

ВОЗДЕЙСТВИЕ ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ВЕЩЕСТВО. ЛАЗЕРНАЯ ПЛАЗМА**Лазерно-индуцированный перенос гелевых микрокапель для клеточной печати****В.И.Юсупов, В.С.Жигарьков, Е.С.Чурбанова, Е.А.Чутко, С.А.Евлашин, М.В.Горленко, В.С.Чепцов, Н.В.Минаев, В.Н.Баграташвили**

Изучены тепловые и транспортные процессы при переносе гелевых микрокапель в условиях лазерной клеточной микропечати. Определены особенности взаимодействия импульсного лазерного излучения ($\lambda = 1.064$ мкм, длительность импульсов 4–200 нс, энергия 2 мкДж – 1 мДж) с поглощающей пленкой золота, нанесенной на стеклянную донорную подложку. Исследование динамики транспортных процессов с помощью высокоскоростной оптической видеосъемки и оптоакустических методов позволило определить характеристики формируемых гелевых струй в зависимости от режимов работы лазера. Рассмотрен гидродинамический процесс взаимодействия лазерного излучения с золотым покрытием с нанесенным на него гидрогелевым слоем, а также проведена оценка температуры в области воздействия лазерного импульса. Показано, что в механизме лазерно-индуцированного переноса значительную роль играют процессы взрывного кипения воды (в геле) и золота. Определено количество наночастиц золота, попадающих на акцепторную пластину в процессе лазерного переноса. При длительности лазерного импульса 8 нс и малых энергиях (менее 10 мкДж) доля наночастиц золота в микрокаплях геля ничтожно мала, а с увеличением энергии импульса их количество линейно возрастает. Проведенные исследования дают основу для оптимизации процессов лазерного переноса гелевых микрокапель в быстроразвивающихся технологиях клеточной микропечати.

Ключевые слова: лазерно-индуцированный перенос, гелевые микрокапли, клеточная печать.

1. Введение

Технологии лазерно-индуцированного переноса вещества (LIFT – laser-induced forward transfer) [1–6] широко применяются в биомедицине для печати биологических материалов [7–9], для печати стволовых клеток в клеточной инженерии [10], для печати функционирующих органов [11], для нанесения ДНК или белка на биочипы [12], для изолирования отдельных клеток [13], а в самое последнее время – и для выделения (микросамплинга) труднокультивируемых микроорганизмов [14].

При осуществлении лазерно-индуцированного переноса на донорную пластинку, состоящую из пластинки стекла с нанесенным на рабочую сторону тонким поглощающим (обычно металлическим) покрытием, наносится слой субстрата (обычно – гель с клетками). Излучение импульсного лазера фокусируется на поглощающем слое. Под действием короткого лазерного импульса небольшая часть поглощающего слоя испаряется, в результате чего возникает скачок давления, который приводит к переносу микрокапли гелевого субстрата на акцепторную пластинку. Характеристики процесса лазерного переноса зависят от параметров импульса лазерного излучения

(длина волны, длительность, энергия, интенсивность, параметры фокусировки), от состава, толщины и структуры поглощающего покрытия, а также от толщины слоя гелевого субстрата, его состава, однородности, вязкости, величины поверхностного натяжения, от материала донорной и акцепторной пластинок. Важно, что технология лазерного переноса позволяет целенаправленно переносить нужное микроскопическое количество вещества (отдельные клетки и их агрегаты, частицы биотканей и носителей клеток и микроорганизмов).

При переносе живых систем технологии определяется возможностью обеспечения переноса с донорной пластинки на акцепторную нужного количества клеточно-гелевого субстрата без разрушения структур клеточных систем. На клеточные системы, переносимые с помощью лазерной печати, может оказать воздействие целый ряд физических факторов: 1) импульсное лазерное излучение, прошедшее через поглощающую пленку; 2) ударные волны; 3) высокие температуры; 4) широкополосное оптическое излучение, связанное с быстрым лазерным нагревом материала поглощающей пленки и образованием плазмы; 5) наночастицы поглощающей пленки, которые вместе с гелем могут переноситься на акцепторную подложку. Поэтому весьма актуальным является определение уровня воздействия таких процессов на клетки и его минимизация.

В настоящей работе рассмотрены тепловые и транспортные процессы, возникающие при переносе микрообъемов субстрата на основе геля (2%-ный водный раствор гиалуроновой кислоты) под действием наносекундных импульсов лазерного излучения с длиной волны 1.064 мкм. Измерены энергии лазерных импульсов, прошедших через золотую поглощающую пленку. Получена зависимость содержания наночастиц золота в микрокапле на акцепторной подложке от энергии лазерного импульса.

В.И.Юсупов, В.С.Жигарьков, Е.С.Чурбанова, Е.А.Чутко, Н.В.Минаев, В.Н.Баграташвили. Институт фотонных технологий ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Россия, 142190 Москва, Троицк, ул. Пионерская, 2; e-mail: iouss@yandex.ru
С.А.Евлашин. Сколковский институт науки и технологий, Центр по проектированию, производственным технологиям и материалам, Россия, 143025 Москва, Сколково, ул. Новая, 100
М.В.Горленко, В.С.Чепцов. Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова, Россия, 119991 Москва, Воробьевы горы

Поступила в редакцию 1 сентября 2017 г.

2. Материалы и методы

Для осуществления лазерного переноса использовали излучение импульсного волоконного лазера YLPM-1-4x200-20-20 (НТО «ИРЭ-Полус», Россия) с длиной волны 1064 нм, длительностью импульсов 4–200 нс, их энергией 2 мкДж–1 мДж и с приближенным к гауссову профилем интенсивности в пучке ($M^2 < 1.5$). Сканирование лазерного излучения осуществляли с помощью двухзеркальной гальваносканирующей головки LscanH-10-1064 (АтекоТМ, Россия) с F-theta объективом SL-1064-110-160 (Ronar-Smith, Сингапур) с фокусным расстоянием 160 мм, позволяющим фокусировать лазерное излучение на облучаемой поверхности в пятно диаметром 30 мкм.

Донорными пластинками служили стандартные прямоугольные предметные стекла AG00000112E (Menzel, Thermo Fisher Scientific), на которые с помощью магнетронного распыления [15] наносился слой золота толщиной 50 нм. Толщины пленок определялись с использованием оптического профилометра ЛОМО МИИ4. Донорную пластинку закрепляли золотым покрытием вниз на магнитном держателе таким образом, чтобы покрытие находилось в фокальной плоскости объектива с точностью не хуже 100 мкм.

В экспериментах по лазерному переносу в качестве субстрата использовался гель на основе гиалуроновой кислоты (2%-ный раствор в воде). Вязкость геля, определенная вискозиметром microVISC (RheoSense, США) составляла 15.5 ± 0.05 мПа·с. В отдельных экспериментах, направленных на изучение транспортных процессов при лазерном микросамплинге носителей микроорганизмов, в гель добавлялись частицы почвы размером менее 300 мкм (200 мг почвы на 1.4 мл геля). При подготовке донорной пластинки к экспериментам на слой золота наносился слой рабочей жидкости (геля или геля с почвой) толщиной 200 ± 30 мкм. Для этого донорную пластинку размещали на моторизованной подвижке горизонтально и на нее наносили каплю (100 мкл) рабочей жидкости, которая размазывалась с помощью лезвия ножа, установленного с необходимым зазором над поверхностью.

На рис.1 приведена схема установки для лазерно-индуцированного переноса субстрата. Излучение импульсного лазера, прошедшее через формирователь пучка и сканер, фокусировалось на поглощающем покрытии до-

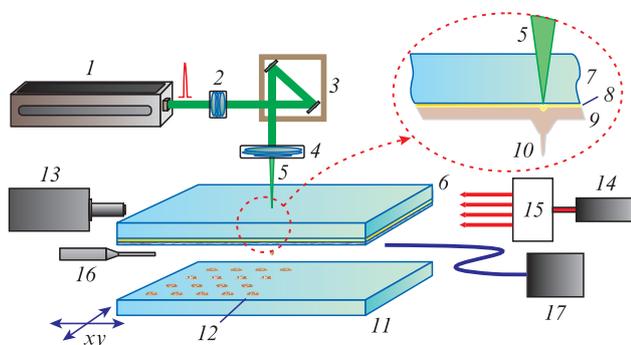


Рис.1. Схема установки для лазерно-индуцированного переноса гелевых микрокапель:

1 – импульсный лазер; 2 – формирователь пучка; 3 – сканер; 4 – объектив; 5 – сфокусированный пучок; 6 – донорная пластинка; 7 – стеклянная пластинка; 8 – слой Au; 9 – слой субстрата; 10 – струя субстрата; 11 – акцепторная пластинка; 12 – микрокапли; 13 – высокоскоростная камера; 14 – непрерывный лазер; 15 – телескоп; 16 – игольчатый гидрофон; 17 – волоконный спектрометр.

норной пластинки. Полученные при лазерном облучении микрокапли субстрата собирались на акцепторной пластинке, установленной на расстоянии 1 мм от нижней поверхности донорной пластинки.

Оптическая регистрация лазерно-индуцированных транспортных процессов проводилась с помощью высокоскоростной камеры Fastcam SA-3 (Photron, Япония) при скорости до 60 000 кадр./с. Подсветка осуществлялась излучением непрерывного лазерного диода 14 с длиной волны 660 нм, сформированным телескопом 15 для получения круглого пучка диаметром 14 мм. Для контроля спектрального состава и мощности сопутствующего оптического излучения использовался смещенный с ПК оптоволоконный анализатор спектра USB4000 (Ocean Optics, США) с разрешением ~ 1.5 нм (спектральный диапазон 200–1100 нм).

Для контроля лазерно-индуцированных динамических процессов помимо оптического использовался также оптоакустический метод [16, 17]. Акустические сигналы регистрировались игольчатым гидрофоном (Precision Acoustics, Великобритания) диаметром 1 мм с предусилителем с шириной полосы 10 кГц–50 МГц (чувствительность – 241 дБ относительно 1 В/мкПа) и записывались четырехканальным цифровым запоминающим осциллографом GDS 72304 (GW Instek, Тайвань) с полосой пропускания 300 МГц. Во время эксперимента рабочую часть гидрофона помещали в микрокювету с водой, поверхность которой соприкасалась с поглощающим слоем пластинки. Тем самым был обеспечен акустический контакт между областью поглощающего слоя, на которую воздействовал лазерный импульс, и чувствительным элементом гидрофона. Расстояние от торца гидрофона до области лазерной фокусировки на пленке составляло ~ 4 мм. Оптоакустический метод был также нами использован для оценки коэффициента поглощения K_f импульсного лазерного излучения в пленке золота. Для этого амплитуды акустических импульсов с пленкой золота (P_1) сравнивались с амплитудами импульсов при воздействии лазерных импульсов на подложку с пленкой углерода (P_2). Толщина слоя углерода составляла ~ 1 мкм и была достаточной для полного поглощения лазерного излучения с длиной волны 1064 нм. Учитывая, что амплитуда акустического импульса пропорциональна поглощенной энергии лазерного излучения [18, 19], величину K_f оценивали из соотношения $K_f = P_1/P_2$.

Оптические свойства пленок измерялись в диапазоне 200–800 нм с использованием спектрометра Cary 50 Scan (Agilent, США), а в диапазоне 700–2000 нм – спектрометра UV-3600 (Shimadzu, Япония). Контроль энергии импульсного лазерного излучения производился с помощью термодатчика для измерения мощности S310C (Thorlabs, США) и фотодиодного датчика для измерения мощности S144C в сочетании с цифровой измерительной панелью управления PM100D (все приборы – Thorlabs). Исследование образцов проводилось с помощью оптического 3D микроскопа HRM-300 Series, (Huvitz, Корея) и сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) PHENOM ProX (Phenom World, Нидерланды) с блоком энергодисперсионного детектора.

Наличие наночастиц золота в каплях геля на акцепторной пластинке определялось по СЭМ-изображениям с использованием данных энергодисперсионного анализа. При этом с помощью такого анализа выделялись наночастицы золота, а на СЭМ-изображениях в грациях

серого оценивалась их яркость B_i . Затем определялись средняя величина \bar{B}_i и стандартное отклонение Δ . Далее в пакете MATLAB проводилась обработка СЭМ-изображений. За наночастицы золота принимались компактные области изображения с $B_i \geq \bar{B}_i - \Delta$.

3. Результаты

На рис.2 представлен спектр пропускания низкоинтенсивного оптического излучения донорной пластиночкой с пленкой золота. С увеличением длины волны коэффициент пропускания T_{tr} увеличивается, достигает максимума на $\lambda \approx 500$ нм и затем монотонно уменьшается. На рабочей длине волны лазера (1064 нм) через слой золота проходит $\sim 0.15\%$ оптической энергии.

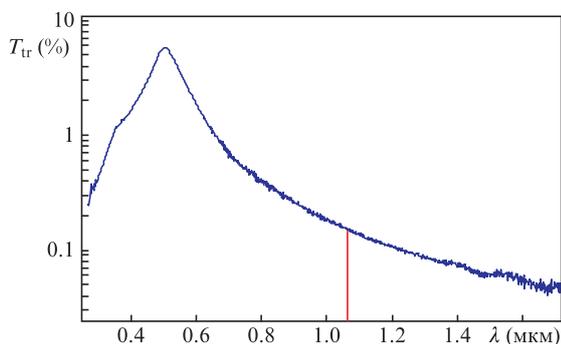


Рис.2. Спектр пропускания низкоинтенсивного оптического излучения донорной пластиночкой с пленкой золота толщиной 50 нм. Отмечена длина волны лазерного излучения.

Воздействие коротких и мощных лазерных импульсов приводит к образованию в пленке золота донорной пластиночки отверстий, хорошо различимых с помощью оптического микроскопа (рис.3). Отверстия в пленке имеют почти круглую форму и внутри содержат относительно темные области в виде концентрических кругов или колец. С увеличением энергии лазерного импульса E (в мкДж) диаметр отверстий (в мкм) увеличивается в среднем по закону $19E^{0.26}$, а внешний диаметр внутренних темных областей – как $12E^{0.33}$.

При использовании донорной пластиночки со слоем субстрата параметры лазерных отверстий и внутренних структур в пленке золота изменяются. На рис.4 представлены СЭМ-изображения отверстий в золотой пленке, полученных при различных энергиях лазерных импульсов без использования геля и с гелем в донорной пластиночке. Видно, что добавление геля существенно изменило структуру отверстий: 1) изменился их размер; 2) появилась «толстая» окантовка из отогнутых наружу фрагментов пленки; 3) резко уменьшился диаметр внутренних областей.

На рис.5 представлены СЭМ-изображения участка донорной пластиночки после импульсного лазерного воздействия ($\tau = 8$ нс, $E = 20$ мкДж) и фрагментов кольца во внутренней части отверстия в различных масштабах. Из рис.5,б и в видно, что кольцо во внутренней части отверстия состоит из наночастиц золота, размер которых в среднем монотонно увеличивается от 30–50 нм вблизи центра до 100–200 нм на периферии.

При воздействии на донорную пластиночку мощных лазерных импульсов наблюдается яркая вспышка света. На рис.6 представлены отдельные кадры, полученные с по-

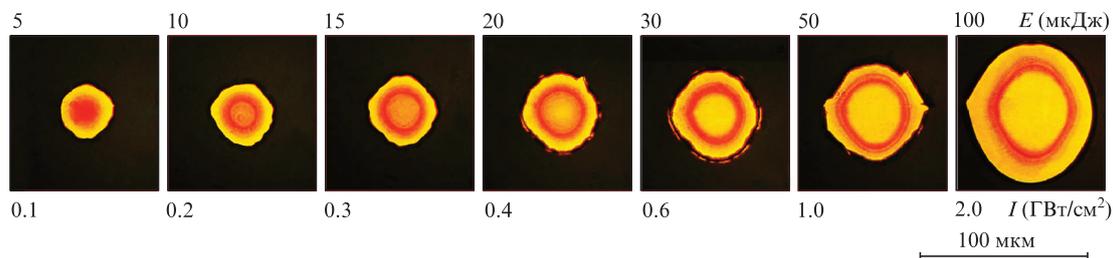


Рис.3. Оптические изображения в проходящем свете отверстий в пленке золота, полученных при различных энергиях E лазерных импульсов и интенсивностях излучения I ; $\tau = 8$ нс.

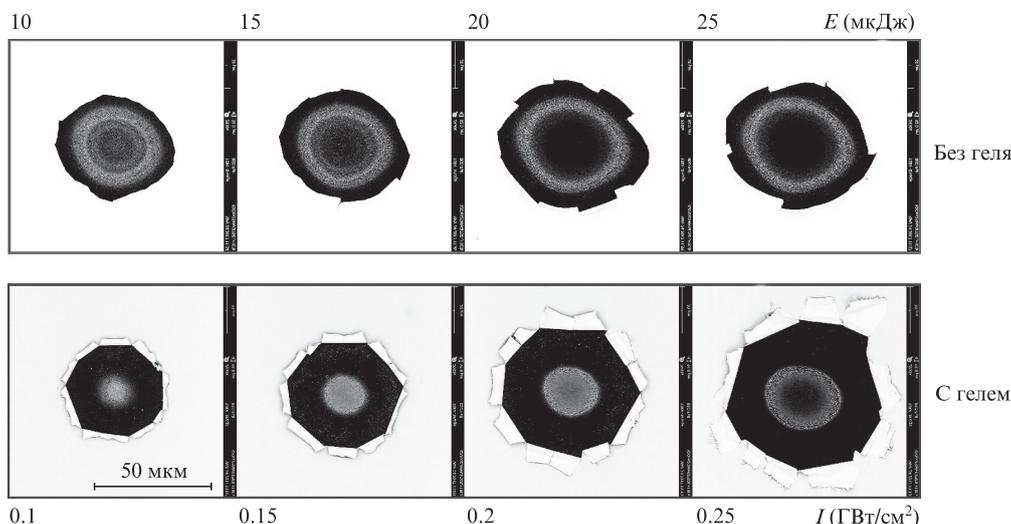


Рис.4. СЭМ-изображения отверстий в золотой пленке, полученных при различных энергиях лазерных импульсов и интенсивностях излучения в отсутствие геля и при его наличии в донорной палстинке; $\tau = 8$ нс.

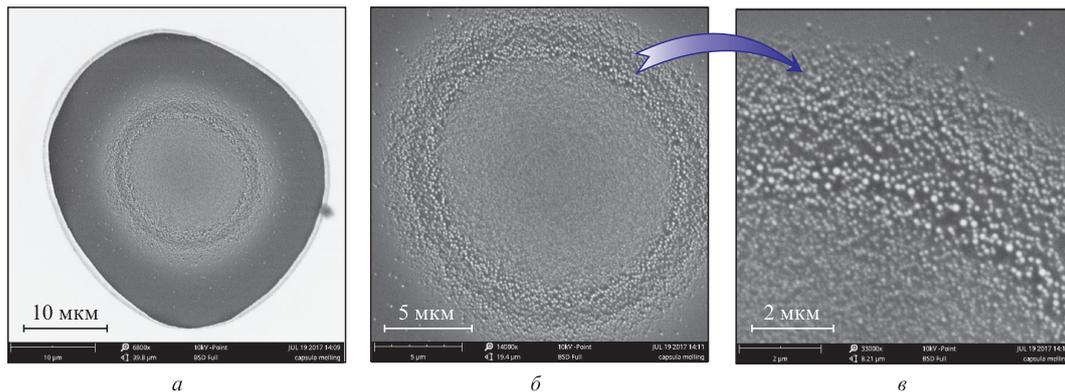


Рис.5. СЭМ-изображение участка донорной пластинки с пленкой золота после импульсного лазерного воздействия ($\tau = 8$ нс, $E = 20$ мкДж, $I = 0.4$ ГВт/см²) (а) и увеличенные фрагменты кольца из наночастиц золота (б, в).

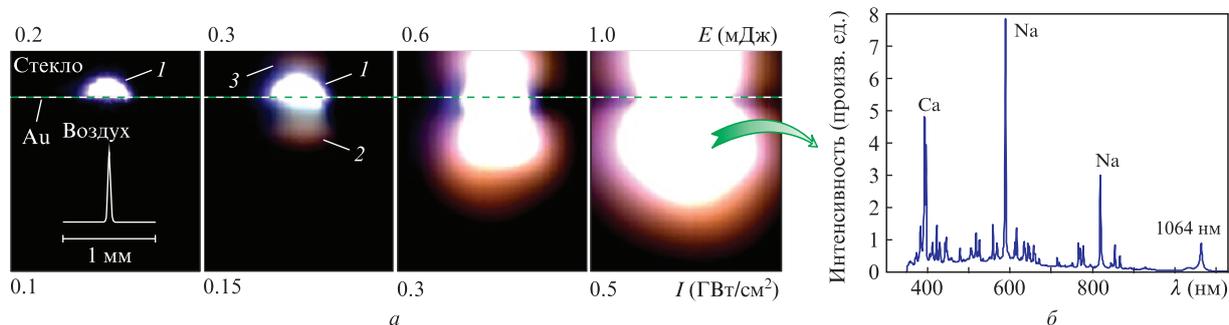


Рис.6. Кадры съемки оптического излучения при воздействии на донорную пластинку лазерных импульсов с различными энергиями E и интенсивностями I (1 – нагретая область стекла, 2 – плазма, 3 – отражение светящейся плазмы) (а) и спектр оптического излучения при $E = 1$ мДж (б). На первом кадре условно показано радиальное распределение интенсивности лазерного излучения на оси 8.8×10^7 Вт/см². Штриховая линия – пленка золота.

мощью камеры Fastcam SA-3, на которых зарегистрированы светящиеся области при различных энергиях лазерного импульса. Видно, что с увеличением энергии размеры этих областей увеличиваются, а их поперечный размер существенно превышает ширину лазерного пучка на поглощающей пленке. Отметим, что при $E = 0.2$ мДж область свечения расположена в стекле выше пленки Au. При возрастании энергии появляется также светящаяся область в воздухе. Спектральные характеристики этого оптического излучения (широкополосное излучение с характерными узкими линиями) позволяют сделать вывод о том, что его источником является плазма.

При воздействии лазерных импульсов на донорную подложку со слоем геля в случае превышения энергией импульса пороговой энергии ($E_{th} \approx 0.05$ мДж) происхо-

дит формирование тонких струй геля (рис.7). Когда энергия лазерного импульса ниже пороговой, в области лазерного воздействия на поверхности геля наблюдается едва заметное набухание. С увеличением энергии формируется тонкая струя геля, диаметр этого набухания вначале уменьшается (при $E = 70$ мкДж), а затем монотонно увеличивается. При $E = 70$ мкДж струя выходит за пределы кадра и ее скорость превышает 40 м/с. В области больших энергий ($E \geq 0.2$ мДж) в геле вблизи пленки золота возникает светящаяся область 3 (рис.7).

Зависимости коэффициента пропускания импульсного излучения пленкой золота от энергии лазерных импульсов при $\tau = 8-200$ нс представлены на рис.8. Практически для всех кривых с увеличением энергии в среднем наблюдается постепенное уменьшение коэффициента про-

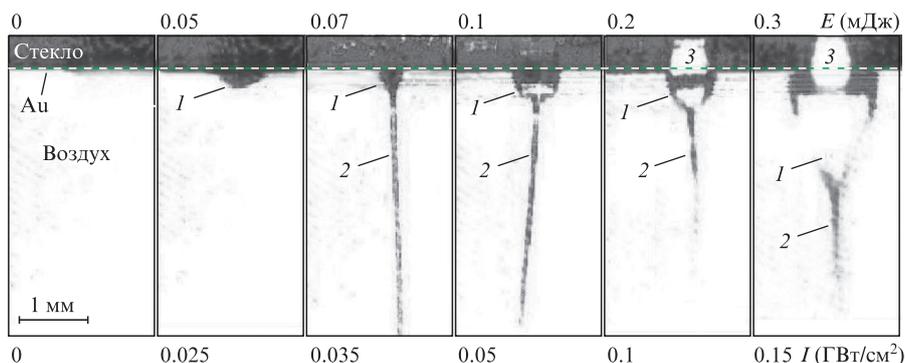


Рис.7. Формирование струй геля при воздействии на донорную пластинку лазерного импульса с различными энергиями и интенсивностями ($\tau = 200$ нс): 1 – пузырек, 2 – струя геля, 3 – светящаяся плазма. Штриховая линия – пленка золота. Скорость съемки 10000 кадр/с.

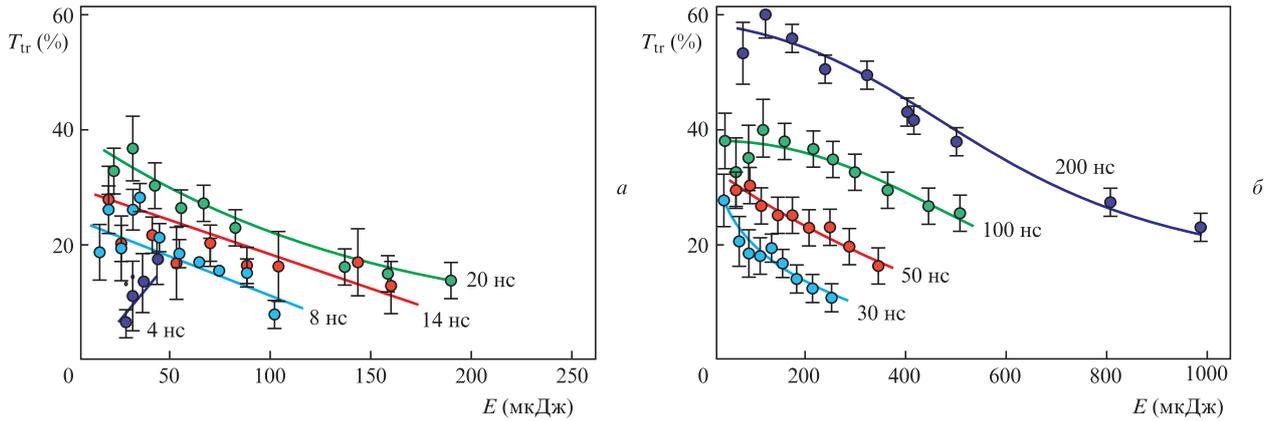


Рис.8. Зависимости коэффициента пропускания лазерного излучения пленкой золота от энергии импульса при его малых (а) и больших (б) длительностях (указаны на кривых).

пускания T_{tr} . Исключение составляют случаи с $\tau = 4$ нс и две начальные точки для длительностей импульса 8 и 20 нс, когда с ростом энергии T_{tr} увеличивается. Наибольшее значения коэффициента пропускания для случая малых τ составило $36.0\% \pm 4.2\%$ при $\tau = 20$ нс и $E = 17$ мкДж (рис.8,а), а для больших τ – $60.0\% \pm 4.3\%$ при $\tau = 200$ нс и $E = 160$ мкДж (рис.8,б). Наименьшее зарегистрированное значение T_{tr} для случая малых τ равнялось $6.1\% \pm 2.4\%$ при $\tau = 4$ нс, $E = 24$ мкДж, $\Phi = 1$ Дж/см² (рис.8,а), а для больших τ – $10.3\% \pm 2.5\%$ при $\tau = 30$ нс, $E = 235$ мкДж, $\Phi = 75$ Дж/см² (рис.8,б). Здесь Φ – плотность энергии лазерного импульса.

Акустические сигналы, зарегистрированные при воздействии лазерного импульса на донорные пластинки со слоем золота и слоем углерода, представлены на рис.9. Первые акустические сигналы достигают гидрофона через $\tau \approx 1$ мкс после лазерного воздействия, а спустя ~ 3 мкс приходят мощные акустические импульсы с амплитудами P_1 и P_2 , после чего наблюдаются высокочастотные осцилляции давления с периодом, постепенно возрастающим от 0.1 до 0.7 мкс. Полученные данные позволяют оценить коэффициент поглощения импульсного лазерного излучения в пленке золота: $K_f = P_1/P_2 \approx 18\% \pm 4\%$.

На рис.10 представлены примеры, иллюстрирующие некоторые особенности распределения наночастиц золота в каплях геля на акцепторной подложке. Результаты математической обработки СЭМ-изображений показали, что практически во всех случаях в каплях геля присутствует определенное количество этих наночастиц (рис.10,а).

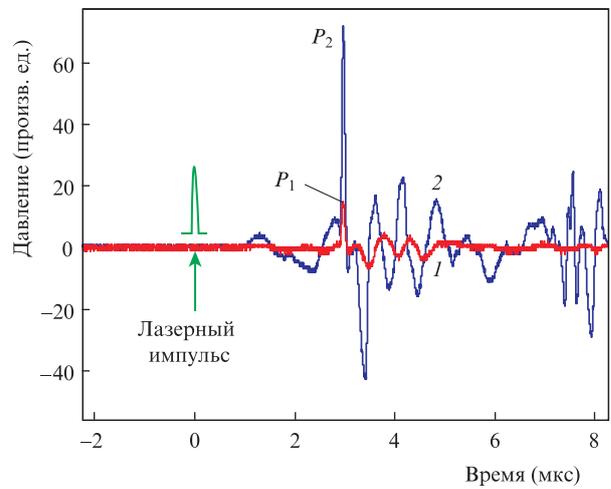


Рис.9. Акустические сигналы, зарегистрированные при воздействии лазерного импульса ($\tau = 8$ нс, $E = 20$ мкДж, $I = 0.4$ ГВт/см²) на пластинки со слоем золота (1) и слоем углерода (2); P_1 и P_2 – мощные акустические импульсы.

При больших энергиях лазерных импульсов в капле, а иногда и за ее пределами, обнаруживаются частицы пленки Au (рис.10,б). В некоторых случаях наночастицы золота при переносе распределяются на подложке не случайным образом, а, например, в виде филаментарных структур (рис.10,в). Эксперименты показали, что количество золота в каплях геля в виде наночастиц и микрочастиц за-

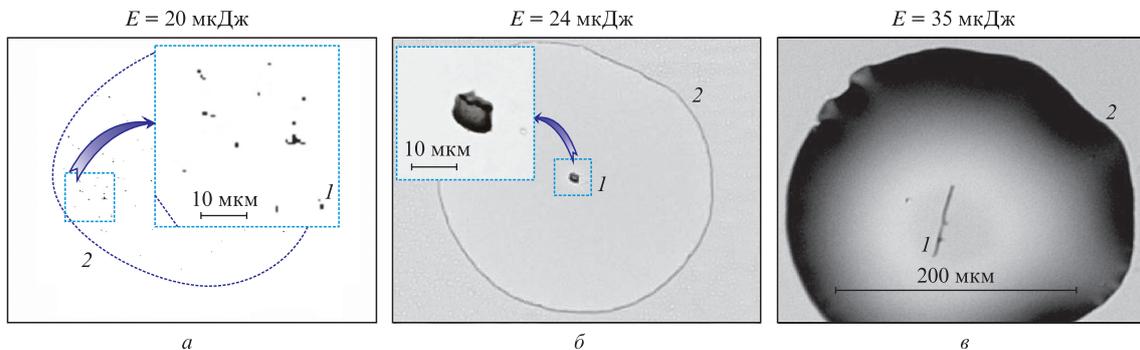


Рис.10. Примеры распределений микро- и наночастиц золота в каплях геля при различных энергиях лазерного импульса: результат математического выделения наночастиц золота по СЭМ-изображению капли (а), а также СЭМ-изображения капель с микрочастицей золота (б) и филаментарной структурой из наночастиц золота (в); 1 – нано- или микрочастицы золота; 2 – контур капли геля. На вставках – участки капель в увеличенном виде.

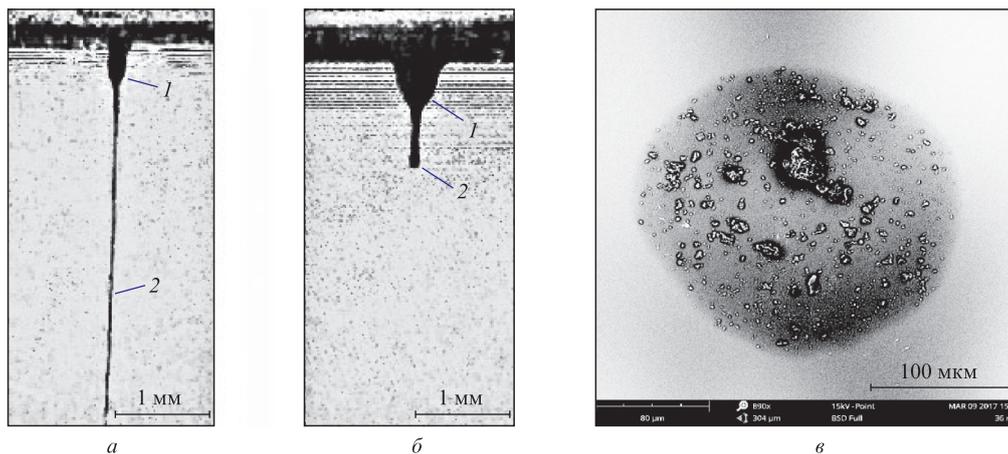


Рис.11. Генерация струй при воздействии лазерного импульса ($\tau = 8$ нс, $E = 10$ мкДж) на донорную пластинку с чистым гелем (а) и с гелем с микрочастицами почвы (б), а также СЭМ-изображение капли геля с частицами почвы (в): 1 – пузырек, 2 – струя геля или субстрата.

висит от энергии E и длительности τ лазерных импульсов и в среднем растет с увеличением E . Так, при $\tau = 8$ нс содержание наночастиц S_{Aldr} , которое равно отношению занимаемой ими на СЭМ-изображениях площади к площади капли (в процентах) в широком диапазоне энергий лазерного импульса ($5 \text{ мкДж} \leq E \leq 100 \text{ мкДж}$) практически линейно зависит от E : $S_{\text{Aldr}} \approx 0.01E$.

Эксперименты по микросамплингу субстрата, состоящего из геля с микрочастицами почвы, показали, что их добавление в гель существенным образом меняет параметры транспорта микрокапли. На рис.11 в качестве примера приведены кадры скоростной съемки со струями геля в двух случаях: с чистым гелем (рис.11,а) и с гелем с почвенными микрочастицами (рис.11,б). Видно, что добавление частиц привело к утолщению как самой струи, так и пузырька у ее основания (рис.11,б), а скорость струи уменьшилась примерно в 6 раз. При этом объемы струй на рис.11а,б практически не изменились (5 нл в случае геля и 5 нл в случае субстрата). Перенос субстрата привел к образованию на акцепторной пластинке капли диаметром 224 ± 12 мкм, внутри которой по всей площади выделяются частички почвы размером от 1 до 30 мкм (рис.11,в).

4. Обсуждение

Эксперименты показали, что поглощение коротких и мощных импульсов лазерного излучения в пленке золота донорной пластинки вызывает образование в ней почти круглых отверстий (рис.3, 4), внутри которых содержатся относительно темные области в виде концентрических кругов или колец. С увеличением энергии лазерного импульса размер отверстий и этих областей, состоящих из наночастиц золота, монотонно увеличивается. Сравнительные размеры отверстий при различных энергиях импульса и считая лазерный пучок гауссовым, легко оценить пороговую интенсивность, необходимую для образования отверстий в пленке ($I_{\text{th}} \approx 4 \times 10^7$ Вт/см², соответствует плотности энергии $\Phi_{\text{th}} \approx 0.3$ Дж/см²). Поглощение лазерного излучения вызывает быстрый нагрев участка пленки до высоких температур и образование в ней отверстий. В металлах лазерное излучение поглощается электронами и затем за 1–10 пс в процессе электрон-решеточной релаксации передается атомам [20], что приводит к быстрому объемному нагреву материала. Такой нагрев в наносекундных масштабах вызывает возникновение импульса

отдачи, связанного с быстрым расширением материала, плавление и испарение части пленки Au, а также формирование плазменного факела [20] (см. также рис.6).

При наличии в донорной пластинке слоя геля структура лазерно-индуцированных отверстий в пленке золота резко изменяется (рис.4). Существенно уменьшаются размеры внутренних областей отверстий, содержащих наночастицы золота, и появляется «толстая» окантовка из отогнутых наружу участков золотой пленки. Мы полагаем, что эти эффекты вызваны образованием и кавитационным схлопыванием пузырька [21], возникающего при импульсном лазерном нагреве (рис.7). Такой пузырек образуется из-за взрывного кипения воды в геле [17], а при относительно высоких температурах (в случае больших интенсивностей лазерного излучения) также в результате взрывного кипения золота [22] и образования плазмы (см. рис.6 при $E \geq 0.3$ мДж и рис.7 при $E \geq 0.2$ мДж). После расширения до максимальных размеров пузырьки в геле кавитационно схлопываются [21]. В результате атомы и наночастицы золота, находящиеся в этой области вблизи поверхности подложки и на поверхности пузырька [23], собираются в центре лазерно-индуцированного отверстия в структуру меньшего размера, чем в отсутствие геля (рис.4). Как видно из рис.7, рассмотренные выше лазерно-индуцированные гидродинамические процессы приводят не только к формированию пузырька в геле, но и к возникновению тонкой струи геля (рис.7), перемещающейся в сторону акцепторной подложки (см. рис.1) с большой скоростью, превышающей 40 м/с при $I = 35$ МВт/см².

Нагрев пленки золота и соприкасающегося с ней участка геля происходит в результате поглощения в пленке лазерного излучения. Для небольших интенсивностей лазерного излучения спектр поглощения тонких золотых пленок достаточно хорошо изучен [24]. В нашем случае, когда происходит нагрев до высоких температур, приводящих к скачкообразному уменьшению коэффициента отражения лазерного излучения [25], плавлению и испарению золота и даже к образованию плазмы (рис.6), оценка коэффициента поглощения K_f проведена методами оптоакустики. Для этого осуществлено сравнение амплитуд лазерно-индуцированных акустических импульсов (P_1 и P_2 на рис.9) при воздействии лазерного импульса на подложки с пленками золота и углерода, в слое которого лазерное излучение поглощается полностью. Учитывая, что амплитуды акустических импульсов пропорциональны погло-

щенной лазерной энергии [18, 19], $K_f = P_1/P_2$. В оптоакустическом эксперименте величина коэффициента поглощения пленки золота была определена для импульсного лазерного излучения с $\tau = 8$ нс, $E = 20$ мкДж и $I = 0.4$ ГВт/см²: $K_f \approx 18\% \pm 4\%$.

Постепенный нагрев пленки золота до температуры $T(t)$ в результате воздействия лазерного импульса сопровождается следующими процессами. Одновременно с пленкой золота до этой температуры нагреваются тонкие слои стекла и геля, состоящего в основном из воды. Глубины термического прогрева со временем t будут увеличиваться: для стекла $d_T^g = \sqrt{4D_T^g t}$, где $D_T^g = 3.4 \times 10^{-7}$ м²/с – коэффициент теплопроводности стекла, для геля (воды) $d_T^w = \sqrt{4D_T^w t}$, где $D_T^w = 1.4 \times 10^{-7}$ м²/с – коэффициент теплопроводности воды. При температуре $T_1 = (0.9 - 1)T_c^w \approx 600$ К, где $T_c^w = 647.1$ К – критическая температура воды, в прогретом тонком слое геля происходит взрывное кипение воды [26] с образованием в области лазерного воздействия расширяющегося с большой скоростью пузырька. При $T_2 = 1336$ К происходит плавление пленки золота, а при $T_3 \approx 7000$ К ($T_c^{\text{gold}} = 7250$ К) – ее взрывное кипение с образованием расширяющегося пузырька. Поскольку критическое давление для золота очень велико (~ 500 МПа) и существенно превышает критическое давление для воды (~ 22 МПа), часть частиц и атомов золота достигает стенки расширяющегося пузырька геля и проникает в гель. Поглощенная при этом в геле кинетическая энергия приводит к ускорению его струи.

Температуру в области лазерного воздействия к концу лазерного импульса ($t = \tau$) можно оценить, используя [27], с помощью выражения

$$T = T_0 + \frac{\Phi_{\text{abs}}}{\rho^g C_p^g d_T^g + \rho^{\text{gold}} C_p^{\text{gold}} h + \rho^w C_p^w d_T^w}, \quad (1)$$

где $T_0 \approx 300$ К – начальная температура; ρ – плотность; Φ_{abs} – плотность поглощенной за время импульса лазерной энергии; C_p – удельная теплоемкость; d_T – глубина термического прогрева за время $t = \tau$; h – толщина слоя золота. Определим T в (1) для $\tau = 8$ нс, $E = 20$ мкДж, $I = 0.4$ ГВт/см² (см. рис.9), когда методом оптоакустики был найден коэффициент поглощения $K_f \approx 18\% \pm 4\%$. Тогда $\Phi_{\text{abs}} = K_f I \tau = 5.8$ кДж/м² и, подставляя в (1) табличные значения ($\rho^g = 2500$ кг/м³, $\rho^{\text{gold}} = 19320$ кг/м³, $\rho^w = 1000$ кг/м³, $C_p^g = 700$ Дж·кг⁻¹·К⁻¹, $C_p^{\text{gold}} = 128.7$ Дж·кг⁻¹·К⁻¹, $C_p^w = 4200$ Дж·кг⁻¹·К⁻¹), для $h = 50$ нм получим $T \approx 10^4$ К.

Поскольку одним из факторов воздействия на клеточные системы в процессе лазерного переноса может быть импульсное лазерное излучение, прошедшее через поглощающую пленку, были выполнены эксперименты, направленные на исследование коэффициента пропускания T_{tr} . Спектрометрические измерения (см. рис.2) показали, что при небольших интенсивностях лазерного излучения коэффициент пропускания пленки золота на длине волны излучения лазера 1064 нм составляет $\sim 0.15\%$. При таких интенсивностях большая часть лазерной энергии отражается от пленки, а практически все оставшееся излучение поглощается в пленке золота толщиной 50 нм. Измерения, проведенные в диапазоне энергий лазерных импульсов 5 мкДж–1 мДж при длительностях τ от 4 до 200 нс (рис.8), показали, что через подложку со слоем золота проходит от 10% до 60% энергии. Наименьшие значения коэффициента пропускания для самых коротких ($\tau = 4$ нс) и самых длинных ($\tau = 200$ нс) лазерных импульсов составили

$6.1\% \pm 2.4\%$ (при $E = 24$ мкДж) и $10.3\% \pm 2.5\%$ (при $E = 235$ мкДж) соответственно. При постоянной энергии лазерного излучения для $E \geq 20$ мкДж наблюдается практически монотонный рост коэффициента пропускания T с увеличением длительности импульса τ (рис.8). Таким образом, минимальные дозы лазерного облучения, которому подвергаются переносимые в геле живые системы, составляют примерно 60 мДж/см².

Мы полагаем, что наблюдаемые большие значения коэффициента пропускания импульсного лазерного излучения донорной пластинкой с пленкой золота объясняются следующими факторами. При нагреве металла до высоких температур (порядка температуры плавления и более) происходит резкое уменьшение коэффициента отражения [25] из-за перехода металл–диэлектрик [28]. В течение импульса пленка золота частично разрушается. Этим объясняется и увеличение коэффициента пропускания при увеличении E , наблюдаемое для $\tau = 4$ нс и двух начальных точек для $\tau = 8$ и 20 нс (рис.8,а). Последующее уменьшение коэффициента пропускания при больших E (рис.8,б) связано с растущим поглощением излучения плазмой [29] (рис.6).

Другим фактором воздействия на клеточные системы при лазерном микросамплинге могут быть микрочастицы и наночастицы золота, перелетевшие с донорной пластинки на акцепторную и оказавшиеся в капле [30]. Для изучения этого вопроса были проведены эксперименты по оценке содержания золота в разных формах в каплях геля на акцепторной пластинке. Было определено, что на акцепторной пластинке в каплях геля, а иногда и вне их, обнаруживаются как микрочастицы (рис.10,б), так и наночастицы золота, которые могут располагаться в капле геля хаотически (рис.10,а) или даже образовывать структуры (рис.10,в). Количество наночастиц и вид их распределения по размерам зависят от энергии и длительности лазерных импульсов. Мы полагаем, что перенос микрочастиц золота обусловлен неоднородностями пленки золота и ее адгезии к поверхности стекла, а наночастицы образуются в результате дробления расплавленной пленки золота, ее взрывного кипения и процесса самосборки из атомов золота. При этом распределение наночастиц по размерам как на донорной так и на акцепторной пластинках (в микрокапле) будет зависеть от толщины пленки, энергии, интенсивности и длительности импульса лазерного излучения, а также от характеристик лазерной плазмы [31]. При $\tau = 8$ нс (импульсы с $\tau = 10$ нс используются для микросамплинга микроорганизмов [14]) процентное (по площади) содержание наночастиц золота в каплях геля практически линейно зависит от E . Если отнести площадь, занимаемую ими, к площади отверстия в пленке золота на донорной пластинке, то можно легко получить следующую зависимость (для 5 мкДж $\leq E \leq 100$ мкДж) для доли (в процентах) золота, перелетевшего из области воздействия: $S_{\text{Au hole}} \approx E - 4$. Таким образом, перелет наночастиц начинается при $E \approx 4$ мкДж, а при $E = 100$ мкДж площадь, занимаемая наночастицами на акцепторной пластинке, практически совпадает с площадью отверстия в пленке золота на донорной пластинке. Если предположить, что размер наночастиц золота примерно равен толщине слоя золота донорной пластики (это соответствует результатам измерений по СЭМ-изображениям (см. рис.4)), то при $E = 100$ мкДж все золото, содержащееся на площади отверстия в пленке золота, осаждается в виде наночастиц на акцепторной пластинке. Отме-

тим, что структуры в виде филаментов (рис. 10, в) могут образовываться из-за колебания струи, внутри которой переносятся частицы золота [32].

Эксперименты по микросамплингу геля с почвенными микрочастицами (носители микроорганизмов [14]) показали, что добавление в гель частиц почвы приводит к значительному (в шесть раз для $\tau = 8$ нс и $E = 10$ мкДж) уменьшению скорости струи и к увеличению ее поперечных размеров (рис. 11). Такие изменения обусловлены увеличением вязкости геля при добавлении частиц почвы. Размеры частиц почвы в микрокапле (рис. 11) составляют 1–30 мкм, здесь есть достаточно большие отдельные частицы, которые могут являться носителями для интересующих нас колоний микроорганизмов.

Проведенные эксперименты показали, что для всего исследуемого диапазона длительностей и энергий лазерных импульсов минимальные значения коэффициента пропускания импульсного лазерного излучения с $\lambda = 1.064$ мкм составляют $\sim 10\%$, т. е. при микросамплинге живые системы получают большую дозу лазерного облучения. Уменьшить эту дозу можно, например, путем увеличения толщины металлической пленки. Однако следует учитывать, что при этом возрастет количество перелетевших на акцепторную пластинку микро- и наночастиц золота, что является нежелательным, поскольку они могут оказывать токсическое воздействие на микроорганизмы и клеточные системы [33].

5. Заключение

В настоящей работе исследованы тепловые и транспортные процессы, возникающие при лазерном переносе (микропечати) гелевых микрокапель под действием импульсов лазерного излучения с длиной волны 1.064 мкм, длительностью в диапазоне 4–200 нс и энергией от 2 мкДж до 1 мДж.

Для рабочих режимов и $\tau = 8$ нс оценена максимальная температура в области лазерного воздействия, которая для $E = 20$ мкДж составляет $\sim 10^4$ К. Показано, что в механизме лазерно-индуцированного переноса важную роль играют процессы взрывного кипения воды (в геле) и золота (материал поглощающего покрытия донорной пластинки).

Установлено, что для всего исследуемого диапазона параметров лазерных импульсов коэффициент пропускания импульсного лазерного излучения с $\lambda = 1.064$ мкм донорной пластинкой зависит от длительности импульса и плотности его энергии и изменяется в диапазоне 10%–60%.

Показано, что имеют место два механизма переноса золота на акцепторную пластинку, связанные: 1) с переносом микрочастиц золота из-за неоднородностей пленки золота и ее адгезии и 2) с переносом атомов и наночастиц золота, возникающих благодаря взрывному кипению золота. Обнаружено, что при длительности лазерного импульса 8 нс и его малых энергиях ($E < 10$ мкДж) доля наночастиц золота, переносимых на акцепторную пластинку, ничтожно мала; с увеличением энергии импульса она линейно растет.

Установлено, что при добавлении в гель частиц почвы основное влияние на процесс формирования струи оказывает увеличение вязкости субстрата, приводящее к уменьшению скорости струи с одновременным увеличением ее поперечных размеров. Проведенные исследования позволяют оптимизировать процессы переноса геле-

вых микрокапель в быстроразвивающихся технологиях лазерной биопечати.

Работа выполнена в рамках гранта Правительства РФ на поддержку научных исследований под руководством ведущих ученых (договор № 14.B25.31.0019).

1. Piqué A., Chrisey D.B., Auyeung R.C.Y., et al. *Appl. Phys. A*, **69** (1), 279 (1999).
2. Mathews S.A., Auyeung R.C.Y., Piqué A. *J. Laser Micro/Nanoeng.*, **2**, 103 (2007).
3. Narazaki A., Sato T., Kurosaki R., Kawaguchi Y., Niino H. *Appl. Phys. Express*, **5**, 057001 (2008).
4. Suzuki K. *Electr. Eng. Jpn.*, **165**, 60 (2008).
5. Unger C., Gruene M., Koch L., Koch J., Chichkov B.N. *Appl. Phys. A*, **103** (2), 271 (2011).
6. Kuznetsov A.I., Unger C., Koch J., Chichkov B.N. *Appl. Phys. A*, **106** (3), 479 (2012).
7. Ma H., Mismar W., Wang Y., Small D.W., Ras M., Allbritton N.L., Sims C.E., Venugopalan V. *J. R. Soc. Interface.*, **9**, 1156 (2011).
8. Chatzipetrou M., Tsekenis G., Tsouti V., Chatzandroulis S., Zergioti I. *Appl. Surf. Sci.*, **278**, 250 (2013).
9. Koch L., Kuhn S., Sorg H., et al. *Tissue Eng. Part C: Methods*, **16** (5), 847 (2009).
10. Nguyen A.K., Narayan R.J. *Ann. Biomed. Eng.*, **45** (1), 84 (2017).
11. Ovsianikov A., Gruene M., Pflaum M., Koch L., Maiorana F., Wilhelmi M., Haverich A., Chichkov B. *Biofabricat.*, **2** (1), 014104 (2010).
12. Serra P., Colina M., Fernández-Pradas J.M., Sevilla L., Morenza J.L. *Appl. Phys. Lett.*, **85** (9), 1639 (2004).
13. Deng Y., Renaud P., Guo Z., Huang Z., Chen Y. *J. Biol. Eng.*, **11** (1), 2 (2017).
14. Ringeisen B.R., Rincon K., Fitzgerald L.A., Fulmer P.A., Wu P.K. *Meth. Ecol. Evolut.*, **6** (2), 209 (2015).
15. Khmelnitsky R.A., Evlashin S.A., Martovitsky V.P., et al. *Cryst. Growth Des.*, **16** (3), 1420 (2016).
16. Zharov V.P., Letokhov V.S. *Laser Optoacoustic Spectroscopy* (Berlin: Springer, 1986).
17. Чудновский В.М., Юсупов В.И., Дыдыкин А.В., Невожай В.И., Кисилёв А.Ю., Жуков С.А., Баграташвили В.Н. *Квантовая электроника*, **47** (4), 361 (2017) [*Quantum Electron.*, **47** (4), 361 (2017)].
18. Kim D., Ye M., Grigoropoulos C.P. *Appl. Phys. A*, **67** (2), 169 (1998).
19. Park H.K., Kim D., Grigoropoulos C.P., Tam A.C. *J. App. Phys.*, **80** (7), 4072 (1996).
20. Hohlfield J., Wellershoff S.S., Güdde J., Conrad U., Jähne V., Matthias E. *Chem. Phys.*, **251** (1), 237 (2000).
21. Duocastella M., Fernández-Pradas J.M., Morenza J.L., Serra P. *J. Appl. Phys.*, **106** (8), 084907 (2009).
22. Мажукин В.И., Самохин А.А., Дёмин, М.М., Шапранов, А.В. *Квантовая электроника*, **44** (4), 283 (2014) [*Quantum Electron.*, **44** (4), 283 (2014)].
23. Yusupov V.I., Tsykina S.I., Bagratashvili V.N. *Laser Phys. Lett.*, **11** (11), 116001 (2014).
24. Kovalenko S.A., Fedorovych R.D. *Semicond. Phys. Quantum Electron. Optoelectron.*, **3** (3), 383 (2000).
25. Benavides O., de la Cruz May L., Mejia E.B., Hernandez J.R., Gil A.F. *Laser Phys.*, **26** (12), 126101 (2016).
26. Miotello A., Kelly R. *Appl. Phys. Lett.*, **67**, 3535 (1995).
27. Цветков М.Ю., Минаев Н.В., Акованцева А.А., Пудовкина Г.И., Тимашев П.С., Цыпина С.И., Юсупов В.И., Муслимов А.Э., Бутахин А.В., Каневский В.М., Баграташвили В.Н. *Сверхкритические флюиды: теория и практика*, **12** (2), 68 (2017).
28. Быковский Н.Е., Першин С.М., Самохин А.А., Сенатский Ю.В. *Квантовая электроника*, **46** (2), 128 (2016) [*Quantum Electron.*, **46** (2), 128 (2016)].
29. Булгаков А.В., Булгакова Н.М. *Квантовая электроника*, **27** (2), 154 (1999) [*Quantum Electron.*, **29** (5), 433 (1999)].
30. Shamaila S., Zafar N., Riaz S., Sharif R., Nazir J., Naseem S. *Nanomater.*, **6** (4), 71 (2016).
31. Серков А.А., Кузьмин П.Г., Раков И.И., Шафеев Г.А. *Квантовая электроника*, **46** (8), 713 (2016) [*Quantum Electron.*, **46** (8), 713 (2016)].
32. Brown M.S., Kattamis N.T., Arnold C.B. *Microfluid. Nanofluid.*, **11** (2), 199 (2011).
33. Shamaila S., Zafar N., Riaz S., Sharif R., Nazir J., Naseem S. *Nanomater.*, **6** (4), 71 (2016).