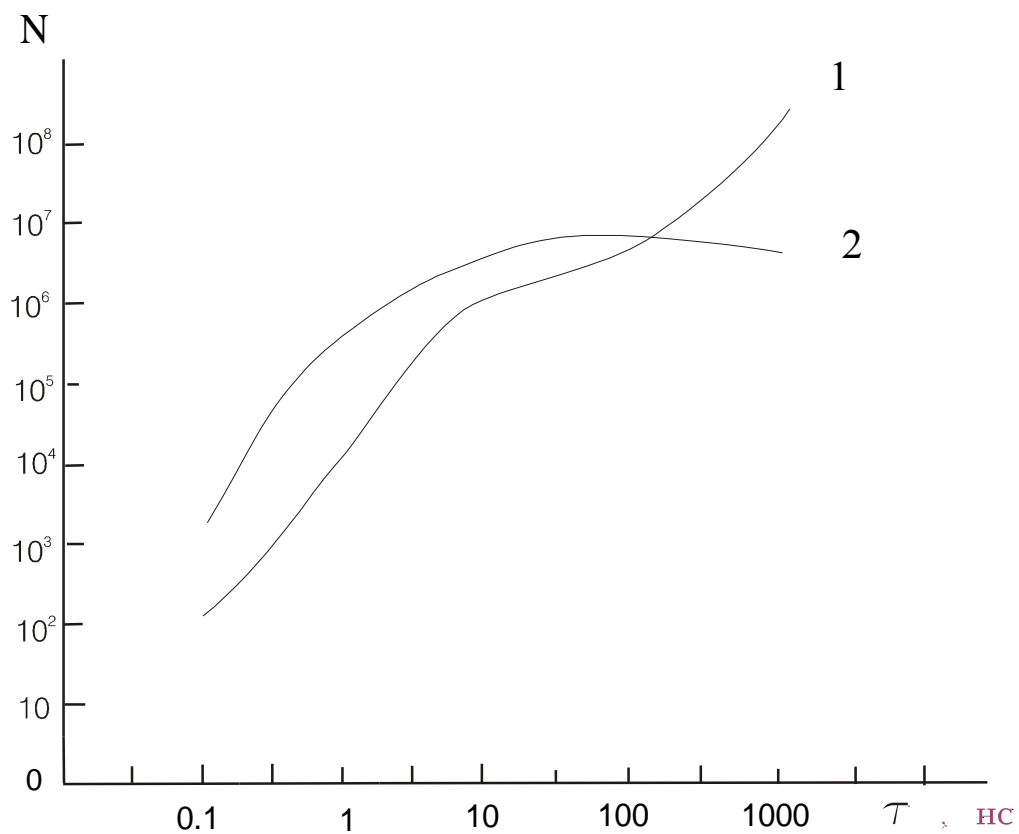


Рис.5.2. Зависимости населенностей второго синглетного (2) и триплетного (1) состояний для молекул типа гематопорфирин при изменении длительности импульса. Энергия возбуждения фиксирована и равна 100Дж.

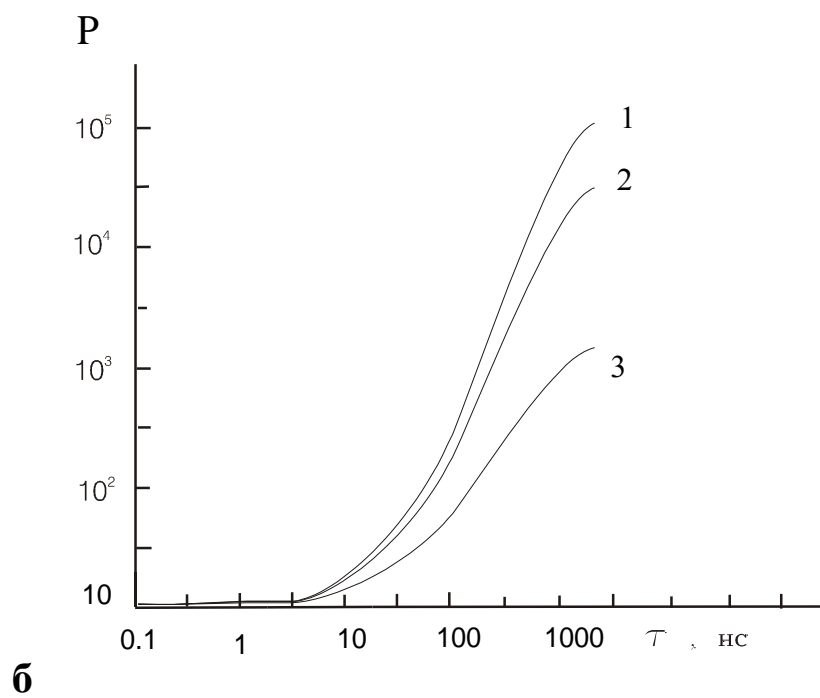
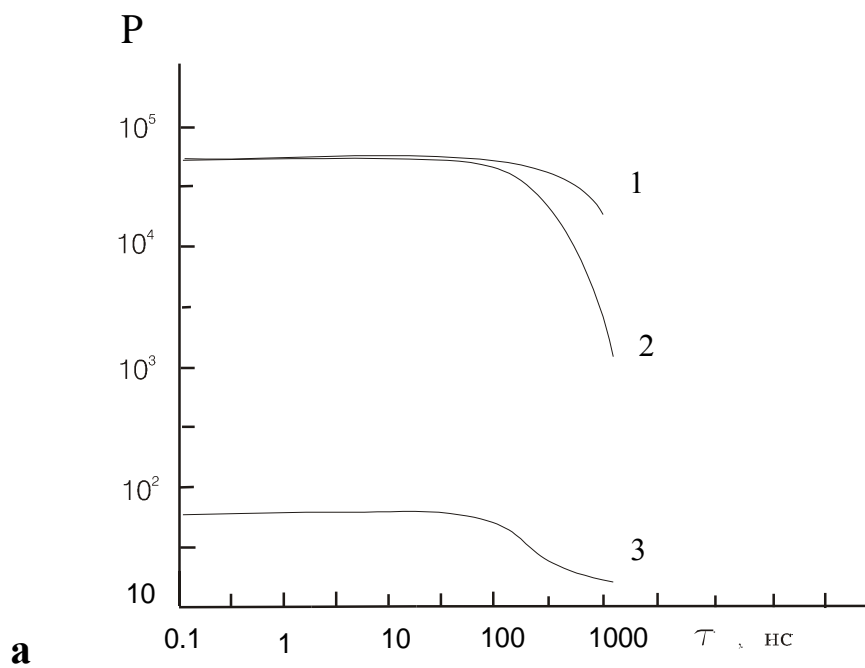


Рис. 5.3. Фотохимия через а) синглетное и б) триплетное состояния при энергии возбуждения 10кДж (кривая 1), 1кДж (кривая 2) и 0.1кДж (кривая 3).

терапевтическую дозу для осуществления ФДТ. Достоверные же выводы о эффективности, характере протекания и применимости рассматриваемого механизма в биомедицине могут дать только непосредственные экспериментальные исследования в клинике. Отметим, что в работе [265] показано увеличение эффективности фотосенсибилизации при облучении цугом пикосекундных импульсов с энергией в импульсе  $\approx 0.6$  Дж/см<sup>2</sup>.

Многофотонные процессы интенсивно протекают и экспериментально хорошо изучены при УФ облучении, вследствие высокой энергии фотонов в указанной спектральной области. Такие процессы, наблюдаемые в водных растворах при мощном УФ воздействии  $10^{13}$  -  $10^{15}$  Вт/м<sup>2</sup> и сопровождаются двухфотонным фотолизом воды [266-269]. В этих работах показано, что в случае водного раствора биомолекул образующиеся фотопродукты качественно отличаются от продуктов традиционной фотохимии, но близки к продуктам  $\gamma$  радиолиза. В работе [266] было показано, что электроны, образующиеся при фотолизе различных веществ, могут захватываться неоднородностями полярной среды, в которой эти вещества растворены. Образованные в растворе электроны которые захватываются водной матрицей, называются гидратированными электронами. Спектр поглощения гидратированных  $e^-$  электронов представляет неоднородно уширенную кривую в оптической области  $\lambda = 350-900$  нм, с максимумом при  $\lambda = 600$  нм. Время жизни гидратированных электронов при комнатной температуре порядка микросекунды и они при нагревании или облучении видимым светом приобретают подвижность и могут взаимодействовать с биомолекулами [267, 268]. В работе [269] наблюдалось образование гидратированных электронов в результате двухквантового процесса в условиях наносекундного ( $\tau = 10$  нс,  $\lambda = 266$  и  $\lambda = 355$  нм) и пикосекундного ( $\tau = 30$  пс,  $\lambda = 355$  нм) лазерного облучения. Было продемонстрировано, что образование фотопродуктов происходит более эффективно при пикосекундном возбуждении.

Образование свободных радикалов посредством оптического возбуждения красителей в высшие электронные состояния – еще одно альтернативное направление для фототерапии опухолей вследствие их непосредственного повреждающего действия на жизнедеятельность клетки [270,271].

В работах [272,273] было проведено исследование фотодиссоциация ПГП в водном растворе, при облучении лазерным излучением в УФ области и видимом областях спектра. При этом эффективность фотолиза красителя была более чем в 10 раз выше в случае двухступенчатого поглощения по сравнению с однофотонным поглощением. В работе [274]

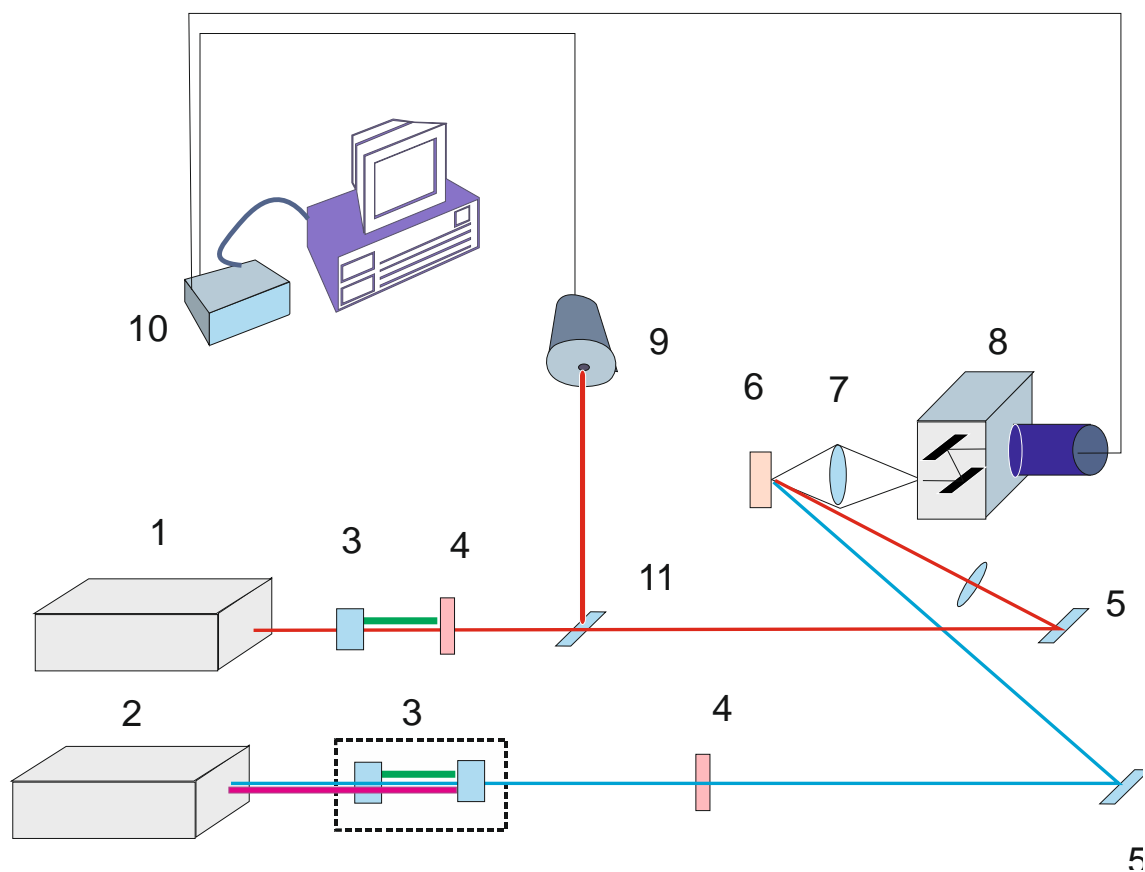


Рис 5.4. Схема экспериментальной установки для исследования фоторазрушения туморотропных красителей в биотканях. 1- пикосекундный АИГ:Nd лазер, 2- наносекундный АИГ:Nd лазер, 3- блоки преобразования частоты, 4- спектральные фильтры, 5-зеркала, 6- образец, 7- фокусирующая линза, 8- монохроматор (МДР-23), 9- ФЭУ, 10- персональный компьютер с блоком АЦП, 4- стеклянная пластина.



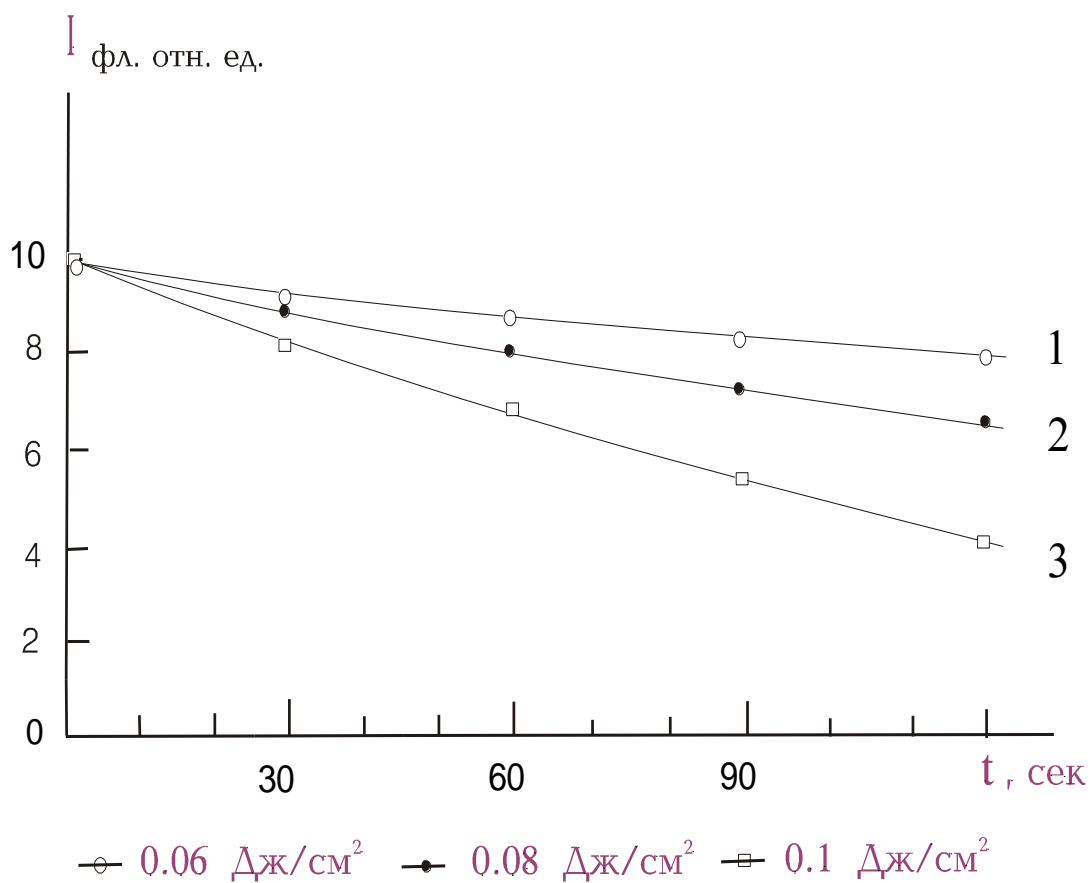


Рис. 5.5. Скорость уменьшения интенсивности флуоресценции хлорина  $e_6$  в тканях в зависимости от интенсивности облучения при  $\lambda = 532\text{нм}$  (частота импульсов 5Гц).

было исследовано фоторазрушение туморотропного красителя магний-фталоцианина ( $t_4$ -PcMg) в различных органических растворителях. При возбуждении высших электронных состояний  $t_4$ -PcMg излучением с длиной волны  $\lambda = 680$  нм и с интенсивностью  $\approx 10^{25}$  фотон/см<sup>2</sup>с, наблюдалось образование катион радикалов красителя. Фоторазрушающее действие образованных радикалов было продемонстрировано в клеточной культуре *murine hybridom CB-G*. Следует отметить, что при тех высоких уровнях концентрации энергии, которые обеспечивают в биоткани протекание нелинейных оптических процессов, возможно также фоторазрушение биообъектов. Так, в случае наносекундного облучения при таких энергиях обычно происходит процесс интенсивного образования лазерной плазмы и в ходе оптического зондирования регистрируется характерный спектр плазменного излучения [275]. Ввиду этого обстоятельства для наблюдения и спектрального анализа нелинейных эффектов в биотканях предпочтительно использование излучения с пикосекундной или фемтосекундной длительностью импульсов, что обеспечивает соответственно высокую пиковую мощность при достаточно низкой энергии.

Для исследования фоторазрушения туморотропных красителей в биотканях нами была использована экспериментальная установка, собранная на основе пикосекундного АИГ:Nd лазера с пассивной синхронизацией мод (рис.5.4) [276]. Интенсивность лазерного облучения образцов на длине волны  $\lambda = 1064$  нм составляла 100 МВт/см<sup>2</sup>, длительность одиночного импульса  $\tau = 33$  пс. Интенсивность лазерного облучения образцов на длине волны  $\lambda = 532$  нм составляла 20-50 МВт/см<sup>2</sup>, длительность одиночного импульса составляла  $\tau = 30$  пс. Мы использовали туморотропные органические фотосенсибилизаторы хлорин  $e_6$  и ПГП. Образцы биоткани промывались в чистом физиологическом растворе в течении 30 мин, после чего окрашивались в течении 5 мин в физиологическом растворе, содержащем краситель с концентрацией  $10^{-6}$  М. В завершение опыта, ткани 5 минут снова промывались в чистом физиологическом растворе. Фоторазрушение под влиянием лазерного излучения фототропных молекул, накопленных в образцах ткани животного, регистрировалось с использованием флуоресцентного метода. Для этого по ходу облучения интенсивным пикосекундным излучением с длиной волны  $\lambda = 532$  нм, образец зондировался пробным наносекундным излучением с длиной волны  $\lambda = 355$  нм. Как можно заметить из рис.5.5, начальная скорость уменьшения флуоресценции квадратично зависит от интенсивности облучения.

При этом значительное снижение уровня сигнала флуоресценции происходило в течении 2 минут и достигало уровня 40% от первоначального, что свидетельствует о

достаточно эффективным фоторазрушении молекул красителя-сенсibilизатора. Такое же уменьшение уровня сигнала флуоресценции сенсibilизатора наблюдалось при двухступенчатом пикосекундном возбуждении тканей сенсibilизированных ППП. При этом, в обоих случаях наблюдалось увеличение уровня собственной флуоресценции биоткани в синее-зеленой спектральной области (400-500 нм).

Как было указано в параграфе 2 четвертой главы, при использовании лазерного возбуждения с длиной волны  $\lambda = 355\text{нм}$ , в ткани сенсibilизированной хлорином  $e_6$  происходит тушение собственной флуоресценции в упомянутой спектральной области. Сенсibilизированная ткань в момент максимальной концентрации введенного красителя при облучении лазерным излучением показывает максимум флуоресценции красителя, и как результат действия тушения: минимум синее-зеленой автофлуоресценции. Ввиду того что уменьшение количества молекул красителя в ткани ведет к уменьшению эффективности тушения, то фотодиссоциация - возможная причина наблюдаемого повышения уровня синее-зеленой автофлуоресценции при пикосекундном облучении сенсibilизированной ткани.

Следует отметить, что наблюдаемая в растворах фотодиссоциация сенсibilизатора сопровождается образованием химически активных радикалов, которые генерируются вследствие двухступенчатого нелинейного поглощения, таким образом протекание подобного процесса в тканях может привести к эффективному разрушению селективно сенсibilизированных клеток. Заметим что применение нелинейных механизмов фоторазрушения увеличивает количество туморотропных красителей, могущих найти применение в фотохимиотерапии, так как имеется ряд фотосенсibilизаторов, которые имеют высокую степень способности селективно накапливаться в опухоли, но в режиме однофотонного поглощения обладают низким уровнем фототоксичности, в связи с низким уровнем образования синглетного кислорода. В нелинейном методе фототерапии опухолей, можно практически полностью избежать основного недостатка метода фотодинамической терапии - остаточной фоточувствительности кожи. Известно, что это побочное негативное явление сохраняется в течение приблизительно одного месяца после лазерной фототерапии и требует создания специального послеоперационного режима освещения.

## §5.2. Двухфотонная флуоресценция туморотропных красителей в биоткани при пикосекундном лазерном облучении

При воздействии мощного лазерного излучения органическая молекула может поглотить два (или более) фотона не только через реальные промежуточные резонансные электронные уровни (многоступенчатое поглощение), но также в их отсутствии (многофотонное поглощение), через промежуточные виртуальные электронные состояния. Известно что двухфотонное поглощение описывается вторым порядком приближения теории возмущения и для монохроматического лазерного излучения вероятность двухфотонного перехода, при условии, что только одно промежуточное состояние  $\varphi_k$  актуально, определяется выражением [277]:

$$w_{nm} = \frac{(8\pi)^2}{c^2 h^4} I^2(\omega) |M_{nk}|^2 |M_{km}|^2 \times \frac{\sin^2[(\omega_{nm} - 2\omega)t/2]}{[(\omega_{km} - \omega)^2 + \gamma_k^2/4](\omega_{nm} - 2\omega)^2},$$

где  $\gamma_k^{-1}$  - время жизни промежуточного состояния,  $M_{nk}$  - матричный элемент оператора возмущения для перехода из промежуточного состояния  $\varphi_k$  в состояние  $\varphi_n$ .

Из приведенной формулы видно, что вероятность двухфотонного перехода имеет существенно отличное от нуля значение при  $\omega_{nm} = 2\omega$ , то есть при условии резонанса по удвоенной частоте. Присутствие в данном выражении резонансного знаменателя  $\omega_{nm} - 2\omega$  указывает на обязательность сохранения энергии только для всего процесса двухфотонного перехода в целом. При этом время нахождения системы в промежуточном виртуальном состоянии определяется из соотношения неопределенностей:  $\Delta t_k \cong 2\pi/|\omega_{km} - \omega|$ . В течение этого интервала времени вероятность перехода в промежуточное состояние имеет такую же величину, что и при строгом резонансе  $\omega = \omega_{km}$ .

Если сравнивать со случаем однофотонного поглощения ( $\sigma \approx 10^{-16}$  см<sup>2</sup>), сечение двухфотонного поглощения значительно меньше:  $\sigma \approx 10^{-27}$  см<sup>2</sup>, при интенсивности  $I = 10$  Мвт/см<sup>2</sup> [277], что резко уменьшает возможность фотоповреждающего действия на

исследуемые биологические объекты, вызванного поглощением света. Следовательно, нелинейное возбуждение открывает возможности для исследований живых клеток с помощью многофотонной флуоресцентной микроскопии, которые при обычном возбуждении затруднены по причине фотоповреждения клеточных структур, особенно при облучении УФ излучением. Отметим также что при двухфотонном поглощении меняются квантово-механические правила отбора по симметрии молекулярных электронных состояний и становятся возможными переходы между электронными уровнями молекул, запрещенные для однофотонного процесса, что естественно открывает новые возможности для разработки высокоселективных оптических схем исследований.

Возможности такой нелинейной фотоселекции продемонстрированы, например, для случая молекул индола в работе [278], в которой показано, что в отличие от однофотонного возбуждения, сечение двухфотонного возбуждения флуоресценции молекул индола в несколько раз выше.

Отметим также что стандартные однофотонные методы спектрально-флуоресцентных исследований не обладают высокой специфичностью из-за наличия большого уширения молекулярных спектров поглощения и испускания, что существенно затрудняет их применение в случае сложных биосистем, которые, как правило, сильно гетерогенны по составу. Так, спектры флуоресценции липопротеидов плазмы крови человека образованы сильно перекрывающимися полосами испускания семи флуорофоров для липидной и шести флуорофоров для белковой области [279].

Современные фемто- и пикосекундные лазеры обеспечивают при фокусировке плотность мощности  $\approx 10^{27}$  фотонов/см<sup>2</sup>с, что позволяет легко возбуждать и регистрировать флуоресценцию биомолекул при двухфотонном возбуждении. Интерес к нелинейному возбуждению определяется несколькими причинами. Например, двухфотонное возбуждение позволяет исследовать флуоресценцию непрозрачных для обычного однофотонного возбуждения биологических объектов. Помимо этого, двухфотонное возбуждение сильно локализует флуоресцирующую область (рис.5.6), что приводит к снижению фоновых сигналов и улучшению контраста в флуоресцентных микроскопах, позволяет реализовывать внутреннее трехмерное разрешение в лазерных сканирующих микроскопах. Преимущества схемы двухфотонного возбуждения в конфокальной флуоресцентной микроскопии детально обсуждены и продемонстрированы в работе [280], где было показано, что при двухфотонном возбуждении конфокальный микроскоп не требует установки перед приемником диафрагмы для дискриминации флуоресценции, испущенной вне детектируемого объема, а также, позволяет избежать использование УФ -

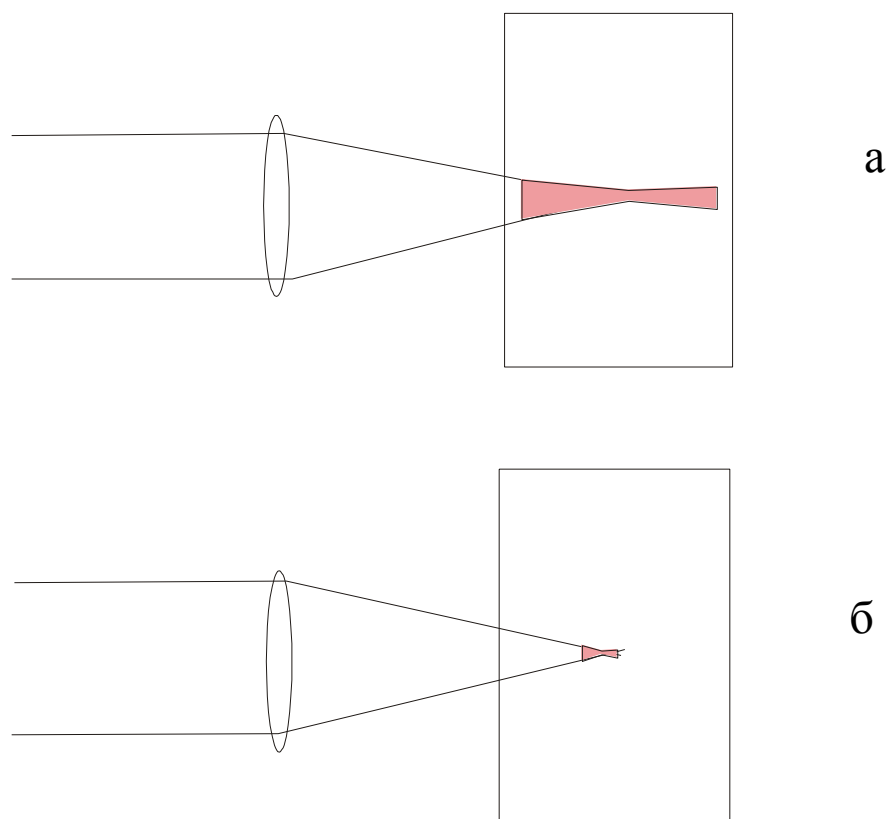


Рис. 5.6. Схемы возбуждения лазервозбуждаемой флуоресценции -  
а- обычная однофотонная  
б- нелинейная многофотонная

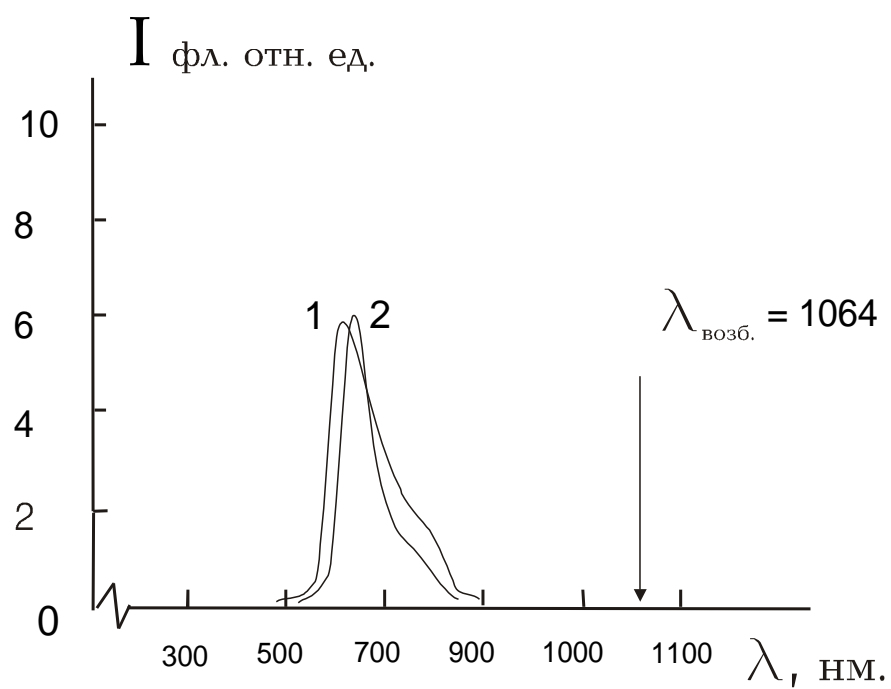


Рис.5.7. Двухфотонно возбужденные спектры флуоресценции от окрашенных производной гематопорфирина (1) и хлорина  $e_6$  (2) мышечных тканей курицы, при пикосекундном возбуждении.

оптических элементов, обычно применяемых при однофотонном возбуждении. Также отметим, что для практического использования двухфотонного возбуждения существенное значение имеет то обстоятельство, что такое возбуждение не приводит к заметной потере основного преимущества флуоресцентных методов - высокой чувствительности детектирования. В работе [281] было продемонстрировано, что при использовании современных методов регистрации двухфотонно возбуждаемая флуоресценция может наблюдаться при концентрации флуорофоров  $10^{-9}$  Моль. Помимо результатов, полученных в оптически однородных растворах биомолекул, особый интерес вызывают экспериментальные данные по биотканям, так как интенсивное рассеяние света в оптически неоднородной органической среде - серьезный ограничивающий фактор для нелинейных оптических эффектов. Например в работе [282] была продемонстрирована возможность визуализации кожной ткани в условиях *in vivo* на глубине до 150 микрон методом многофотонной флуоресценции. Четыре структурно-различимых слоев эпидермиса и дермы были отчетливо выявлены. В дермальном слое, четко прослеживались волокнистые структуры коллагена и эластина, при этом не отмечалось никаких визуально наблюдаемых фотоповреждений. Было показано, что патологические состояния, такие как атипичные изменения в клеточной морфологии могут быть идентифицированы.

На рис. 5.7 приведены полученные нами спектры флуоресценции [283], нелинейно возбужденных цугом пикосекундных импульсов, окрашенных туморотропными красителями ППП и хлорином  $e_6$  непрозрачных мышечных тканей. Лазерное излучение на длине волны 1.06 мкм фокусировалось на образец прокрашенной биоткани в пятно с площадью  $2\text{мм}^2$ . Энергия цуга пикосекундных импульсов составляла  $\approx 25\text{мДж}$ . При этом локализации максимумов в спектрах флуоресценции красителей совпадают со случаем однофотонного возбуждения с длиной волны 532 нм. Отметим, что в случае двухфотонного возбуждения практически отсутствует флуоресцентный фон. Это можно объяснить более эффективным по сравнению с эндогенными пигментами двухфотонным поглощением введенного красителя. В случае использования наносекундного лазерного излучения той же самой длины волны и плотности энергии спектры флуоресценции не были зарегистрированы, вследствие того, что поперечное сечение двухфотонного поглощения на несколько порядков меньше, чем при пикосекундном облучении.

Таким образом, 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 оптического диагноза.

### **§5.3. Определение роли коллагеновых макромолекул в эффекте генерации оптической второй гармоники в биоткани**

Многофотонные оптические процессы в биологических объектах, происходящие под действием интенсивного лазерного излучения используются также для развития чувствительных и селективных методов когерентной нелинейной спектроскопии биомолекул. Под воздействием интенсивного электромагнитного поля в среде наводится поляризация, которую можно представить в виде:

$$P_i = \Sigma \chi_{ki} E_k + \Sigma \chi_{kli} E_k E_l + \Sigma \chi_{klmi} E_k E_l E_m + \Sigma \chi_{klmni} E_k E_l E_m E_n +$$

Здесь первый член описывает линейный отклик, второй и последующие члены описывают отклик нелинейной поляризации среды,  $\Sigma \chi_{ki}$  - коэффициент линейной восприимчивости среды,  $\chi_{kli}, \chi_{klmi}, \chi_{klmni}$  - коэффициенты нелинейной восприимчивости среды, соответственно второго, третьего и четвертого порядка. Как известно коэффициенты нелинейной восприимчивости среды второго и четвертого порядка равны нулю в изотропных средах и centrosymmetric кристаллах, что вытекает из условия  $\chi = -\chi$ .

Лазерные эффекты, связанные с нелинейной поляризуемостью молекул, наблюдались в различных биологических системах, при использовании нано и пикосекундного излучения. В работе [284] была исследована эффективность генерации второй гармоники в поликристаллических образцах некоторых органических соединений. Было показано, что кристаллы аминокислот обладают нелинейными восприимчивостями по величине порядка эффективного нелинейного кристалла ниобата лития. Эффекты трехфотонного смешения и ГВГ, обусловленные дипольной нелинейной восприимчивостью второго и четвертого порядка, соответственно, наблюдались в оптически активных растворах арабинозы [285]. В указанном случае нелинейные восприимчивости четных порядков не равны нулю вследствие хиральности этих растворов [286].

Достаточно перспективной оказалась методика ГВГ в случае исследования таких специфических биосистем, как электрически ориентированные пурпурные мембранные пленки (ОПМП) и пленки Ленгмюра - Блоджетта. В работе [287] был оценен нелинейный оптический коэффициент второго порядка ( $1.05 \cdot 10^{-9}$  ед СГСЭ) и предлагалось использовать

процесс ГВГ пикосекундных импульсов для измерения сверхкороткого фотоэлектрического отклика ОПМП.

В работе [288] была экспериментально обнаружена оптическая анизотропия зубов. Наличие оптической анизотропии среды значительно увеличивает эффективность нелинейного процессов генерации оптических гармоник. Эффект ГВГ наблюдался при интенсивном пикосекундном облучении ( $\approx 1 \text{ ГВт/см}^2$ ) твердых человеческих тканей: дентине и зубной эмали [289]. В оптически анизотропной среде зубной ткани, которую можно схематично представить как смесь гидроксиапатит-вода-коллаген, ответственным за ГВГ, в основном является гидроксиапатит, представляющий собой нецентросимметричный неорганический кристалл. При этом, авторы не исключали возможность того, что определенный вклад в процесс ГВГ могут принести молекулы коллагена, представляющие собой молекулярные квазикристаллы.

На рис.5.8 представлена экспериментальная установка, собранная нами для исследования ГВГ в биотканях [290-292]. Был использован пикосекундный лазер с пассивной синхронизацией мод. Энергия одиночного пикосекундного импульса на длине волны 1.06 мкм после усиления составляла  $\approx 1.5 \text{ мДж}$ . Длительность импульса составляла  $\approx 33 \text{ пс}$ . Лазерное излучение фокусировалось на образец биоткани линзой с фокусным расстоянием  $f = 100 \text{ мм}$  в пятно с площадью  $0.5 \text{ мм}^2$ . Исходящий от образца ткани световой сигнал регистрировался системой монохроматор - ФЭУ. Образцы тканей исследовались как в воздушной среде при комнатной температуре, так и в водяной кювете с регулируемой температурой.

На рис.5.9а приведен сигнал второй гармоники с узкой спектральной шириной  $\Delta\lambda \approx 1 \text{ нм}$ , зарегистрированный в некоторых образцах тканей животных, при пикосекундном облучении. ГВГ наблюдалось как в схеме прохождения, так и в схеме отражения. Максимальное соотношение сигнал/фон в спектральном диапазоне 300 - 800 нм составляло  $\approx 20$ . При сохранении неизменной оптической схемы возбуждения-регистрации и энергии накачки, но при переключении режима генерации лазера на наносекундный диапазон ( $\tau = 15 \text{ нс}$ ), ГВГ не наблюдалось. Увеличение энергии наносекундного импульса, начиная с 2 мДж приводило к интенсивному плазмообразованию (рис. 5.9б) и на фоне фотоэмиссионных спектров Са и других микроэлементов сигнал ВГ практически не детектировался.

В таблице 5.1 приведены данные по интенсивности ГВГ от различных типов тканей, при значении величины фонового сигнала в несколько условных единиц. Генерация ВГ в костных тканях подобна процессу ГВГ в монокристаллических порошках. Так как костная ткань содержит большое количество минерального компонента (порядка 70%), основная

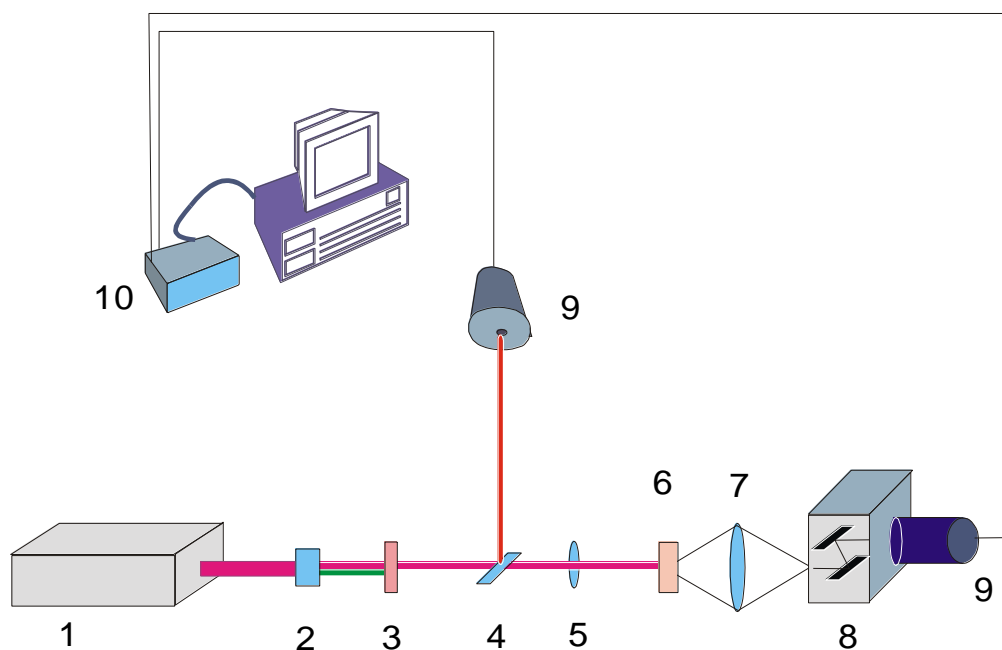
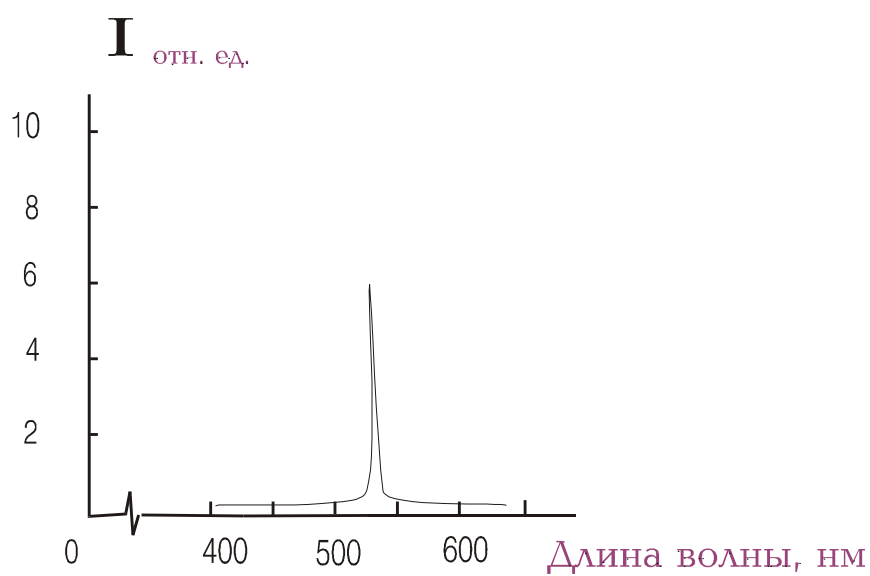
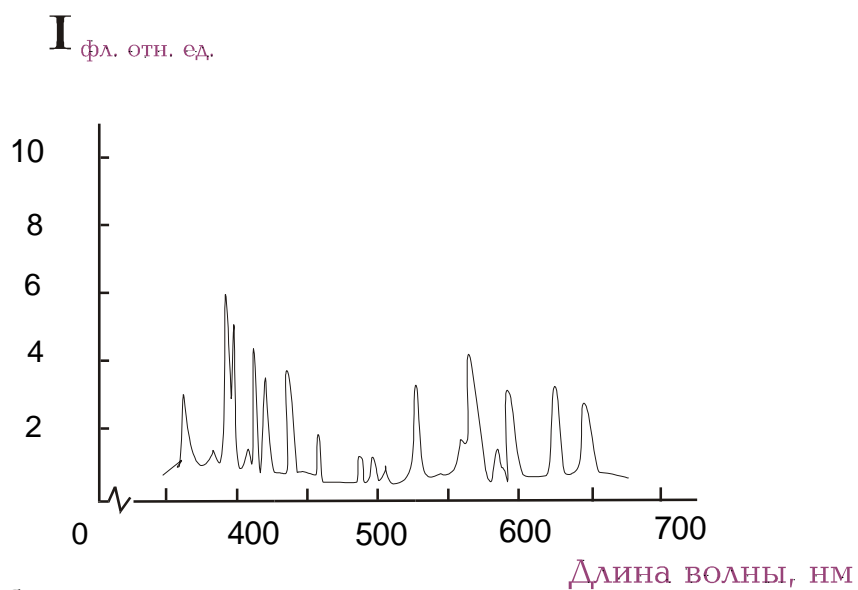


Рис.5.8. Экспериментальная установка для исследования ГВГ в биотканях, где 1- пикосекундный АИГ Nd<sup>3+</sup> лазер, 2 - нелинейный кристалл, 3- спектральный фильтр, 4- стеклянная пластина, 5, 7 - фокусирующие линзы, 6 - образец, 8 - спектрометр, 9 - фотоприемники, 10 - персональный компьютер с блоком АЦП.



а.



б.

Рис. 5.9. Спектрограммы: а- сигнала второй гармоники от образца тканей сухожилия курицы ( $\lambda = 532\text{nm}$ ) при пикосекундном режиме облучения, б) -плазменной эмиссии того же образца в наносекундном режиме облучения.

	Эффективность ГВГ (отн.ед.)	Содержание коллагена (%)
Дерма	100	20-30
Эпидермис	100-150	30-50
Мышечная ткань	20-30	5-7
Сухожилия	200-300	60-70
Фасции	150-200	50-60
Хрящи	250-300	60-70
Костная ткань	>1000	5-10
Растительная ткань	3	0
Уровень шумов	3	0

Таблица 5.1. Эффективность ГВГ в различных типах биотканей.

часть которого - гидроксипатит  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$  присутствует в виде игольчатых кристаллов, то при размерах монокристалликов порядка  $L_{\text{ког}}$  происходит эффективная генерация ВГ.

Сопоставление приведенных в таблице величин с гистологическими данными позволяет сделать вывод, что эффективная ГВГ происходит в тканях с большим содержанием фибриллярного белка коллагена. Полипептидные цепи фибриллярных белков упорядоченно и компактно располагаясь относительно одной оси образуют длинные волокна (фибриллы) или слои довольно больших размеров и обладающих двулучепреломлением. Молекулы коллагена, состоят из трех закрученных в спираль  $\alpha$  полипептидных цепочек, имеют длину  $\approx 200\text{-}300\text{нм}$  и при полимеризации в организме образуют фибриллы. Параллельные пучки таких фибрилл, образуют волокна с диаметром  $\approx 3\text{ мкм}$  и длиной  $20\text{-}50\text{ мкм}$ , которые формируют плотную соединительную ткань - сухожилия, связки, хрящи, в которых содержание коллагена составляет  $\approx 50 - 70\%$ . Ввиду того что характерные размеры упорядоченных, анизотропных структур в фибриллярных тканях животных и человека имеют порядок длины когерентного взаимодействия  $L_{\text{ког}} = \delta_1/4(n_2 - n_1)$ , 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).

Нами был использован прозрачный двулучепреломляющий образец фасции толщиной  $L = 90\text{ мкм}$  для оценки коэффициента нелинейности второго порядка. Определялось отношение  $A = I_{2\omega} / I_{2\omega\text{KDP}}$ , где  $I_{2\omega}$  - интенсивность ВГ при нормальном падении на образец,  $I_{2\omega\text{KDP}}$  - интенсивность ВГ в образце порошка кристалла KDP той же толщины и при той же интенсивности накачки. Из выражения для интенсивности ВГ [293]:

$$I_{2\omega} = \frac{52.2 \times d^2 L^2 I^2 \left( \frac{\sin x}{x} \right)^2}{n_1^2 n_2^2 \lambda_2^2},$$

где  $I$  - интенсивность основного излучения,  $\delta = 2\pi L (n_2 - n_1) / \lambda_2$ , следует:

$$d = \frac{d_{\text{KDP}} \sqrt{A n_2 / n_{2\text{KDP}} n_1 L_{\text{KDP}} x}}{n_{1\text{KDP}} L \sin x},$$

Подставляя экспериментально найденное значение  $A = 9 \times 10^{-4}$ ,  $n_2 \cong n_1 \cong 1.4$ , а также полагая  $\sin x/x \approx 1$ , что имеет место в тонких образцах, получим:  $d = 0.3 \times 10^{-12}$  ед. СГСЭ.

Исходя из того что тензоры нелинейной восприимчивости среды зависят от пространственной организации ее структуры, а пространственная структура белков чувствительна к различным внешним воздействиям, нами исследовалось влияние одного из таких внешних факторов - температуры на эффективность ГВГ в тканях.

На рис.5.10 (кривая1) приведена зависимость интенсивности сигнала ГВГ от температуры полученная при исследовании образцов сухожилия курицы в воде. Сигнал ГВГ регистрировался по схеме отражения, углы падения лазерного луча и регистрации сигнала составляли  $45^\circ$  относительно нормали к поверхности образца. Образец биоткани механически жестко фиксировался для избежания влияния деформаций при повышении температуры. При этом скорость повышения температуры для всех образцов оставалась неизменной и соответствовала однородному нагреву всего объема. Как видно из рисунка в интервале температур  $57-65^\circ\text{C}$  наблюдается резкий спад интенсивности ГВГ до уровня шумов. При последующем охлаждении образца, нагретого до  $70^\circ\text{C}$ , способность генерировать ВГ не восстанавливалась. Отметим что диапазон температуры, при которых происходил спад интенсивности ВГ в два раза, находился в интервале  $60-64^\circ\text{C}$ . Хорошо известно, что в этом диапазоне температур молекула коллагена претерпевает необратимую конформационную перестройку: фазовый переход типа спираль – клубок, то есть превращение жестко упорядочной, двулучепреломляющей структуры в практически изотропную макромолекулу. Следовательно в этом случае ответственная за ГВГ квадратичная нелинейная восприимчивость биомолекулы будет равна нулю.

Были проведены также исследования по выявлению температурной зависимости интенсивности рассеяния лазерного излучения на двух длинах волн, участвующих в процессе ГВГ - на длине волны  $\lambda = 1064$  нм ( кривая 3, рис.5.10) и  $\lambda = 532$  нм (кривая 2, рис. 5.10). При этом наблюдалось повышение ( $\approx 15\%$ ) интенсивности рассеянного света в диапазоне температур, соответствующему интервалу, где интенсивность сигнала второй гармоники резко уменьшается. Таким образом, конформационная трансформация биомолекул приводит к относительно слабому изменению коэффициента рассеяния биоткани, и влияние указанного эффекта на температурную зависимость ГВГ в тканях можно пренебречь.

Заметим что переход спираль-клубок белков подобен фазовому переходу первого рода. При этом значения температурного интервала  $\Delta T$  и температуры плавления  $T_{пл}$

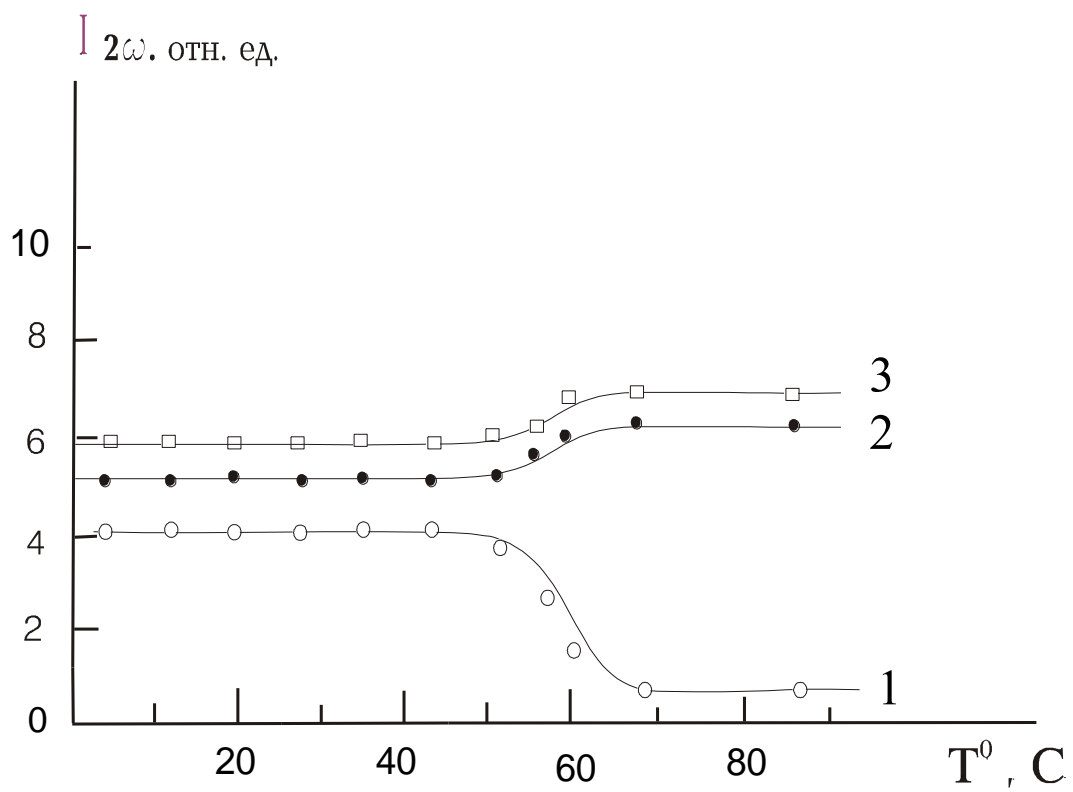


Рис.5.10. Температурная зависимость интенсивности сигнала второй гармоники  $\lambda = 532\text{нм}$  от образца тканей сухожилия курицы при пикосекундном режиме облучения.



содержат информацию о теплоте плавления и термостабильности макромолекул. Эти параметры в основном определяют по температурной зависимости оптической активности, вязкости УФ поглощения и т. д., которые по форме ближе к кривым 2 и 3 рис.5.10, то есть до и после плавления имеют величину одного порядка, в то время как величина сигнала ВГ изменяется на 1-2 порядка. Отметим также что традиционные линейные методы позволяют исследовать в основном растворы молекул. Описанная в диссертационной работе методика ГВГ позволяет определять  $\Delta T$  и  $T_{пл}$  в твердых, в том числе, сильно рассеивающих образцах. Таким образом, проведенное экспериментальное исследование показывает, что наличие в тканях животных эффекта ГВГ позволяет применить методы нелинейной оптики для исследования конформационных превращений молекул коллагена в тканях, а также тепловое воздействие электромагнитного излучения на определенные типы тканей и т. д. Несомненно важным преимуществом указанной методики является возможность проведения исследований в условиях “*in vivo*”.

#### **§5. 4. Применение метода ГВГ в диагностике фототермальных повреждений биоткани**

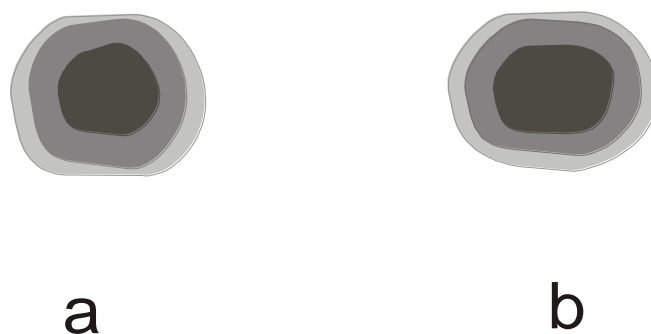
Оптический мониторинг биоткани находится в ряду приоритетных направлений исследований в области лазерной биомедицины. Как было показано в исследованиях последних лет, новые уникальные возможности для практических применений могут дать нелинейные оптические методы [294-297]. Однако, следует отметить, что осуществление лазерной диагностики биологических тканей происходит в условиях сильного оптического рассеяния, которое приводит к снижению интенсивности зондирующего лазерного пучка и, следовательно, вызывает резкое снижение амплитуды нелинейного отклика.

Среди нелинейных оптических методов, одним из наиболее перспективных является метод генерации второй оптической гармоники. Как известно, в 1986 году Фройнд и др. [298] продемонстрировали применимость техники ГВГ для биоткани. Виды биоткани, в которых может протекать эффективная ГВГ, достаточно редки; так в работе [298] были использованы образцы в достаточной степени оптически прозрачных сухожилий, взятых из хвостовых тканей лабораторных крыс. Отметим, что требование оптической прозрачности

биоткани было сильным ограничительным фактором для дальнейшего развития возможностей метода ГВГ в биомедицине и для оптического анализа различных типов биоткани. Однако, в работах [290-292] нами было показано, что во время облучения излучением пикосекундного Nd:YAG лазера достаточно эффективная ГВГ происходит в различных типах мягких биологических тканей, в том числе, в образцах тканей мышц, жира, кожи, которые представляют собой сильно неоднородную оптическую среду для светового излучения. Го и др. [299] сообщили аналогичные результаты как для пикосекундного, так и для фемтосекундного лазерного зондирующего излучения. Позже [300-302] были продемонстрированы возможности метода генерации второй гармоники в схеме оптической томографии. Так Го и др. [300] показали возможность нелинейно-оптического анализа структуры приповерхностного слоя слизистой оболочки тканей с использованием фемтосекундного лазера. 2D изображения образца слизистого мешочка щеки хомячка были получены путем сканирования сигнала второй гармоники при различных боковых и осевых позициях.

Нами были изучены также возможности метода ГВГ при процедурах лазерного фотонагрева, абляции и сварки биоткани в различных образцах, с использованием пикосекундного облучения [303-311]. Схема экспериментальной установки представлена на Рис. 5.8. В качестве зондирующего излучения применялось импульсное излучение YAG: Nd лазера, которое было линейно поляризовано и представляло цуг пикосекундных импульсов (длительность отдельного импульса составляла  $\tau_{\text{имп}} = 33\text{пс}$ , энергия цуга была равна 20мДж.

Биологические образцы были взяты из тканей сухожилий и фасций, содержащих большое количество коллагена. При этом, в данных образцах молекулы коллагена организованы в микрофибриллы, которые образуют тканевые структуры с участками, имеющими плотную параллельную упаковку фибрилл. Рис. 5.11 демонстрирует двумерную картину распределения интенсивности сигнала ГВГ в образцах фасции и сухожилия. Как видно из рисунка, в результате лазерного нагрева образцов ткани сухожилий, образцов и фасции амплитуда нелинейного сигнала ГВГ снизилась более чем в 6 раз в области образца, подвергнутой фотонагреву. При этом картина распределения интенсивности сигнала ГВГ после лазерного нагрева поверхности в образцах фасций отличается от случая сухожилий. В случае фасции лазерное облучение вызывает денатурацию коллагеновых молекул, которая происходит в симметричной геометрии. В случае сухожилия мы имеем картину с эллиптической геометрией, где большая ось параллельна ориентации волокон.



Интенсивность ГВГ (отн.ед.)

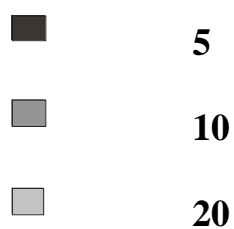
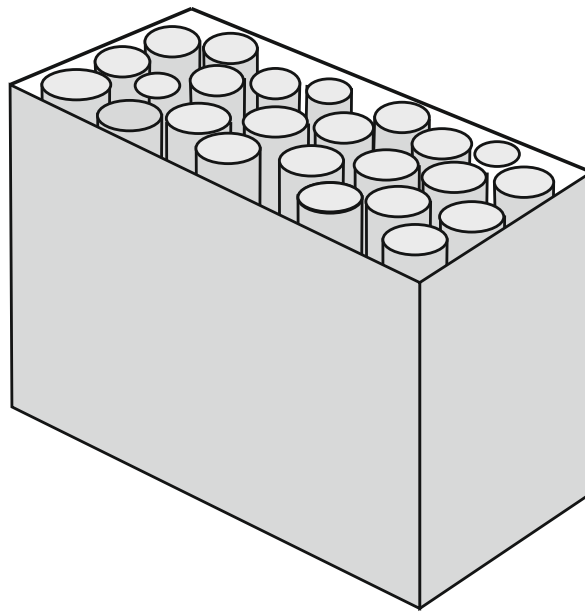


Рис.5.11. Картина распределения интенсивности ГВГ после лазерного нагрева поверхности в образцах а фасции и б сухожилия. В случае фасции лазерное облучение вызывает денатурацию коллагеновых молекул, которая происходит в симметричной геометрии. В случае сухожилия мы имеем картину с эллиптической геометрией, где большая ось параллельна ориентации волокон.

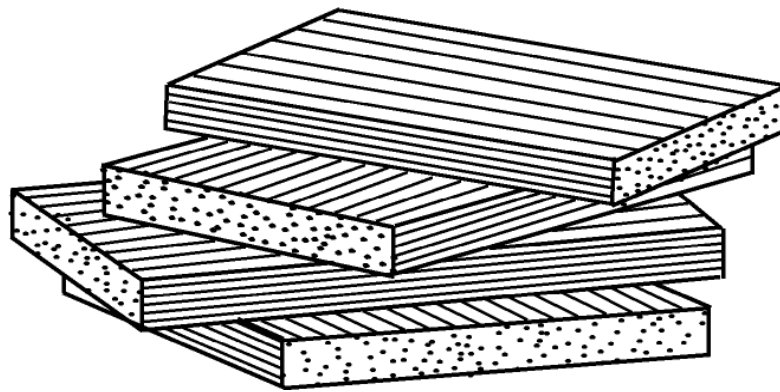
Этот результат можно объяснить, предположив, что проводимость тепла в образцах сухожилий и фасций отличается из-за разницы в тканевой организации. В случае фасции, обладающей слоистой тканевой структурой (рис. 5.12б), каждый слой имеет выделенную ориентацию фибрилл коллагена, по направлению которой тепло проводится более эффективно, однако наличие множества слоев с различными ориентациями фибрилл дает в итоге симметричное распределение сигнала ГВГ. В случае же жестко ориентированного типа биоткани, каким является сухожилие, где коллагеновые фибриллы жестко ориентированы только в одном направлении, распределение ГВГ имеет эллиптическую форму, так как тепло распространяется более эффективно вдоль коллагеновых фибрилл.

Нами была также исследована поляризационная зависимость сигнала ГВГ в образцах биотканей, имеющих разную структуру [306]. 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. С этой целью образцы выдерживались в течение 5 минут в физиологическом растворе, содержащем краситель родамин 6Ж в концентрации  $10^{-4}$  Моль. После этого образцы промывались чистым физиологическим раствором также в течении 5 минут. Оба нелинейных оптических сигнала ДФФ и ГВГ наблюдались одновременно при облучении пикосекундным лазером. Образцы сухожилия были толщиной 0.5мм и состояли из параллельно расположенных коллагеновых волокон (рис. 5.12а). Биоткань облучалась линейно поляризованным пучком в геометрии, когда плоскость поляризации была как параллельна, так и перпендикулярна ориентации биофибрилл.

Результаты измерений показали, что явления генерации второй гармоники и двухфотонной флуоресценции имеют различную поляризационную зависимость. Величина сигнала ГВГ была примерно в 2,5 раза больше в случае, когда поляризация лазерного луча была параллельна коллагеновым волокнам (рис. 5.13а), чем в перпендикулярном случае (рис. 5.13б). Однако в отличие от ГВГ, сигнал ДФФ не проявлял какой-либо зависимости от поляризации падающего пучка. Отметим здесь, что процессы ДФФ и ГСП происходят одновременно в образце биоткани и оба квадратично зависят от интенсивности зондирующего пучка, так что изменение интенсивности зондирующего пучка, обусловленное рассеянием в биоткани, будет иметь одинаковое влияние на оба этих процесса.



**а**



**б**

Рис. 5.12. Схематическое представление структуры биоткани:

а) - сухожилие, б) - фасция.

Обратим внимание также, что излучение ГВГ при линейно-поляризованном исходном пучке было частично поляризовано. Для образцов сухожилий толщиной 0,5 мм степень поляризации ГВГ составляла:

$$P(2\omega) = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp}) = 0.5$$

Чтобы выявить причину наблюдаемой поляризационной зависимости, нами в отдельном эксперименте были исследованы особенности прохождения линейно поляризованного пучка слабой интенсивности в том же образце сухожилия и в той же экспериментальной схеме. Был выбран соответствующий низкий уровень интенсивности поляризованного пучка, при распространении которого в биообразце, многофотонные процессы не протекали.

Было зарегистрировано, что интенсивность прошедшего пучка в 4,9 раза больше (слабое рассеяние) при параллельной поляризации, чем при перпендикулярной поляризации (сильного рассеяние). Поскольку сигнал ДДФ не поляризован, разница в поляризационных свойствах ДДФ и ГВГ может быть объяснена, если предположить, что оба нелинейных сигнала наиболее интенсивно протекают в тонком поверхностном слое образца, обращенного к лазерному облучению. При дальнейшем распространении в упорядоченной ткани образца неполяризованное излучение ДДФ и частично поляризованное излучение ГВГ по разному подвержены рассеянию света. Таким образом, мы можем заключить, что различная степень рассеяния поляризованного луча в зависимости от ориентации фибрилл в упорядоченной ткани является основным фактором, объясняющим полученные экспериментальные результаты.

Таким образом, мы можем заключить, что рассеяние поляризованного пучка является основным механизмом объяснения полученных экспериментальных результатов, а зависимость поляризации ГВГ от типа организации коллагеновой ткани показывает, что метод ГВГ может быть действенным инструментом в задаче раннего выявления заболеваний, связанных с нарушениями структуры биоткани.

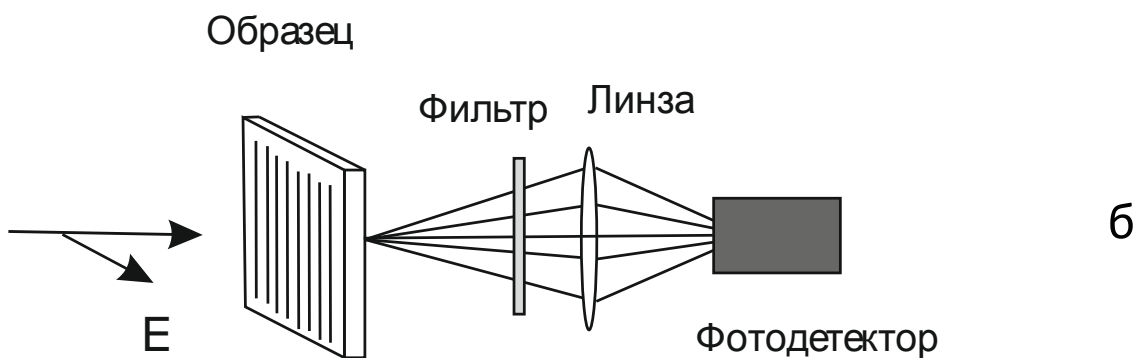
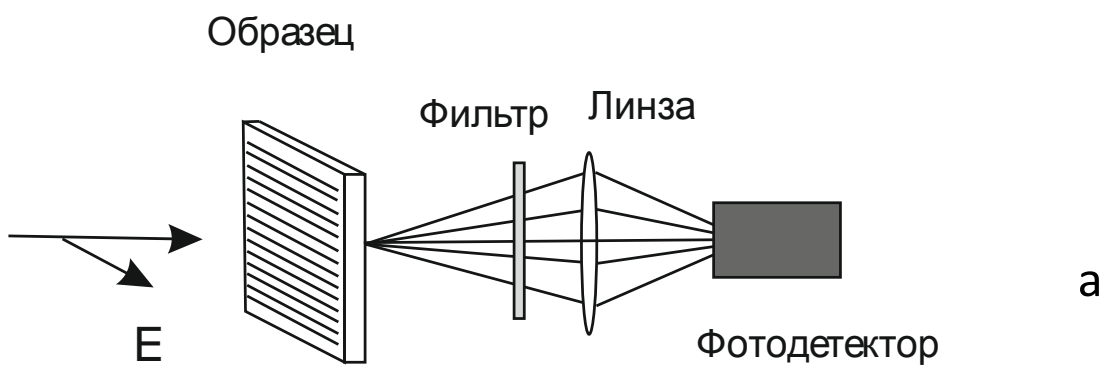


Рис. 5.13. Два случая облучения образцов: а) поляризация лазерного луча параллельна коллагеновым фибриллам, б) поляризация лазерного луча перпендикулярна коллагеновым фибриллам.

Был также исследован случай ГВГ при фототермальном облучении образцов кожи. Следует здесь отметить, что в данном случае, при облучении непрерывным излучением Nd:YAG - лазера происходила абляция поверхностного слоя образца кожи.

Рис. 5.14 демонстрирует зависимости интенсивности сигнала ГВГ для случая абляции участка образца кожи, а также при лазерной сварке двух образцов кожи. Как видно из рисунка, после процедуры лазерной сварки в области шва наблюдается ослабление сигнала ГВГ (рис. 5.14 а). В случае же лазерной абляции поверхностного участка кожи наблюдается увеличение интенсивности сигнала ГВГ в два раза (рис. 5.14 б).

Отметим также, что в коже содержится значительный слой коллаген-содержащей ткани, расположенной в некоторой глубине биоткани (рис. 5.15), для достижения которого зондирующий пикосекундный луч проходит вначале через определенный поверхностный слой (эпидермис), где за счет рассеяния значительно уменьшается его интенсивность. Вследствие этого в подповерхностном коллагеновом слое кожи (дермис), имеющем сетчатую структуру, ослабленный зондирующий луч образует гораздо более слабый сигнал ГВГ, так как интенсивность сигнала ГВГ квадратично зависит от интенсивности зондирующего излучения. Таким образом, в участке образца кожи подвергнутой лазерной абляции, когда поверхностный рассеивающий слой удален, происходит более эффективная ГВГ.



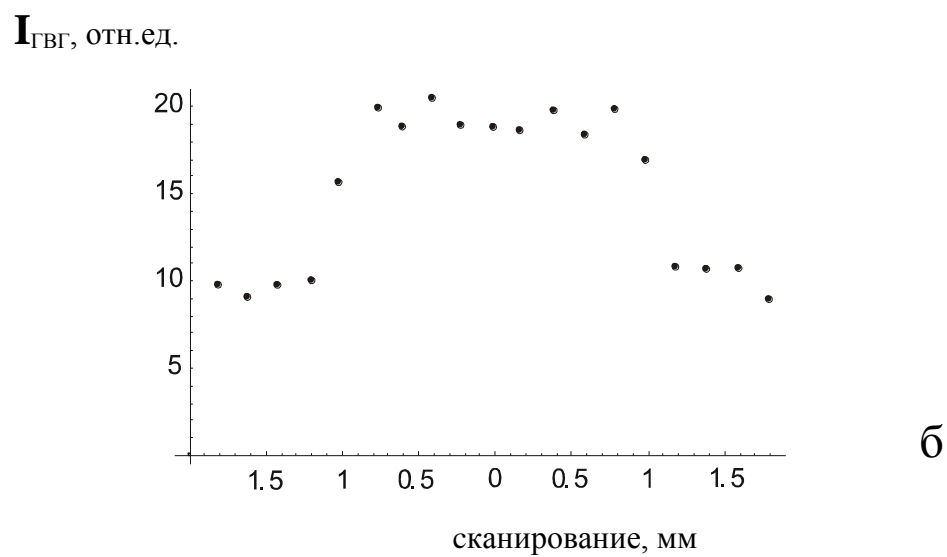
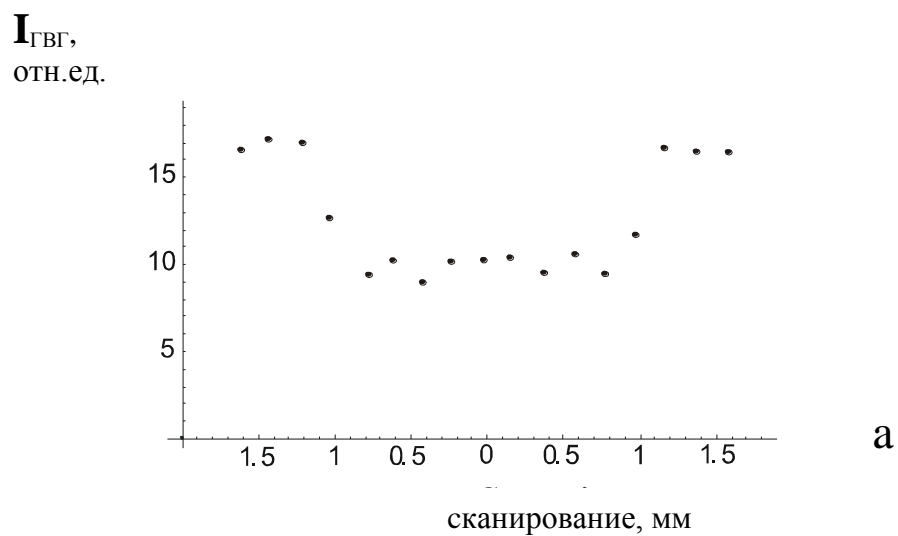


Рис. 5.14. Интенсивность сигнала ГВГ в ходе сканирования зондирующего пикосекундного пучка поперек сварочного шва биоткани (а) и области подвергнутой лазерной абляции (б).

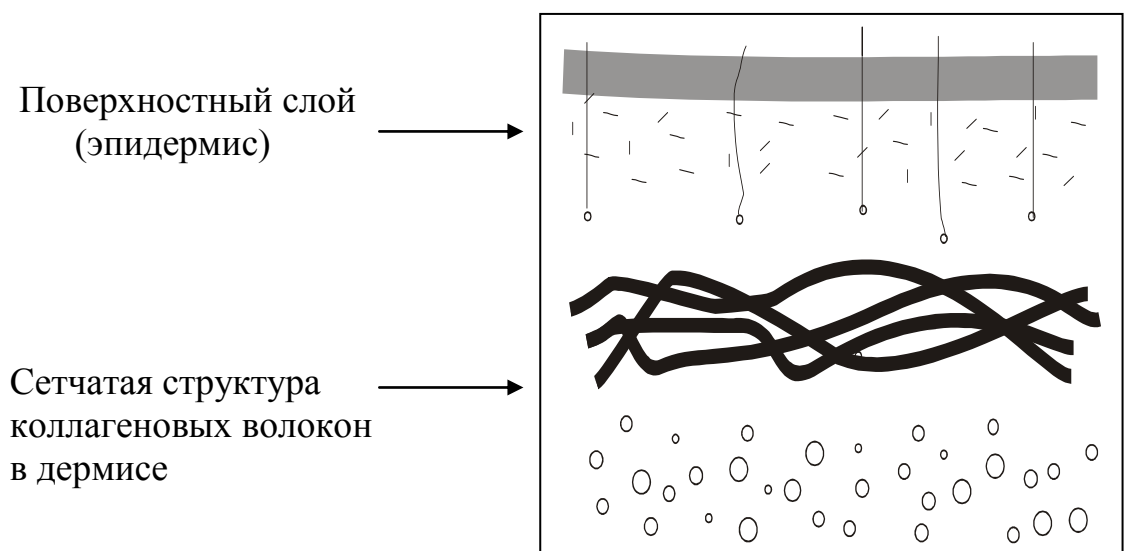


Рис.5.15. Схематическое представление структуры кожи.

## **Выводы главы 5**

Исследованы нелинейные явления фотодиссоциации и двухфотонной флуоресценции туморотропных фотосенсибилизаторов в оптически непрозрачных мышечных биотканях.

Зарегистрирован нелинейно-оптический эффект генерации второй оптической гармоники в различных мягких биотканях, с эффективностью коррелирующей с содержанием фибриллярного белка коллагена.

Исследована зависимость сигнала ГВГ от температуры. Методом ГВГ зарегистрирован конформационный переход спираль-клубок молекул коллагена в тканях .

Исследована поляризационная зависимость сигнала ГВГ в образцах биотканей имеющих разную структуру при сравнении с другим нелинейным процессом - двухфотонной флуоресценцией.

Результаты экспериментов показывают, что наблюдаемые в биологических тканях нелинейно-оптические эффекты позволяют успешно применить методы нелинейной оптики в практических задачах биологии и медицины.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основные результаты, полученные в диссертации, можно сформулировать следующим образом:

Разработаны и апробированы новые схемы лазера на красителе с распределенной 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. Исследованы люминесцентные свойства коллоидных растворов GaAs и CdS квантовых точек размером 2 – 3нм. Зарегистрированы расположенные в синей области видимого спектра 390-440нм спектры люминесценции, что обусловлено квантово-размерным эффектом. Исследована роль структуры поперечных мод лазерной генерации при синтезе наночастиц GaAs. В случае  $\text{TEM}_{11}$  модовой структуры получен широкополосый 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 Si - Ni наночастиц, при смешении раствора наночастиц никеля с нелюминесцирующими кремниевыми КТ. На основе теоретического анализа наблюдаемое явление объяснено влиянием эффекта Штарка.

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 данной схемы при регистрации штарковского спектрального сдвига в стационарном неоднородном электрическом поле.

Проведены измерения особенностей 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 новая схема оптической микроскопии, с пространственным разрешением по оптической оси, составляющем порядка  $\lambda/10$ .

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

Методом лазервозбуждаемой флуоресценции исследованы спектральные особенности биоткани. При облучении на длине волны  $\lambda = 355$  нм и  $\lambda = 440$  нм, выявлено различие между спектрами флуоресценции нормальной и опухолевой ткани. 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 фотосенсибилизированных тканях. Показано наличие в биотканях центров одновременной локализации вводимых фотосенсибилизаторов и пиридиннуклеотидов.

Получены и исследованы 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. Исследована 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 спирально-клубок молекул коллагена и регистрации фототермальных повреждений в биотканях.

В заключении хочу выразить признательность профессору Гамлету Кароевичу Аветисяну за постоянное внимание к работе и многочисленные обсуждения.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Dekker M., *Tunable laser applications*, F.J.Duarte ed., New York, 1995.
2. Knox W.H., *Practical lasers will spawn varied ultrafast application*, Laser focus world, 1996, v.32, N. 6, pp135-140.
3. Gitin M., Seaton C., *Laser manufactures target commercial markets*, Laser focus world, 1996, v.32, N.11, pp. 153-158.
4. Kelso D., *Biomedical applications of single -molecule detection*, SPIE Conference on Biomedical Optics, Book of Abstracts, 1997, San Jose, USA, p. 235.
5. Benaron D.A., *Optical biopsy and imaging advance medical care*, Laser focus world, 1994, v.30, N.1, pp. 79-87.
6. Владимиров Ю.А., Добрецов Г.Е., *Флуоресцентные зонды в исследовании биологических мембран*, М., 1980.
7. Карнаухов В.Н., *Люминесцентный спектральный анализ клетки*, М., 1978.
8. Svanberg S., *Atomic and molecular spectroscopy -basic aspects and practical applications*, Springer Verlag, Heildelberg, 1992.
9. Grant S.A., Glass R.S., *Sol-gel based fiber optic pH sensor*, SPIE Conference on Biomedical Optics, Book of Abstracts, San Jose, USA, 1997, p. 93.
10. Gerussi A.E., Fantini S., Maier J.S., Mantulin W.W., Gratton E., *Chromophore detection by fluorescence spectroscopy in tissue - like phantoms*, SPIE Conference on Biomedical Optics , Book of Abstracts, San Jose, USA, 1997, p. 126.
11. Бурштейн Э.А., *Собственная люминесценция белка*, Итоги науки и техники., Сер. Биофизика, М., 1977, Т.7.
12. Владимиров Ю.А., *Фотохимия и люминесценция белков*, М., 1965.
13. Basu S.,Loh L., *Absorption and fluorescence spectra of mixtures of nucleosides*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Nucleic Acids and Related Subjects, 1963, v. 76, pp. 131-135.
14. Chance B., *Pyridine nucleotide as an indicator of the oxygen requirements for energy-linked functions of mitochondria*, Circ. Res. Suppl. I, 1976, v. 38, N5, pp. 31-38.
15. Гуринович Н.А., Савченко А.Н., Соловьев К.Н., *Спектроскопия хлорофилла и родственных соединений*, Минск, 1968.
16. Das B.B., Feng Liu, Alfano R.R., *Time - resolved fluorescence and photon migration studies in biomedical and model random media*, Rep. Prog. Phys., 1997, v. 60, pp.227-292.

17. Mintz R.I., Berg D.B., *Optical unipolar analysis of biological fluids crystallization textures: engineering solutions*, SPIE Conference on Biomedical Optics , Book of Abstracts, San Jose, USA, 1997, p. 1998.
18. Lakowich J.R., *Laser focus world*, M., 1992, pp. 1-8.
19. Dunn R., Holton G., Mets.L. *J. Phys. Chem.*, 1994, v. **98**, pp. 3094-3098.
20. Betzig E., Patterson G.H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J.S., Davidson M.W., Lippincott-Schwartz J., Hess H.F., *Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution*, *Science*, 2006, v. **313**, pp. 1642–1645.
- 21 Vicidomini G., Moneron G., Han K.Y., Westphal V., Ta H., Reuss M., Engelhardt J., Eggeling C., Hell S.W., *Sharper low-power STED nanoscopy by time gating*, *Nat Methods*, 2011, v. **8**(7), pp. 571-573.
22. Hell S.W., Wichmann J., *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*, *Opt Lett.*, 1994, v. **19**(11), pp. 780-782.
23. Gustafsson M. G. L., *Nonlinear structured-illumination microscopy: Wide-field fluorescence imaging with theoretically unlimited resolution*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, v. **102**(37), pp. 13081–13086.
24. Rust J.M., Bates M., Zhuang X., *Sub diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy*, *Nature Methods*, 2006, v. **3** (20), pp. 793–796.
25. Bates M., Huang B., Zhuang X., *Super-resolution microscopy by nanoscale localization of photo-switchable fluorescent probes*, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2008, v. **208**, pp. 1-10.
26. Hess S.T., Giriajan T.P., Mason M.D., *Ultra-high resolution imaging by Fluorescence Photoactivation Localization Microscopy*, *Biophysical Journal*, 2006, v. **91**(11), pp. 4258–4272.
27. Biteen J.S., Thompson M., Tselentis N., Shapiro L. *Superresolution imaging in live *Caulobacter crescentus* cells using photoswitchable enhanced yellow fluorescent protein*, *Proceedings of SPIE*, 2009, v. **12**, p.809080.
28. Betzig E., Patterson G. H., Sougrat R., Lindwasser O.W., Olenych S., Bonifacino J. S., Davidson M. W., Lippincott-Schwartz J., Hess H. F., *Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution*, *Science*, 2006, v. **313**, pp.1642–1645.
29. Izeddin M., Beheiry El, Andilla J., Ciepielewski D., Darzacq X., Dahan M., *PSF shaping using adaptive optics for three-dimensional single-molecule super-resolution imaging and tracking*, *Optics Express*, 2012, v. **20**, pp.4957–4967.



30. Romero-Morelos P., Peralta-Rodríguez R., Mendoza-Rodríguez M., Valdivia-Flores A., Marrero-Rodríguez D., *The nanotechnology as a support for diagnosis and prognosis in cancer research*, Rev Med Inst., 2011, v. **49**, pp.621-630.
31. Cuenca A.G., Jiang H., Hochwald S.N., Delano M., Cance W.G., *Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics*, Cancer, 2006, v. **107**, pp. 459-466.
32. Choi H.S., Frangioni J.V., *Nanoparticles for biomedical imaging: fundamentals of clinical translation*, Mol Imaging, 2010, v. **9**, pp.291-310.
33. Iga A.M., Robertson J.H., Winslet M.C., Seifalian A.M., *Clinical potential of quantum dots*, J Biomed Biotechnol, 2007, v. **7**, pp.76087.
34. Chen D., Mauk M., Qiu X., Liu C., Kim J., *An integrated, self-contained microfluidic cassette for isolation, amplification, and detection of nucleic acids*, Biomed Microdevices, 2010, v. **12**, pp. 705-719.
35. Weinberg F., Hamanaka R., Wheaton W.W., Weinberg S., Joseph J., *Mitochondrial metabolism and ROS generation are essential for Kras-mediated tumorigenicity*, Proc Nat. Acad.Sci. USA, 2010, v. **107**, pp. 8788-8793.
36. Juzenas P., Chen W., Sun Y.P., Coelho M.A., Generalov R., *Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer*, Adv Drug Deliv Rev., 2008, v. **60**, pp.1600-1614.
37. Paciotti G.F., Myer L., Weinreich D., Goia D., Pavel N., *Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery*, Drug Deliv., 2004, v. **11**, pp. 169-183.
38. Raschke G., Kowarik S., Franzl T., Sonnichsen C., Klar T.A., Feldmann J., Nichtl A., Kurzinger K., *Biomolecular recognition based on single gold nanoparticle light scattering*, Nano Lett., 2004, v. **3**, pp.935-938.
39. Sonnichsen C., Alivisatos A.P., *Gold nanorods as novel nonbleaching plasmon-based orientation sensors for polarized single-particle microscopy*, Nano Lett., 2005, v. **5**, pp.301-304.
40. Stuart D.A., Haes A.J., Yonzon C.R., Hicks E.M., Van Duyne R.P., *Biological applications of localized surface plasmonic phenomena*, IEE Proc Nanobiotechnol, 2005, v. **152**, pp 13-22.
41. Enderlein J., *Theoretical study of single molecule fluorescence in a metallic nanocavity*, Appl Phys Lett, 2002, v. **80**, pp.315-317.
42. Enderlein J., *Spectral properties of a fluorescing molecule within a spherical metallic nanocavit*, Phys Chem Chem Phys., 2002, v. **4**, pp.2780-2786.
43. Lakowicz J.R., Malicka J., D'Auria S., Gryczynski I., *Release of the self- quenching of fluorescence near silver metallic surfaces*, Anal Biochem., 2003, v. **320**, pp.13-20.

44. Marion J.E., *Medical applications of ultrashort-pulse laser*, SPIE Conference on Biomedical Optics, 1999, v. **3616**, San Jose, USA.
45. Bouma B.E., Webb R.H., Tearney G.J., Wellman M.D., *Clinical applications of ultrafast technology*, SPIE Conference on Biomedical Optics, 1999, v. **3616**, San Jose, USA,
46. Lakowich J.R., Maliwal B., *Oxygen Quenching and Fluorescence Depolarization of Tyrosine Residues in Proteins*, J. Biol. Chem., 1983, v. **258**, pp. 4794-4801.
47. Lakowicz J.R., Prendergast F.G., Hogen D., *Fluorescence anisotropy measurements under oxygen quenching conditions as a method to quantify the depolarizing rotations of fluorophores. Application to diphenylhexatriene in isotropic solvents and in lipid bilayers*, Biochemistry, 1979, v. **6**, pp.520–527.
48. Lehrer S.S., *Solute perturbation of protein fluorescence. Quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion*, Biochemistry, 1971. v. **10**, pp. 3254-3263.
49. Gryczynski I., Kusba J. and Lakowicz J.R., *Wavelength-Selective Light Quenching of Biochemical Fluorophores*, J. Biomed. Optics, 1997, v. **2**(1), pp.80-87.
50. Gryczynski, I., Kusba, J., Gryczynski, Z., Malak, H., Lakowicz J.R., *Effect of Fluorescence Quenching by Stimulated Emission on the Spectral Properties of a Solvent-Sensitive Fluorophore*, J. Phys. Chem., 1996, v. **100**(24), pp.10135-10144.
51. He G. S., Bhalkawar J. D., Prasad P. N., Rhinhard B. A., *Three-photon absorption-induced fluorescence and optical limiting effects in an organic compound*, Opt. Lett., 1995. v. **20**, pp. 1524–1526.
52. Gryczynski I., Szmazinski H., Lakowicz J. R., *On the possibility of calcium imaging using Indo-1 with threephoton excitation*, Photochem. Photobiol, 1995, v. **62**, pp.804–808.
53. Han S. H., Belkin M. A., Y. R. Shen, *Sum-frequency spectroscopy of electronic resonances on a chiral surface monolayer of bi-naphthol*, Physical Review B, 2002, v. **66**, p.165415.
54. Belkin M. A., Han S. H., Wei X., Shen Y. R., *Sum-frequency generation in chiral liquids near electronic resonance*, Physical Review Letters, 2001,v. **87**(11), p.113001.
55. Коротеев Н.И., *Новые схемы нелинейной оптической спектроскопии растворов хиральных биологических макромолекул*, ЖЭТФ, 1994, Т. **106**, В. 5(11), с. 1260-1277.
56. Shkurinov A.P., Dubrovskii A.V., N.I. Koroteev, *Second harmonic generation in optically active liquids: experimental observation of a fourth-order optical nonlinearity due to molecular chirality*, Phys.Rev.Lett., 1993, v. **70**, pp. 1085-1088.
57. Heinz T.F., Chen C.K., Ricard D., Shen Y. R., *Spectroscopy of molecular monolayers by resonant second-harmonic generation*, Physical Review Letters, 1982, v. **48**(7), pp. 478-481.

58. Eiseenthal K.B., *Liquid interfaces probed by second-harmonic and sum-frequency spectroscopy*, Chem. Rev., 1996, v. **96**, pp.1343-1360.
59. Donaldson D.J., Guest J.A., Goh M.C., *Evidence for adsorbed SO<sub>2</sub> at the aqueous-air interface*, J. Phys. Chem., 1995, v. **99**, pp. 9313-9315.
60. Huang J.Y., Lewis A., *Tunable laser applications*, Biophys. J., 1989, v. **55**, pp. 835-838.
61. Дмитриева В.Г., Козаков А.А., Шалаев Е.А., *Моноимпульсный АИГ:Nd<sup>3+</sup> - лазер, работающий на длине волны 1.318 мкм*. Квантовая Электроника, 1980, т. **7**(12), с. 2652-2654.
61. Hodgson N., Golding D.J., *High power 1.444μm Nd:YAG laser and its medical applications*, Laser und Optoelektronik, 1993, v. **25**(5), pp. 38-47.
63. Aidinian L.E., Lalayan A.A., *Multifrequency Nd:YAG laser for fluorescence diagnosis of human cancer*, 7th Congress of International Photodynamic Association, Book of Abstracts, Nantes, France, 1998, p. RC198.
64. Aidinian L.E., Lalayan A.A., Galstian, H.M., *Multifrequency Nd:YAG Laser for fluorescence diagnosis of human cancer*, Proc. SPIE, 1998, v. **3414**, p. 11-16.
65. Оганесян М.К., Папазян Т.А., Погосян Э.М., Снгрян Е.А., *Пикосекундный лазер ЛП-2*, Квантовая электроника, 1987, т. **14**, с. 655.
66. Васильев М.А., Гульбинас В.Б., Кабелка В.И., Масалов А.В., Сырус В.П., *Измерение пикосекундных времен релаксации просветляющихся красителей методом скрещенных поляризаторов*, Квантовая Электроника, 1983, т. **10**, в. 2, сс. 416-419.
67. Schafer F.P., *Lasers: physics, systems and techniques*, Proceedings of the twenty-third Scottish Universities Summer School In Physics, Edinburg, 1982.
68. Анохов С.П., Марусий Т.Я., Соскин М.С., *Перестраиваемые лазеры*, Москва, "Радио и связь", 1982.
69. Бор Ж., *Генерация пикосекундных импульсов за счет самомодуляции добротности в лазере на красителе с распределенной обратной связью*, Изв.АН СССР, Серия Физика, 1984, т.**48**, в.8, с.1527-1533.
70. Jasny J., *Widely tunable, picosecond, distributed feedback dye laser*, Rev. Sci. Instrum., 1986, v.**57**(7), pp.1303-1307.
71. Рубинов А.Н., Эфендиев Т.Ц., *Лазер на красителе со свето-индуцированной распределенной обратной связью*, Квантовая электроника, 1982, т. **9**, в.12, с.2359-2366.
72. Костенич Ю.В., *Расширение диапазона перестройки длины волны генерации РОС-лазера на красителях*, Материалы межотрасл. школы-семинара мол. ученых, Минск, 1987, с.130-131.

73. Bor Z., Muller A., *Picosecond distributed feedback dye laser*, IEEE J. Quantum Electron, 1986, v. **22**, pp. 1524-1533.
74. Voss T., Scheel D., Schade W., *A microchip-laser-pumped DFB- polymer-dye laser*, Appl. Phys. B, 2001, v. **73**, pp.105–109.
75. Helling J., Bor Z., *Achromatic pumping condition for a distributed -feedback dye laser*, Optica acta, 1986, v. **33** (8), pp.1063-1071.
76. Helling J., Bor Z., Racz B., *Design of N<sub>2</sub> laser pumped tunable distributed feedback lasers with extended tuning range*, Acta physics et Chem., 1984, v. **30**, N 3-4, pp.127-136.
77. Migus A., Shank C.V., Ippen E.P., Fork R.L., *Amplification of subpico-second optical pulses: theory and experiment*, IEEE Journal QE, 1982, v. **18**, pp. 101–109.
78. Szatmari S., Racz B., *Novel achromatic distributed -feedback dye laser for subpicosecond operation*, Applied Physics B, 1987, v. **43**, pp. 173-177.
79. Szatmari S., Racz B., *Generation of 320 fs pulses with a distributed -feedback dye laser*, Applied Physics B, 1987, v. **43**, pp. 93-97.
80. Лалаян А.А., Папазян Т.А., Саркисян С.М., *Пикосекундный РОС лазер с широкой областью перестройки*, Изв. АН. Арм. ССР, Физика, 1991, Т. **26** (1), с. 27-32.
81. Лалаян А.А., Папазян Т.А., Саркисян Е.М., *Перестраиваемый лазер с динамической распределенной обратной связью*, авторское свидетельство о изобретении СССР #1604126 , 1986.
82. 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.
83. Lalayan A. A., *Picosecond distributed feedback laser in infrared -visible spectral range*, Armenian Journal of Physics, 2010, v. **3**(1), pp. 23-32.
84. Holstein T., *Imprisonment of resonance radiation in gases*, Phys. Rev. B, 1947, v. **72**, pp. 1212-1233.
85. Безуглов Н.Н., *О пленении излучения в цилиндрических объемах конечных размеров*, Оптика и спектроскопия, 1977, Т. **43**(3), с.418-423.
87. Scherr C.W., *Imprisonment of resonance radiation in solids and gases*, Phys. Rev. B: Solid State, 1971, v. **4**, pp. 3885-3890.
88. Kopystynska A., *Coherent diffusion of radiation in a modulation resonance experiment on the <sup>3</sup>P state of mercury.*, Nuovo Cim. B., 1972, v. **8**(2), pp. 442-450.

89. Александров Е.Е., Безуглов Н.Н., *Аномалия соотношения интенсивности компонент резонансных линий в газовом разряде*, Оптика и спектроскопия, 1978, Т. **45**(2), сс.218-221.
90. Безуглов Н.Н., Голубовский Ю.Б., *О влиянии пленения на пространственное распределение интенсивности линий в электронном пучке*, Оптика и спектроскопия, 1977, Т.**42**(2), сс. 248-251.
91. Korystynska A., Kowalczyk P., *Time dependencies in energy transfer process induced by collision between two 3P-excited sodium atoms*, Optics Commun., 1978, v. **25**(3), pp. 351-354.
92. Wieman C., Hansch T.W., *Doppler free laser polarization spectroscopy*, Phys. Rev. Lett., 1976, v. **36** (20), pp. 1170-1173.
93. Арутюнян В.М., Папазян Т.А., Адонц Г.Г., Карменян А.В., Ишханян С.П., Хольц Л., *Резонансное вращение плоскости поляризации в парах калия*, ЖЭТФ, 1975, Т. 68б, сс. 44-50.
94. 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, с. 124-134.
95. 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 натрия поляриметрическим методом*, Изв. АН. Арм. ССР, Физика, 1986, т. **21**(2), сс.101-103.
96. Тавгер Б.А., Демиховский В.Я., УФН, 1968, *Квантовые размерные эффекты в полупроводниковых полуметаллических пленках*, т. **96**, сс. 61-85.
97. Burke P. J., *Nanodielelectrophoresis: Electronic Nanotweezers*, In Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology; American Scientific: Stevenson Ranch, CA, 2004
98. Krishnan M., Mojarad N., Kukura P., Sandoghdar V., *Geometry-induced electrostatic trapping of nanometric objects in a fluid*, Nature, 2010, v. **467**, pp. 692-696.
99. Ma L.-C., Subramanian R., Huang H.-W., Ray V., Kim C.-U., Koh S. J., *Electrostatic funneling for precise nanoparticle placement: a route to wafer-scale integration*, Nano Letters, 2007, v. **7**, pp. 439-445.
100. Bhadrachalam R.V., Koh S.J., *Single-particle placement via self-limiting electrostatic gating*, Applied Physics Letters, 2008, v. **93**, p. 073110.
101. Gabayno J., Liu D., Chang M., Lin Y., *Controlled manipulation of  $Fe_3O_4$  nanoparticles in an oscillating magnetic field for fast ablation of microchannel occlusion.*, Nanoscale, 2015, v. **7**, pp. 3947-3953.

102. Wilhelm C., Gazeau F., Bacri J.C., *Magnetophoresis and ferromagnetic resonance of magnetically labeled cells*, Eur Biophys J., 2002, v. **31**(2), pp.118-125.
103. Silva A.A., Wilhelm C., Kolosnjaj-Tabi J., Luciani N., Gazeau F., *Cellular Transfer of Magnetic Nanoparticles Via Cell Microvesicles: Impact on Cell Tracking by Magnetic Resonance Imaging*, Pharmaceutical Research, 2012, v. **29**(5), pp.1392-1403.
104. Shin J., Lee K.M., Lee J.H., Lee J., Cha M., *Magnetic manipulation of bacterial magnetic nanoparticle-loaded neurospheres*, Integr Biol (Camb).,2014, v. **6**(5), pp. 532-529.
105. Dienerowitz M., Mazilu M., Dholakia K., *Optical manipulation of nanoparticles: a review*, Journal of Nanophotonics, 2008, v. **2** (1), pp. 021875-021875.
106. Urban **A.S.**, Carretero-Palacios **S.**, Lutich **A.A.**, Lohmülle T., Feldmann **J.**, Jäckel F., *Optical trapping and manipulation of plasmonic nanoparticles: fundamentals, applications, and perspectives*, Nanoscale, 2014, v. **6**, pp. 4458-4474.
107. Allen H.J. Yang, Sean D. Moore, Bradley S. Schmidt, Klug M., Lipson M., Erickson D., *Optical manipulation of nanoparticles and biomolecules in sub-wavelength slot waveguides*, Nature, 2009, v. **457**, pp.71-75.
108. Esaki L., *Long Journey into Tunnell*, Nobel Lecture. Nobel Lectures, Physics, 1971-1980, World Scientific Publishing Co., Singapore, 1992.
109. Sols F., Macucci M., Ravaioli U., Hess K., *Theory for a quantum modulated transistor*, J. of Applied Physics, 1989, v. **66**, (8), pp. 3892-3906.
110. Lu W., Lieber C., *Nanoelectronics from the bottom up*, Nature Materials, 2007, v. **6**, pp. 841 – 850.
111. Кобаяси Н., *Введение в нанотехнологию*, Изд.Бином., 2007.
112. Vajtai R., *Handbook of Nanomaterials*, Springer, 2013.
113. Ko S.H., Grigoropoulos C., *Hierarchical Nanostructures for Energy Devices*, Nanoscience & Nanotechnology, Series: Royal Society of Chemistry, 2015, v. **35**.
114. Mansoori G., *Principles of Nanotechnology*, Molecular-Based Study of Condensed Matter in Small Systems, World Scientific Pub. Co.,2005.
115. Mashinchian O., Johari-Ahar M., Ghaemi B., Rashidi M., Barar J., Omid Y., *Impacts of quantum dots in molecular detection and bioimaging of cancer*, Bioimpacts., 2014,.v.**4**(3), pp.149-166.

116. Kairdolf B., Smith A., Stokes T., Wang M., Young A., Nie S., *Semiconductor Quantum Dots for Bioimaging and Biodiagnostic Applications*, Annual Review of Analytical Chemistry, 2013, v. **6**, pp. 143-162.
117. Zrazhevskiy P., Sena M., Gao X., *Designing multifunctional quantum dots for bioimaging, detection, and drug delivery*, Chem Soc. Rev., 2010, v. **39**, pp.4326-4354.
118. Dubertret B., Skourides P., Norris D.J., Noireaux V., Brivanlou A.H., Libchaber A., *In vivo imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles*, Science., 2002, v.**298**(5599) pp.1759-1762.
119. Alivisatos A. P., *Perspectives on the Physical Chemistry of Semiconductor Nanocrystals*, J. Phys. Chem., 1996, v. **100** (31), pp 13226–13239.
120. Micic O.I., Nozik A.J., Lumin J., *Synthesis and Characterization of Binary and Ternary III-V Quantum Dots*, Special Issue on Quantum Dots, 1996, v. **70**, p. 95-107.
121. Seto T., Kawakami Y., Suzuki N., Hirasawa M., Aya N., *Laser Synthesis of Uniform Silicon Single Nanodots*, Nano Lett., 2001, v. **1**(6), pp.315-318.
122. Lalayan A.A., *Formation of colloidal GaAs and CdS quantum dots by laser ablation in liquid media*, Applied Surface Science, 2005, v.248(1-4), pp.209-212.
123. Lalayan A., Avetisyan A., Djotyan A., *The luminescence properties of the colloidal GaAs and CdS semiconductor quantum dots*, Laser Phys. Lett., 2005, v. **2**(1), pp. 12–15.
124. Mafune F., Kohno J., Takeda Y., Kondow T., Sawabe H., *Formation and size control of silver Nanoparticles by laser ablation in aqueous solution*, J Phys Chem, 2000, v. **104**, pp.9111–9117.
125. Bimberg D., Grundmann M., Ledentsov N., *Quantum Dot Heterostructures*, John Wiley & Sons, 1999.
126. Brus L.E., *Electron–electron and electronhole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state*, J. Chem. Phys., 1984, v.**80**,pp. 4403-4409.
127. Weller H., *Colloidal Semiconductor Q-Particles: Chemistry in the Transition Region Between Solid State and Molecules*, Angew. Chem., 1993, v. **32**, pp.41-53.
128. Landau L.D. and Lifshits E.M, *Quantum Mechanics*, Pergamon Press, NY, 1981.
129. Klimov V., *Semiconductor and Metal Nanocrystals: Synthesis and Electronic and Optical Properties*, Marcel Dekker, W., 2004.

130. Avetisyan A.A., Djotyan A.P., Kazaryan E.M., *Exciton-donor complexes in a semiconductor quantum dot*, Phys.Stat. Sol., 2003 , v. **2**, pp.734-739.
131. Menéndez-Manjón A., Jakobi J., Schwabe K., Krauss J. K., Barcikowski S., *Mobility of Nanoparticles Generated by Femtosecond Laser Ablation in Liquids and Its Application to Surface Patterning*, Journal of Laser Micro/Nanoengineering, 2009, v. **2**, pp. 95–99.
132. Barcikowski S., Hahn A., Guggenheim M., Reimers K., Ostendorf A., *Biocompatibility of nanoactuators: stem cell growth on laser generated nickel titanium shape memory alloy nanoparticles*, Journal of Nanoparticle Research, 2010, v. **5**, 1733–1742.
133. Hartmann A., Ducommun Y., Kapon, E., Hohenester U., Simserides C., Molinari E., *Optical Spectra of Single Quantum Dots: Influence of Impurities and Few-Particle Effects*, Phys. Stat. Sol., 2000, v. **178**, pp.283-290.
134. Finley J.J., Ashmore A.D., Lemaitre A., Mowbray D.J., Skolnick M.S., Itskevich I.E., Maksym P.A., Hopkinson M., Krauss, T.F., *Charged and neutral exciton complexes in individual self-assembled In(Ga)As quantum dots*, Phys.Rev. B, 2001, v. **63**, pp.073307:1-4.
135. 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.
136. Lalayan A.A., Israelyan S.S., *IR-Laser Welding and Ablation of Biotissue Stained with Metal Nanoparticles*, Physics.bio-ph, v. 1, 509.04625, 2015.
137. Hutter E., Fendler J.H., *Exploitation of localized surface plasmon resonance*, Adv Mater 2004, v. **16**, pp.1685-1706.
138. El-Sayed I.H., Huang X.H., El-Sayed M.A., *Surface plasmon resonance scattering and absorption of anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles in cancer diagnostics: applications in oral cancer*, Nano Lett., 2005, v. **5**, pp.829-834.
139. Kalkbrenner T., Hakanson U., Sandoghdar V., *Tomographic plasmon spectroscopy of a single gold nanoparticles*, Nano Lett., 2004, v. **4**, pp.2309-2314.
140. Kelly K.L., Coronado E., Zhao L.L., Schatz G.C., *The optical properties of metal nanoparticles: The influence of size, shape, and dielectric environment*, J. Phys. Chem. B, 2003, v.**107**, pp.668-677.
141. Kreibig U., Vollmer M., *Optical properties of metal clusters*, Berlin:Springer-Verlag, 1995.
142. Seol Y., Carpenter A. E., Perkins T. T., *Gold nanoparticles: enhanced optical trapping and sensitivity coupled with significant heating*,. Opt. Lett., 2006, v. **31**(16), pp. 2429–2431.
143. Maier S. A., *Plasmonics: Fundamental and Applications*, Springer Science, 2007.
144. Murray W.A., Barnes W.L., *Plasmonic*, Adv. Mater., 2007, v. **19** (22), pp. 3771–3782.



145. Jain P.K., Huang X., El-Sayed I.H., El-Sayed M.A., *Noble metals on the nanoscale: optical and photothermal properties and some applications in imaging, sensing, biology, and medicine*, Accounts of Chemical Research, 2008, v. **41** (12), pp.1578-1586.
146. Ландау Л.Д., Лифшиц Е.М., *Электродинамика сплошных сред*, Наука, М., 1982.
147. Bottcher C. J., *Theory of Electric Polarization*, Elsevier, Amsterdam, 1973.
148. Wolkin M.V., Jorne J. Fauchet P.M., *Electronic states and luminescence in porous silicon quantum dots: the role of oxygen*, Phys. Rev. Lett., 1999, v. **82**(1), pp. 197-200.
149. Svrcek V., Mariotti D., Kondo M., *Ambient-stable blue luminescent silicon nanocrystals prepared by nanosecond-pulsed laser ablation in water*, Opt. Express, 2009, v. **17**(2) pp.520-527.
150. Wang L., Zunger A., *Dielectric Constants of Silicon Quantum Dots*, Phys. Rev. Lett. 1994, v.**73**, pp.1039-1042.
151. Wang L-W.J., *Calculating the Influence of External Charges on the Photoluminescence of a CdSe Quantum Dot*, Phys. Chem. B, 2001, v. **105**(12), pp.2360-2364.
152. 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.
153. 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.
155. Shalaev V. M., *Nonlinear Optics of Random Media: Fractal Composites and Metal-Dielectric Films*, Springer, NY, 2000. Bining G., Rohrer H., Scanning Tunneling Microscope//US Patent 4,343,993 Aug.10,1982.Filed: Sep.12.1980
156. Binnig G.; Rohrer H., *Scanning tunneling microscopy*, IBM Journal of Research and Development, 1986, v. **30**(4), pp. 355–369.
157. Bining G., Rohrer H., Gerber Ch., Weibel E., *7X7 Reconstruction on Si(111) Resolved in Real Spacem*, Phys. Rev. Lett., 1983, v. **50**(2), pp. 120-123.
158. Tersoff J., Hamann D.R. *Theory and application for scanning tunneling microscope*, Phys. Rev. Lett. 1983, v. **50**, p. 1998-2001.
159. Chen C.J., *Introduction to Scanning Tunneling Microscopy*, Oxford University Press., 1993.
160. Abbé E., *Beiträge zur theorie des mikroskops und der mikroskopischen wahrnehmung*, Archiv. F. Mickroskopische Anat., 1873, v. **9**, pp. 413–468.
161. Rayleigh L., *On the theory of optical images, with special reference to the microscope*, Philos. Mag., 1896, v. **42**, pp. 167–195.
162. Pohl D.W., *Optical near field scanning microscope*, EP patent 0112401, 1982.

163. Pohl D., Denk W., Lanz M., *Optical stethoscopy: Image recording with resolution  $\lambda/20$* , Appl. Phys.Lett., 1984, v. **44**, pp. 651-653.
164. Lewis A., Isaacson M., Harootunian A., Murray A., *Development of a 500 Å spatial resolution light microscope. I. Light is efficiently transmitted through  $\lambda/16$  diameter apertures*, Ultramicroscopy, 1984, v. **13** (3), pp. 227.
165. Betzig E., Lewis A., Harootunian A., Isaacson M., Kratschmer E., *Near-field scanning optical microscopy (NSOM) - development and biophysical applications*, Biophys. J., 1986, v. **49**, pp. 269–279.
166. 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.
167. Феофанов А.В., *Спектральная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия в биологических исследованиях*, Успехи биол. химии, 2007, т. **47**, сс.371–410.
168. Wilson T., *Confocal microscopy*, Academic, London, 1990.
169. Hell S.W., Stelzer, E.H.K. Lindek S., Cremer C., *Confocal microscopy with an increased detection aperture: type-B 4Pi confocal microscopy*, Optics Letters, 1994, v.**19**(3), pp. 222–224.
170. Hell S., Stelzer E.H., *Properties of a 4Pi confocal fluorescence microscope*, J. Opt. Soc. Am. A., 1992, v. **9**(12), pp. 2159-2166.
171. Hell S.W., Hanninen P. E., Kuusisto A., Schrader M., Soini E., *Annular aperture two-photon excitation microscopy*, Opt. Commun., 1995, v.117, pp. 20–24.
172. Denk W., Piston D.W., Webb W.W., *Two-photon molecular excitation in laser scanning microscopy*. in Handbook of Biological Confocal Microscopy, Plenum Press, New York, 1995, pp. 445–457.
173. Denk W., Strickler J.H., Webb W.W., *Two-photon fluorescence scanning microscopy*, Science, 1990, v. **248**, pp.73–75.
174. Hanninen P.E., Soini E., Hell S.W., *Continuous wave two-photon excitation microscopy*, J. Microscop., 1994, v.176, pp. 222–225.
175. Hell S.W., Wichmann J., *Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy*, Optics Letters, 1994, v.**19**(11), pp. 780–782.
176. Müller T., Schumann C., Kraegeloh, A. *STED Microscopy and its Applications: New Insights into Cellular Processes on the Nanoscale*, Phys. Chem, 2012, v. **13**(8),pp. 1986–2000.
177. Dyba M., Hell S.W., *Photostability of a Fluorescent Marker Under Pulsed Excited-State Depletion through Stimulated Emission*, Applied Optics, 2003, v. **42**(25), pp. 5123–5129.

178. Farahani J.N., Schibler M.J., Bentolila L.A., *Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy: from Theory to Practice. Microscopy, Science, Technology, Applications and Education*, 2010. pp.1539-1547.
179. Азарян М.Г., Лалаян А.А., Арзуманян Г.М., Белушкин А.В., Арутюнян В.М., *К созданию зондового микроскопа сверхвысокого оптического разрешения. Ядерная физика и нанотехнологии ядерно – физические аспекты формирования, изучения и применения наноструктур*, под ред. А.Н. Сисакяна, Дубна, 2008, сс 190-198
180. Парселл Э., *Электричество и магнетизм*, т. II, Наука, М., 1983.
181. Empedocles S.A., Vawendi M.G., *Quantum-confined Stark effect in single CdSe nanocrystallite quantum dot*, Science, 1997, v. **278**, pp. 2114-2117.
182. Неволин В.К., *Физические основы туннельно-зондовой нанотехнологии*, Наука, Москва, 2000.
183. 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, сс.76-80
184. 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, сс.494-497
185. Веселаго В.Г., *Электродинамика веществ с одновременно отрицательными значениями  $\epsilon$  и  $\mu$* , УФН, 1967, Т. **87**. сс. 517-526.
186. Pendry J.B., Holden A.J., Stewart W.J., Youngs I.I., *Extremely low frequency plasmons in metallic mesostructure*, Phys. Rev. Lett., 1996, v. **76**, pp.4773-4776.
187. Smith D.R., Pendry, J.B., Wiltshire M.C., *Metamaterials and negative refractive index*, Science, 2004, v. **305**, pp.788–792.
188. Eleftheriades, G. V., Balmain K. G., *Negative Refraction Metamaterials: Fundamental Principles and Applications*, IEEE-Wiley, 2005.
189. Engheta, N., Ziolkowski, R., *Electromagnetic Metamaterials: Physics and Engineering Explorations*, IEEE-Wiley, 2006.
190. Cai, W., Shalaev, V.M., *Optical Metamaterials: Fundamentals and applications*, Springer, 2009.

191. Smith D.R., Padilla W.J., Vier D.C., Nemat-Nasser S.C., Schultz S., *Composite Medium with Simultaneously Negative Permeability and Permittivity*, Physical Review Letters, 2000, v. **84**(18), pp. 4184–4187.
192. Parazzoli G., Gregor R.B., Li K., Koltenbah T. M., *Experimental verification and simulation of negative index of refraction using Snell's law*, Phys. Rev. Lett., 2003, v. **90**, pp.107401: 1-4.
193. Pendry J.B., *Negative refraction makes a perfect lens*, Phys. Rev. Lett., 2000, v. **85**, 3966–3969.
194. Brock J.B., Houck A.A., Chuang I.L., *Focusing inside negative index materials*, Appl.Phys.Lett., 2004, v. **5**, pp. 2472-2474.
195. Grbic A., Eleftheriades G. V., *Overcoming the diffraction limit with a planar left-handed transmission-line lens*, Phys. Rev. Lett., 2004, v. **92**, pp. 117403:1-4
196. Soukoulis C.M., Linden S., Wegener M., *Negative refractive index at optical wavelengths*, Science, 2007, v. **315**, pp.47-49.
197. Melville D.O.S., Blaikie R., *Super-resolution imaging through a planar silver layer*, Optics Express, 2005, v. **13**(6), pp.2127-2134.
198. Fang N., Lee H., Sun C., Zhang X., *Sub-Diffraction-Limited Optical Imaging with a Silver Superlens*, Science, 2005, v. **308**, pp. 534–537.
199. Ерицянь О.С., *Оптические свойства анизотропных кристаллов с разными знаками компонент тензора диэлектрической проницаемости*. Кристаллография, 1978, Т. **11**, с.461-464.
200. Eritsyan H.S., *Media with open surfaces of wave vectors as possible for creation of flat lenses*, J.Contemp. Phys. 2004, v. **39**, pp. 36-41.
201. Брыксин В.В., Мирлин Д. Н., Решина И.И., *Поверхностные колебания в анизотропных кристаллах*, ФТТ, 1973, Т. **15**. с. 1118-1126.
202. Ерицянь О.С., *Оптика гиротропных сред и холестерических жидких кристаллов*, , Айастан, Ереван, 1988.
203. Аракелян О.М., Ерицянь О.С., Лалаян А.А., Костанян Р.Б., Геворкян Э.Г., *Особенности отражения света от поверхности кристаллов MgF<sub>2</sub> в ИК области спектра*, Proc Laser Physics, 2005, pp.72-75.
204. Eritsyan H.S., Lalayan A.A., Papoyan 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**(3), pp. 14-18.

205. Ерицян 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), сс. 997–1002.
206. Eritsyan H.S., Lalayan A.A., Arakelyan H.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**(6), pp. 938–943.
207. Current Microscopy Contributions to Advances in Science and Technology (A. Méndez-Vilas, Ed.) Formatex Research Center, 2014.
208. Kalkbrenner T., Ramstein M., Mlynek J., Sandoghdar V., *A single gold particle as a probe for apertureless scanning near-field optical microscopy*. Journal of Microscopy, 2001, v. **202**, pp. 72-76.
209. Bouhelier A, Beversluis M, Hartschuh A, Novotny L., *Near-field second harmonic generation induced by local field enhancement*, Phys. Rev. Lett., 2003, v. 90 pp.013903:1-6.
210. Theer P., Denk W., *On the fundamental imaging-depth limit in two-photon microscopy*, J. Opt. Soc. Am. A, 2006, v. **23**(12), pp. 3139–3149.
211. Либенсон М.Н., Румянцев А.Г., *Возбуждение светом цилиндрических поверхностных электромагнитных волн*, Оптика и спектроскопия, 1986, Т. **60**(4), сс. 675-671.
212. Gurevich V.S., Libenson M.N., *Surface polaritons propagation along micropipettes*, Ultramicroscopy, 1995, v. **57**, Issues 2–3, pp. 277–281.
213. Nerkararyan K.V., *Superfocusing on a surface polariton in a wedge-like structure*, Phys. Lett. A., 1997, v. **237**, pp.103- 105.
214. Babadjanyan A. J., Margaryan N. L, Nerkararyan K. V., *Superfocusing of surface polaritons in the conical structure*, J. Appl. Phys., 2000, v. **87**(8), pp.3785- 3788.
215. Stockman M. I., *Nanofocusing of optical energy in tapered plasmonic waveguides*, Phys. Rev. Lett., 2004, v. **93**(13), pp. 137404:1-4.
216. Tanaka K., Katayama K., Tanaka M., *Nanofocusing of surface plasmon polaritons by a pyramidal structure on an aperture*, Optics Express, 2010, v. **18**, No. 2, pp.787 -798.
217. Janunts N. A., Baghdasaryan K. S., Nerkararyan Kh. V., Hecht B., *Excitation and superfocusing of surface plasmon polaritons on a silver-coated optical fiber tip*, Opt. Comm. 2005, v. **253**, pp. 118-124.
218. Kretschmann E., *The determination of the Optical Constants of Metals by Excitation of Surface Plasmons*, Z. Phys. ,1971, v. **241**, pp.313-324.

219. 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. 2965-2968.
220. Policard A., *Erude sur les aspects offerts par des tumeurs examinees a la lumiere de wood*, CR Soc. Biol., 1924, v. **91**, pp.1423-1424.
221. Ronchese F., Walker B., Young R., *The reddish-orange fluorescence of necrotic cancerous surfaces under the Wood light*, Arch. Derm. Syph., 1954, v. **69**, pp.31- 42.
222. Гладков А.А., *Люминесцентный анализ в медицине*, Кишинев, 1958.
223. Карякин А.В., Изв АН СССР: Сер. Физика, 1962, Т. **26**, с. 94-99.
224. Карякин А.В., Березов Ю.Е., Анисимова И.Н., Биофизика, 1963, Т. **8**, с.129-130.
225. Sowinska M., Hajri A., Heisel F., Mutter D., Mieke J., Marescaux J., Aprahamian M., *Detection and localization of pancreatic diseases by laser-induced fluorescence (LIF) imaging of endogenous chromophores*, 7th Congress International Photodynamic Association, Nantes: France, 1998, Book of Abstracts, p. 56.
226. Лисовский В.А., Щедрунов В.В., Барский И.Я., *Люминесцентный анализ в гастроэнтерологии*, Л., 1984.
227. Alfano R.R., Tang G.C., Pradhan A., *Fluorescence spectra from cancerous and normal human breast and lung tissues*, IEEE J. Quantum Electron, 1987, v. **QE-23(10)**, pp. 1806-1811.
228. Tata D.B., Biophys. J., Svanberg K., Kollen E., Ankerst J., Cancer Res., 1986, v.**46**, pp. 3803- 3808.
229. Tata D.B., Foresti M., Cordero J., Tomashefsky P., Alfano M., Alfano R.R., *Fluorescence polarization spectroscopy and time resolved fluorescence kinetics of native cancerous and normal rat kidney tissues*, Biophys. J., 1986, v. **50**, pp. 463–469.
230. Gaiduk M.I., Grigoryants V.V., *Fibre-laser IR luminescence diagnostics of malignant tumours using rare earth porphyrins*, J. Photochem. Photobiol. B: Biology, 1990, v.**7**, pp. 15-20.
231. Hirano T., Ishizuka M., Suzuki K., *Photodynamic cancer diagnosis and treatment system consisting of pulse lasers and endoscopic spectro-image analyzer*, Lasers in the Life Science, 1989, v.**3**, pp.99-116.
232. 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, Conference Proceedings, pp. 41-49.
233. Grammer H., Stich W., Triebe A., Naturwiss., 1952, v. **39**., pp. 137- 140.

234. Okuda T., Kataoka K, Taneda M., *Metastatic brain tumor surgery using fluorescein sodium: technical note.*, Minim Invasive Neurosurg., 2007, v. **50**(6)., pp.382-384.
235. Шаргородский Л.Я., Локтионов Г.М., Срапионов А.С., *Вопросы нейрохирургии*, 1956, Т.**8**, с. 129-130.
236. Bospene E.B., *Eye Cancer Research Progress*, NY, 2008.
237. Бассалык Л.С., Новиков А.М., Соколова В.Д., Сорокин Е.Н., *Вопросы мед. химии*, 1984, Т.**3**, с.124-127.
238. Bertalanfly F.D., Masin F., Masin M., *Use of acridine-orange fluorescence technique in exfoliative cytology*, Science, 1956, v. **124**, pp.1024-1025.
239. Bertalanfly F.D., *Cyodiagnosis of cancer using acridine orange with fluorescence microscopy*, CA: A Cancer Journal for Clinicians., 2008, v. **10**(4), pp.118-123.
240. Fukui I., Yokokawa M., Mitani G., Ohwada F. et al., *In vivo staining test with methylene blue for bladder cancer*, J. Urology, 1983, v. **130**. pp.252–255.
241. Andersson-Engels S., Johansson J., Svanberg S., Svanberg K., *Fluorescence diagnosis and photochemical treatment of diseased tissue using lasers*, Analytical Chemistry, 1990, v.**62**, pp.19-27.
242. Goff B.A., Bachor R., Kollias N., Hasan T., *Effect of photodynamic therapy with topical application of 5- aminolevulinic acid on normal skin of hairless guinea pigs*, J. Photochem. Photobiol. B: Biology, 1992, v. **15**, pp. 239-251.
243. Steiner R.A., Tadir Y., Tromberg B.J., *Photosensitization of the rat endometrium following 5- aminolevulinic acid induced photodynamic therapy*, Lasers in Surgery and Medicine, 1996, v.**18**, pp. 301-308.
244. Klintenberg C., Nilsson A. M. K., Wang I., Andersson- Engels S., Svanberg S., Svanberg K., *Laser-induced fluorescence diagnosis of basal cell carcinomas of the skin following topical ALA application*, Biomedical Optics, 1996, v. **5**, pp.1-6.
245. Кочубеев Г.А., Фролов А.А., Зенькевич Э.И., Гуринович Г.П., *Закономерности комплексообразования хлорина  $e_6$  с сывороточными альбуминами человека и быка*, Молекулярная биология, 1988, Т. **22**(4), с. 968-975.
246. Черницкий Е.А., *Люминесценция и структурная лабильность белков в растворе и клетке*, Минск, 1972.
247. Лакович Д., *Основы флуоресцентной спектроскопии*, М., Мир, 1986.
248. Оганесян В.А., Лалаян А.А., Айдинян Л.Э., *Механизмы тушения автофлуоресценции тканей сенсibilизированных туморотропными красителями*, Биофизика, 1995, Т.**40**(6), с.1308-1312.

249. Andersson-Engels S., Berg R., Johansson J., Svanberg S., Stenram U., Svanberg K., Laser spectroscopy in medical diagnostics, Photodynamic therapy : Basic principles and clinical applications, New York, Dekker, 1992, pp. 387-425.
250. Andersson P.S., Montan S., Svanberg S., *Multispectra system for medical fluorescence imaging*, IEEE J. Quantum Electron., 1987, v. **QE-23**, pp.1798-1805.
251. Yeboah L.D., Nestler D., Steiner R., *Laser scanning endoscope via an imaging fibre bundle for fluorescence imaging*, The International Conference on Biomedical Optics, SPIE Conference Proceedings: Medical applications of lasers II, 1994, v. **2327**, pp.384-392.
252. Hovanessian V.A., Lalaian A.A., *Application of multifrequency solid state laser for biomedicine*, Proc. of Trans Black Sea Region Symposium on Applied Electromagnetism, Conference Abstracts, Metsovo, Greece, 1996, p. B1SY4.
253. 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, Вып. **3-4**, сс. 98-103.
254. Kozyrev A.N., Efimov A.V., Efremova O.A., Perepyolkin P.Y., Mironov A.F., *New chlorin and bacteriochlorine - type photosensitizers for photodynamic therapy*, The International Conference on Biomedical Optics, SPIE Conference Proceedings, 1994, v. **2325**, pp.297-302.
255. Pandey R.K., Jagerovich N., Dougherty T.J., Smith K.M., *Synthetic approaches to long - wavelength photosensitizers for photodynamic therapy, and their preliminary biological activity*, The International Conference on Biomedical Optics, SPIE Conference Proceedings, 1994, v. **2325**, pp.2-11.
256. Lalaian A.A., Hovanessian V.A., *Laser system with chlorin e<sub>6</sub> for fluorescence diagnosis and photodynamic therapy of tumors*, The Trans Black Sea Region Symposium on Applied Electromagnetism, Conference Proceedings, Metsovo, Greece, 1996, p. B1SY5.
257. Hovanessian V.A., Lalaian A.A., Gyolkhandanian G., *Laser fluorescence investigation of chlorin e<sub>6</sub> pharmacokinetics*, The Conference on Biomedical Optics of Europe, SPIE Conference Proceedings, Vienna, 1996, v. **2924**, pp. 125-129.
258. Beck G, Star W.M., van Staveren H.J. et. al., *Probing dye distribution in turbid samples noninvasely by angular resolved fluorescence measurements*. The International Conference on Biomedical Optics, Abstracts book, Vienna, 1996, p. 80.
259. Demos S.G., Alfano R.R., *Differential spectral polarization imaging*, The International Symposium on Biomedical Optics, Technical abstract book, San Jose, 1997, p. 121.



260. Lalayan A.A., Aidinian L.E., *Fluorescent sensitizers detection in different depth of tissue*, 7th Congress of International Photo-dynamic Association, Book of Abstracts, Nantes, France, 1998, p.RC205.
261. Lalayan A., Harutyunyan I., *Laser Fluorescence Diagnosis of Cancer in Optical Depth by Methalophthalocyanines*, The 5th International Symposium on Applied Bioinorganic Chemistry, Book of Abstracts, Corfu, Greece, 1999, p.308.
262. Lalayan A., Harutyunyan S., *Depth-resolved tumor phantom detection by second-generation photosensitizers*, The International Conference on Biomedical Optics, SPIE Conference Proceedings, 1999, v. **3568**, pp.19-23.
263. Guiliani C.R., Hess L.D., *Nonlinear absorption of light: Optical saturation of electronic transitions in organic molecules with high intensity laser irradiation*, IEEE J. Quantum Electron QE-3., 1967, pp. 358-367.
264. Rotomskis R., Mickunaitis V., Juodzevicius D., Piskarskas A., *Two-step excitation in photosensitized tumor therapy*, SPIE Conference Proceedings, 1994, v. **2325**, pp.133-143.
265. Shea C.R., Hefetz Y., Gilies R., Wimberly J., Dalickas G., Hasan T., *Mechanistic investigation of Doxycycline photosensitization by picosecond - pulsed and continuous wave laser irradiation of cells in culture*, The J. of Biolog. Chem., 1990, v. **265**, pp.5977-5982.
266. Харт Э., Амбар М., *Гидратированный электрон*, Атомиздат, М., 1973.
267. Jortner J., Sharf B., *Evidence for electron binding in frozen aqueous solution*, J. Chem. Phys., 1962, v. **37** (10), pp. 2506-2507.
268. Grossweiner L.I., Baugher. J.F., *Decay kinetics of the photochemical hydrated electron*, J. Phys. Chem., 1977, v. **81**(2), pp. 93-98.
269. Рощупкин Д.И., *Исследование первичных фотохимических процессов в белках и ароматических аминокислотах*, Автореф. Дисс. канд. биол. наук., М., 1965.
270. Nikogosyan D.N., Angelov D.A., *Formation of free radicals in water under high - power UV irradiation*, Chem. Phys. Lett., 1981, v. **77**(1), pp. 208-210.
271. Budowsky E.I., Nikogosyan D.N., Oraevsky A.A., Simukova N.A., Yakovlev D. Yu., *Direct and indirect action on thymine in aqueous solution by powerful laser ultraviolet radiation*, Photobiochem. Photobiophys., 1982, v. **4**(3), pp.233-239.
272. Andreoni A., *Two-step photoactivation of hematoporphyrin by eximer - pumped dye-laser pulses*, Photochem. Photobiol. B: Biology, 1987, v. **1**, pp.181-193.
273. Arutunyan A.G., Oganesyanyan V.A., Sarkissyan K.A., *Study of highly excited electronic states of biological molecules by nonlinear picosecond spectroscopy*, Experimental Technique of Physics, 1990, v. **38** (2), pp. 97-102.

274. Paul A., Stiel H., Teucher K., Leupold D., Stoesser R., Oelcers S. and Seifert M., *Radical formation and photodynamic activity of alkyl substituted magnesium-phtalocyanine (t4-PcMg) using two-photon excitation*, Multi-photon Photochemistry in Biological Systems 166 WE-Heraeus- Seminar at Bad Honnet, Germany, 1996.
275. Lenz P., *In vivo excitation of photosensitizers by infrared light*, Photochemistry & Photobiology, 1995, v. **62**(2), pp. 333-338.
276. 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, сс.120-124.
277. Тихонов Е.А., Шпак М.Т., *Нелинейные оптические процессы в органических соединениях*, Наукова Думка, Киев, 1979.
278. Kierdaszuk B., Gryczynski I., Modrak-Wojcik A., Bzowska A., Shugar D., Lakowicz J. R., *Fluorescence of tyrosine and tryptophan in proteins using one- and two-photon excitation*, Photochemistry and Photobiology, 1995, v. **61**(4), pp. 319–324.
279. Koller E., Quenhenberger O., Jurgens G., *Investigation of human plasma low density lipoprotein by three-dimensional fluorescence spectroscopy*, FEBS Lett., 1986, v. **198**(2), pp. 229-234.
280. Diaspro A., Corosu M., Ramoino P., Robello M., *Adapting a compact confocal microscope system to a two-photon excitation fluorescence imaging architecture*, Microscopy Research and Technique, 1999, v. **47**, pp. 196-205.
281. Di Bartolo B., Collins J., *Biophotonics: Spectroscopy, Imaging, Sensing, and Manipulation*, Springer Science & Business Media, 2010.
282. Masters B.R., So P.T.C., Gratton E., *Multiphoton excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of in vivo human skin*, Biophys. J., 1997. v. **72**, pp. 2405–2412.
283. 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, Ed. Thomas Dougherty, SPIE Conference Proceedings, 1997, v. **2972**, p. 179-182.
284. Давыдов Б.Л., Котовщиков С.Г., Нефедов Б.А., *Квантовая Электроника*, 1977, Т.4, сс.214-219.
285. Дубровский А.В., Коротеев Н.И., Шкуринов А.П., *Экспериментальное наблюдение процесса четырех-волнового смешения в оптически активной жидкости: генерация второй гармоники, чувствительной к зеркальной асимметрии биомолекул*, Письма в ЖЭТФ., 1992, Т.56(11), с. 551-555.

286. Shkurinov A.P., Dubrovskii A.V., Koroteev N.I., *Second harmonic generation in an optically active liquid: experimental observation of a fourth-order optical nonlinearity due to molecular chirality*, Physical Review Letters., 1993, v. **70**(8), pp.1085-1088.
287. Sharkov A.V., Gillbro T., *Second harmonic generation in oriented purple membrane films under picosecond light excitation*, Thin Solid Films, 1991, v. **202**, pp. 9-14.
288. Altshuler B.G., Grisimov V.N., *New optical effects in the human hard tooth tissues*, Proc. SPIE: Laser and Medicine, 1991, v. **1353**, pp. 97-102.
289. Altshuler G.B., Belashenkov N.R., Karasev V.B., Skripnik A.A., Solounin A.A., *Application of ultrashort laserpulses in dentistry*, Proc. SPIE, Dental Application of Lasers,1993,v. **2080**, pp.77-81.
290. Hovanessian V.A., Lalaian A.A., *Investigation of second harmonic generation peculiarities in tissues*, Proc. of Int. Conference Lasers-95, Conference Proceedings, Ashtarak, 1995,pp. 120-124.
291. Hovanessian V.A., Lalaian A.A., *Second harmonic generation in biological tissues*, *The 6 Int. conf. on lasers application in life scienses*, Book of Abstract, Jena, Germany, 1996, p. TL7-3.
292. Hovanessian V.A., Lalayan A.A., *Second harmonic generation in biofiber containing tissues*, The Int. Conference Lasers -96, Books of Abstracts, Portland, USA, 1996, pp. 107- 109.
293. Zernike F., Midwinter J.E., *Applied Nonlinear Optics*, John Wiley, New York, 1973.
294. Zipfel W.R., Williams R.M., Webb W.W., *Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the biosciences*, Nature Biotech, 2003, v. **21**, pp.1369–1377.
295. Denk W., Strickler J.H., Webb W.W., *Two-photon laser scanning microscopy*, Science, 1990, v.**248**, pp. 73–76.
296. Keonig K., Riemann I., *High-resolution multiphoton tomography of human skin with subcellular spatial resolution and picosecond time resolution*, J Biomed Opt.,2003, v.**8**, pp.432–439.
297. Zipfel W.R., Williams R.M., Christie R., Nikitin A.Y., Hyman B.T., Webb W.W., *Live tissue intrinsic emission microscopy using multiphoton-excited native fluorescence and second harmonic generation*, Proc Natl Acad Sci USA, 2003, v. **100**, pp. 7075–7080.
298. Freund I., Deutsch M., Sprecher A., *Optical second-harmonic microscopy, crossed-beam summation and small-angle scattering in rat-tail tendon*, Biophys J., 1986, v. **50**, pp. 693–712.
299. Guo Y., Ho P.P., Tirkšliunas A., Liu F., Alfano R.R., *Optical harmonic generation from animal tissues by the use of picosecond and femtosecond laser pulses*, Applied Optics-OT, 1996, v.**35**, pp. 6810-6813.

300. Guo Y., Ho P.P., Savage H., Harris D., Sacks P., Schantz S., Liu F., Zhadin N., Alfano R.R., *Second-harmonic tomography of tissues*, Opt Lett., 1997, v. **22**, pp.1323–1325.
301. Guo Y., Savage H.E., Liu F., Schantz S. P., Ho P., Alfano R.R., *Subsurface structure of tissues investigated by noninvasive optical second harmonic tomography*, The International Conference on Biomedical Optics, SPIE Conference Proceedings, 1999, v. **3597**, pp.480-482.
302. 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.
303. Lalayan A.A., *Nonlinear-optical spectroscopy for tissue diagnostics: application to laser ablation of skin tissue*, Proc. SPIE of Femtosecond Laser Applications in Biology, 2004, v. **5463**, pp. 127-132.
304. Lalayan A.A., *Nonlinear-optical diagnostics for laser ablation and photoheating of biotissue*, Applied Surface Science, 2005, v. **248**(1-4), pp. 24-27.
305. Lalayan A.A., *Second harmonic diagnostics for laser welding and ablation of skin*, *The Int. Conf. on Biomedical Optics*, OSA Proceedings, Florida, USA, 2006, pp.TuD 18: (1)- (3).
306. Lalayan A., Janunts E., *Two-photon fluorescence and second harmonic generation phenomena in the ordered tissue.*, Proc. SPIE of Commercial and Biomedical Applications of Ultrafast and Free-Electron Lasers, 2002, v. **4633**, pp. 69-73.