

УДК 534:535

Д.В. Орда-Жигулина<sup>1</sup>, М.В. Орда-Жигулина<sup>1</sup>, И.Б. Старченко<sup>2</sup>,  
Д.А. Кравчук<sup>3</sup>

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ УСТАНОВКА ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ ОПТОАКУСТИЧЕСКОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

<sup>1</sup>Южный научный центр Российской академии наук,

<sup>2</sup>ООО «Параметрика»,

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО «Южный федеральный университет»

*В современных биомедицинских исследованиях наблюдается тенденция к применению все большего количества неинвазивных технологий, из чего следует, что новые способы диагностики, в частности, базирующиеся на оптоакустическом эффекте, являются актуальными задачами для исследований. В данной статье приведено описание экспериментальной установки для исследования спектра акустического сигнала в неподвижной и движущейся модельной жидкости в присутствии наноразмерных объектов в качестве контрастных агентов при оптоакустическом преобразовании. Оптоакустические медицинские исследования представляют собой гибридные способы диагностики состояния объектов исследования с помощью ультразвуковых и лазерных методов, в которых по восстановлению распределения источников акустического сигнала в исследуемом объекте, то есть по форме временной реализации сигнала, можно делать выводы об объектах исследования. Объектами исследования при оптоакустических методах являются ткани и вещества, которые способны поглощать и отражать световые волны, в том числе биологические жидкости и ткани, к которым, например, относится кровь. В статье приведено подробное описание экспериментальной установки. В результате проведенного эксперимента была получена спектральная характеристика акустического сигнала для неподвижной и движущейся жидкости, обсуждены результаты и сделаны выводы про влияние скорости потока на суммарное акустическое поле, возникающее в результате оптоакустического преобразования. Разработанная экспериментальная установка и полученные результаты могут использоваться для проверки теоретических расчетов при разработке технологии оптоакустической проточной цитометрии.*

**Ключевые слова:** оптоакустический эффект, проточная цитометрия, акустический сигнал, углеродные нанотрубки, лазерное возбуждение звука, экспериментальные исследования.

### **Введение**

В современных медицинских технологиях отдается все больше предпочтения неинвазивным анализам, которые реализованы на базе безопасных для человеческого организма физических эффектах. Одним из таких физических принципов является оптоакустический (далее – ОА) эффект, который с начала 20 века нашел свое практическое применение в акустике. Перспективным и безопасным направлением медицинской диагностики считается метод ОА визуализации, одним из частных случаев

которого является ОА проточная цитометрия, в основе которой лежит анализ крови с помощью ОА преобразования.

В настоящее время широко исследуется оптоакустическое возбуждение звука и его использование в проточной цитометрии с применением наноразмерных объектов в качестве контрастных агентов [1-3]. Согласно опубликованным в литературе данным для него ведутся только лабораторные исследования [4-6] и поэтому актуальной становится задача разработки экспериментальных стендов для проведения измерений, чтобы определить качественный характер взаимодействия ОА сигнала с наноразмерными объектами. Одним из значимых недостатков опубликованных трудов является то, что авторами проводятся экспериментальные исследования без сопоставления полученных результатов с теоретическими расчетами и, как правило, не учитывается скорость кровотока.

### Материалы и методы

На Рисунке 1 приведена структурная схема измерения временной реализации амплитуды и спектра объемных акустических волн, которые возникают в результате ОА преобразования в модельной жидкости. При этом скорость движения жидкости постоянна, а в самой модельной жидкости присутствуют наноразмерные объекты (углеродные нанотрубки).

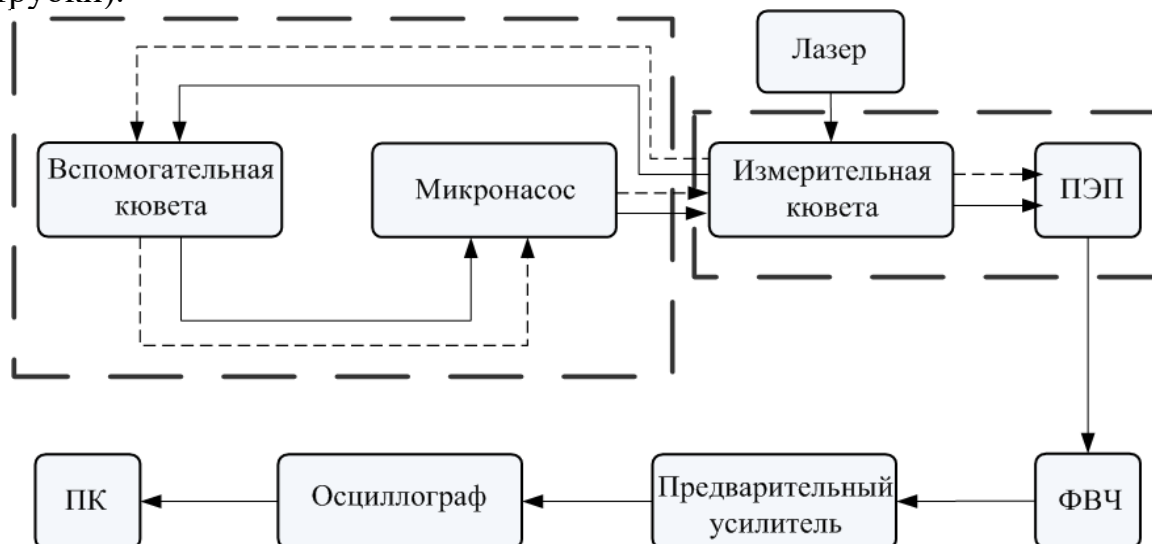


Рисунок 1 - Структурная схема экспериментальной установки

Скорость движения жидкости определяется скоростью прокачки воды в насосе. В эксперименте используется насос фирмы «KIMHOMET». Такой насос обеспечивает объемную скорость жидкости 4 литр/час, что соответствует объемной скорости кровотока в человеческом организме [7]. При переводе в линейную скорость это

составляет 2,89 см/сек для трубки диаметром 7 мм, что соответствует размеру артериолы в человеческом организме и скорости кровотока в ней.

Оптический сигнал падает на поверхность движущейся модельной жидкости, находящейся в измерительной кювете. В результате ОА преобразования в модельной жидкости образуются объемные акустические волны, которые взаимодействуют с конгломератом наноразмерных агентов и потоком жидкости. Такое взаимодействие изменяет амплитуду и форму профиля результирующего ОА сигнала.

Результирующий сигнал принимается пьезокерамическим преобразователем. Далее сигнал подается на фильтр верхних частот, который выделяет полосу полезного сигнала и подавляет низкочастотные шумы лазерной установки. Цифровой осциллограф используется для записи экспериментальных данных в файл формата «.txt». Осциллограф подключен к персональному компьютеру (ПК), где установлено специальное разработанное в среде MathCAD (Matlab) программное обеспечение (ПО) для обработки полученных данных.

Импульсы длительностью 84 нс и периодом следования 10 кГц формируются одномодовым твердотельным NdYAg лазером с регулируемым уровнем мощности от 0,1 до 100 Вт, который является частью измерительной установки LIMO 100-532/1064-U [8]. Измерения проводились для подвижной и неподвижной модельной жидкости в присутствии наноразмерных объектов в качестве контрастных агентов.

При моделировании крови в кровеносных сосудах предполагалось, что кровь является вязкой несжимаемой жидкостью. Кровь – это неньютоновская жидкость, которая представляет собой взвесь форменных элементов в коллоидно-солевом растворе, то есть кровь – это суспензия, состоящая из вязкой несжимаемой жидкости (плазмы) и неоднородных включений (эритроцитов) [9]. Принимается, что наноразмерные объекты распределены в суспензии равномерно. Данная модель крови является грубой, но позволяет качественно оценить характер влияния потока жидкости с наноразмерными объектами на результирующий акустический сигнал.

Для эталонных измерений (чтобы определить уровень шума, вносимого оборудованием и кюветой) в качестве модельной жидкости в кювету заливалась дистиллированная вода. Остальные измерения проводились для раствора глицерина, движущегося с постоянной скоростью.

На Рисунках 2а и 2б представлены амплитудные характеристики приемника для неподвижной и движущейся жидкости.

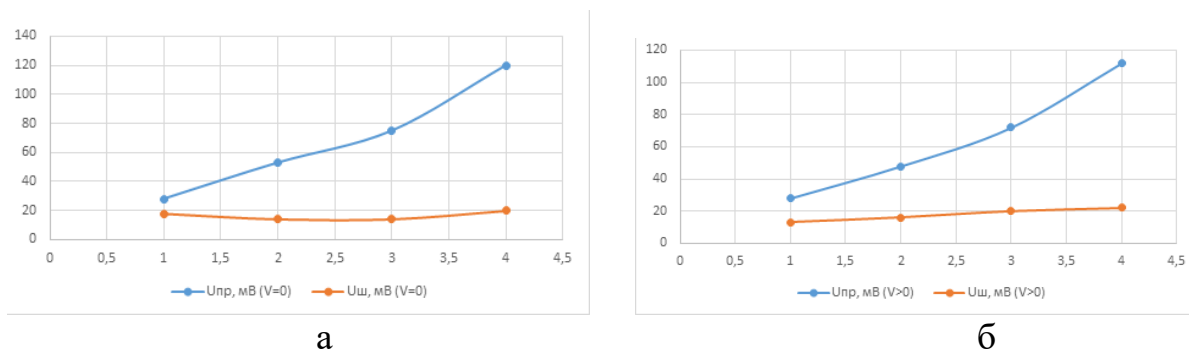


Рисунок 2 – а) АЧХ для неподвижной жидкости, где красная кривая – уровень шума при выключенном лазере, синяя кривая – уровень принятого сигнала при ОА преобразовании;  
б) АЧХ для движущейся жидкости, где красная кривая – уровень шума при выключенном лазере, синяя кривая – уровень принятого сигнала при ОА преобразовании

Показанные на Рисунках зависимости подтверждают, что уровень ОА сигнала превышает уровень шумов. Эти данные вычитаются из всех последующих результатов измерений для компенсации уровня шума.

Наноразмерные объекты представляют собой углеродные наночастицы конфигурации трубок. Наноматериал был предоставлен сотрудниками кафедры нанотехнологий и микросистемной техники (НТ МСТ) ИНЭП Южного федерального университета. Количество наночастиц составляет приблизительно 0,5 г на 200 мл модельной жидкости, которая заливается в кювету. Перед началом каждого измерения раствор смешивается в течение 30 минут в ультразвуковой ванне.

В экспериментальных исследованиях применяется ультразвуковая ванна «УХ2000F», производство КНР. УЗ датчик, установленный на дне контейнера, подключен к ультразвуковому генератору, а с помощью дисплея регулируется мощность (35 Вт или 50 Вт). Рабочая частота 42 КГц, объем жидкости 600 мл.

В пластмассовый контейнер наливается раствор глицерина, добавляются углеродные нанотрубки и этот контейнер погружается в УЗ ванну. Доливается вода до отметки «максимум», чтобы жидкость в контейнере была ниже уровня жидкости в УЗ ванне. После этого выбирается режим «35 Вт» и в течении 30 минут происходит перемешивание. Согласно данным из патента №200720052659.7 на описанную УЗ ванну, она может использоваться для очистки, удаления мелких деталей и даже стерилизации. Поэтому, можно сделать вывод, что происходит тщательное перемешивание и обеспечивается равномерность раствора.

Акустический сигнал, возникающий в результате ОА преобразования и взаимодействия первичных акустических волн с конгломератом наноразмерных агентов, а также с учетом скорости движения модельной жидкости, регистрируется пьезокерамическим преобразователем. Пьезокерамический преобразователь фиксируется на стенке кюветы. Внешний вид измерительной кюветы показан на Рисунке 3.



Рисунок 3 – Внешний вид измерительной кюветы

Измерительная кювета изготовлена из органического стекла и заполнена дистиллированной водой. В ней находится стеклянная трубка диаметром 7 мм, через которую насос прокачивает модельную жидкость со скоростью 2,89 см/с ( $1,1 \text{ см}^3/\text{с}$ ). Верхняя граница трубки установлена так, что находится в одной плоскости с поверхностью воды в измерительной кювете. Стеклянная трубка является моделью сосуда средней величины. Стеклянную трубку нельзя считать достаточно точной моделью кровеносного сосуда, так как у нее однородная структура и она не обладает эластичностью. Однако, для качественной оценки ОА преобразования в движущейся жидкости с наноразмерными объектами применение такой модели обосновано, так как стекло является оптически прозрачным. Трубка устанавливается таким образом, что уровень модельной жидкости совпадает с уровнем воды в измерительной кювете. Трубка соединяется шлангами со вспомогательной кюветой, в которой находится насос проходного типа, прокачивающий модельную жидкость по замкнутому контуру с определенной скоростью, как показано на Рисунке 4.

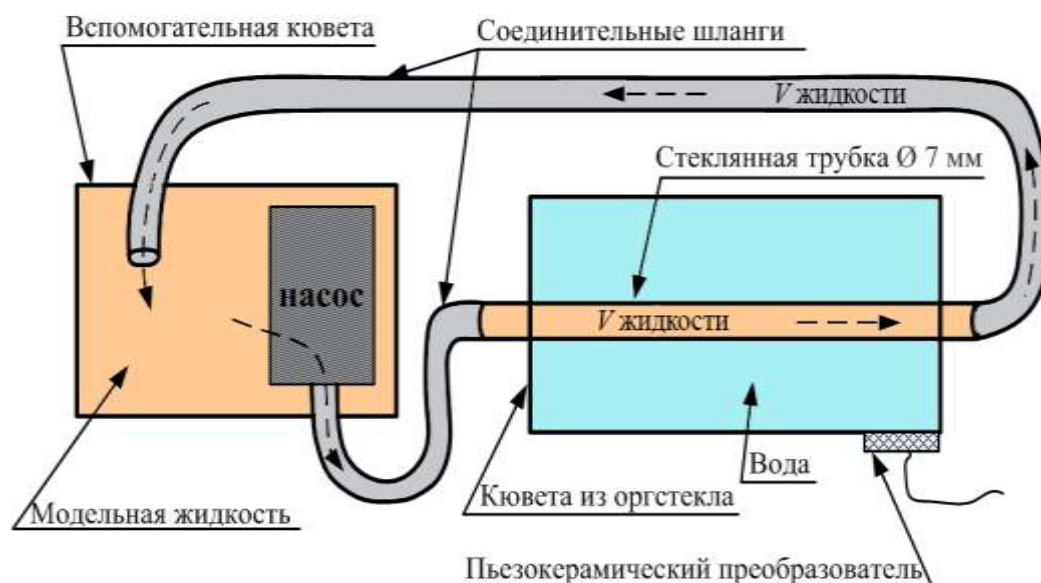


Рисунок 4 – Часть экспериментальной установки, которая моделирует систему кровотока

К стенке измерительной кюветы прикрепляется пьезокерамический преобразователь. Место закрепления преобразователя определяется в процессе настройки экспериментальной установки таким образом, чтобы уровень регистрируемого сигнала был максимальным. Расстояние от оси лазерного луча до центра пьезоэлектрического преобразователя составляет 4 см.

Пьезоэлектрические преобразователи выполнены на основе пьезокерамических материалов ЦТС-19 и PZT-5. Такие преобразователи, после соответствующей обработки, позволяют принимать и обрабатывать акустические сигналы с длительностями порядка 80-100 нс [10-13].

Конструкция измерительного датчика представляет собой чувствительный пьезоэлектрический элемент, внешний электрод которого изолирован тонким слоем водонепроницаемого покрытия (покрыт лаком). Преобразователь крепится на торцевой стенке измерительной кюветы через слой «Медиагеля для УЗИ» средней вязкости.

Уровень сигнала регистрируется с помощью программного обеспечения цифрового осциллографа DSO-2100 (полоса пропускания – до 1 ГГц, максимальная частота дискретизации в реальном времени – 2 ГГц). Осциллограф DSO-2100 подключается к ПК через параллельный порт (LPT), работающий в режиме ECP.

### Результаты

В результате проведенного эксперимента была получена спектральная характеристика акустического сигнала, возникающего в

результате ОА преобразования в неподвижном и движущемся глицерине в присутствии наноразмерных объектов в качестве контрастных агентов.

Как показал эксперимент, при скорости модельной жидкости 2,89 см/с наблюдается изменение спектра акустического сигнала, который возникает в результате ОА преобразования в модельной жидкости в присутствии наноразмерных агентов. Данные приведены на Рисунках 5 и 6.

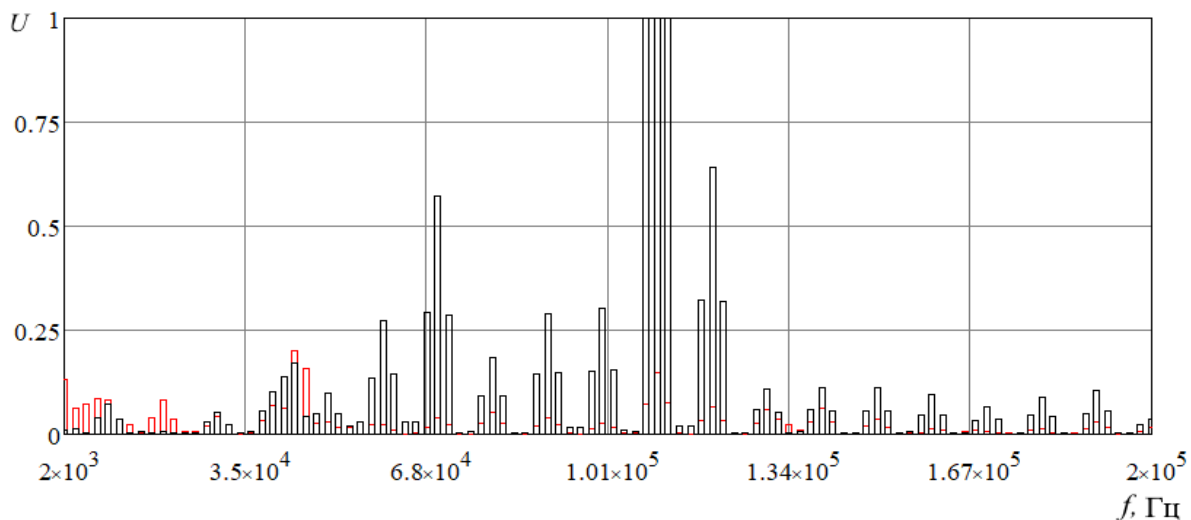


Рисунок 5 – Сопоставление экспериментально измеренного нормированного спектра объемных акустических волн в неподвижном (черная линия) и подвижном (красная линия) глицерине с наноразмерными агентами (углеродными нанотрубками) на участке 2КГц-0,2 МГц

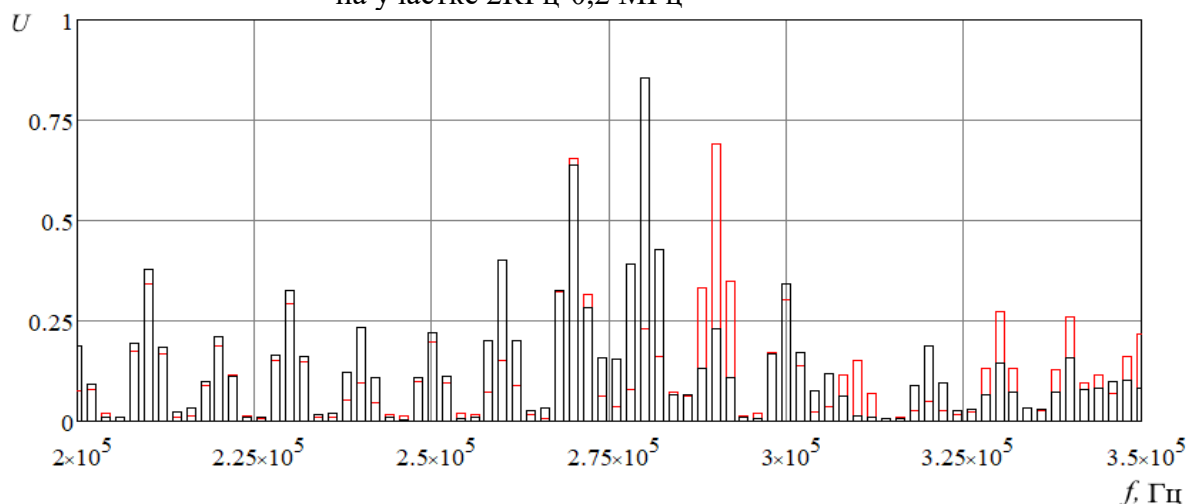


Рисунок 6 – Сопоставление экспериментально измеренного нормированного спектра объемных акустических волн в неподвижном (черная линия) и подвижном (красная линия) глицерине с наноразмерными агентами (углеродными нанотрубками) на участке 0,2 МГц-3,5 МГц

### Обсуждение

Для неподвижной модельной жидкости в спектре сигнала наблюдаются максимумы на частотах 0,1 МГц с амплитудой 25 мВ,

0,25 МГц с амплитудой 0,125 мВ, 1,15 МГц с амплитудой 2,5 мВ, 1,25 МГц с амплитудой 0,125 мВ. В остальном диапазоне частот от 0,1 до 20 МГц уровень спектральных составляющих сигнала не превышает 0,1 мВ.

Для движущейся модельной жидкости в спектре сигнала отсутствует максимум на частоте 0,1 МГц с амплитудой 2 мВ, что на порядок меньше, чем в неподвижной модельной жидкости. То есть, произошло перераспределение амплитуд спектральных составляющих в диапазоне 0,25-0,5 МГц и 2,5 МГц: так максимум с частоты 2,5 МГц с амплитудой 0,125 мВ сместился на 2,8 МГц с той же амплитудой.

### **Заключение**

При увеличении скорости движения модельной жидкости в присутствии наночастиц уже до 2 см/с наблюдается заметное изменение спектральной характеристики измеренного акустического сигнала. Так, в неподвижной модельной жидкости в спектре сигнала наблюдается локальный максимум на частоте 0,1 МГц с амплитудой 25 мВ, который в движущейся модельной жидкости снижается в 10 раз.

При скорости движения модельной жидкости 2,89 см/с наблюдается перераспределение амплитуд спектральных составляющих в диапазоне 0,25-0,5 МГц, и возникают новые составляющие спектра в районе 2,5 МГц. В частности, максимум с частоты 2,5 МГц с амплитудой 0,125 мВ смещается на 2,8 МГц с той же амплитудой.

Разработанная экспериментальная установка и полученные результаты могут использоваться для качественной оценки ОА преобразования в движущейся жидкости с наноразмерными объектами при разработке технологии ОА проточной цитометрии.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Galanzha E., Sarimollaoglu M., Nedosekin D.A., Keyrouz S.G., Mehta J.L., Zharov V.P. In vivo flow cytometry of circulating clots using negative photothermal and photoacoustic contrasts. // *Journal of cytometry*, Volume 79(10), 2011.
2. Dmitry A. Nedosekin, Jacqueline Nolan, Alexandru S. Biris, Vladimir P. Zharov. Photoacoustic bio-quantification of graphene based nanomaterials at a single cell level (Conference Presentation). / *Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing*, Volume 10064, 2017.
3. Quanyu Zhou, Ping Yang, Qiyang Wang, Kai Pang, Hui Zhou, Hao He, Xunbin Wei. Label-free counting of circulating cells by in vivo photoacoustic flow cytometry. // *Biophotonics and Immune Responses XIII*, Volume 10495, 2018.



4. Kiran Bhattacharyya, Benjamin S. Goldschmidt, John A. Viator, Detection and capture of breast cancer cells with photoacoustic flow cytometry. // Journal of Biomedical Optics, Volume 21(8), 2016.
5. Г.Ю. Джуплина, В.А. Закарян, Г.В. Калашников, А.В. Саенко, И.Б. Старченко. Экспериментальные исследования оптоакустического эффекта в модельных суспензиях нанотрубок и нановолокон с использованием инфракрасного лазера. // ИЗВЕСТИЯ ЮФУ. ТЕХНИЧЕСКИЕ НАУКИ. №9(22). 2011. С.180-186.
6. Кравчук Д.А., Орда-Жигулина Д.В., Слива Г.Ю. Экспериментальные исследования оптоакустического эффекта в движущейся жидкости. // Известия ЮФУ. Технические науки. 2017. № 4 (189). С. 246-254.
7. С.А. Регирер. Гидродинамика кровообращения. Москва: Мир, 1971. – 270 с.
8. Старченко И.Б., Малюков С.П., Орда-Жигулина Д.В., Саенко А.В. Измерительный комплекс для лазерной диагностики биообъектов с использованием наночастиц на базе ЛМО 100. // Прикаспийский журнал: управление и высокие технологии. 2013. № 2 (22). С. 166-173.
9. А.Е. Медведев. Двухфазная модель течения крови. // Российский журнал биомеханики. Том 17. №4(22). С.22-36.
10. Д.А. Кравчук, И.Б. Старченко. Математическое моделирование оптикоакустического сигнала от эритроцитов. // Вестник новых медицинских технологий. № 1. 2018. С. 96-101.
11. Кравчук Д.А., Орда-Жигулина Д.В., Слива Г.Ю. Экспериментальные исследования оптоакустического эффекта в движущейся жидкости. // Известия ЮФУ. Технические науки. 2017. №4 (189). С. 246-254.
12. Кравчук Д.А., Старченко И.Б. Моделирование процесса насыщения кислородом биологических тканей с помощью оптоакустического метода // Научное приборостроение. – 2018. – Т. 28, № 2. – С. 20-25.
13. Старченко И.Б., Кравчук Д.А., Кириченко И.А. Прототип оптоакустического лазерного цитометра // Медицинская техника. – 2017. – № 5. – С. 4-7.

D.V. Orda-Zhigulina<sup>1</sup>, M.V. Orda-Zhigulina<sup>1</sup>, I.B. Starchenko<sup>2</sup>,  
D.A. Kravchuk<sup>3</sup>

**EXPERIMENTAL STUDIES OF MOVING MODEL LIQUID FOR  
OPTOACOUSTIC FLOW CYTOMETRY**

<sup>1</sup> "Southern Scientific Center of Russian Academy of Sciences (SSC RAS)

<sup>2</sup> OOO Parametika

<sup>3</sup> Southern Federal University

*In modern biomedical research we can see the tendency using more and more non-invasive technologies using new diagnostic method based on the safe for human physical effects, for example, optoacoustic effect. In this paper described the experimental set for studying the spectrum of acoustic signal in a stationary and moving model liquid using nanosized objects as contrast agents while optoacoustic transformation. Optoacoustic medical methods are hybrid technique of diagnostics using ultrasonic and laser methods in the same time for study biological objects by draw conclusions about investigated objects the objects through the form of the temporal realization of the signal. Investigated objects in optoacoustic methods are tissues and substances that are capable of absorbing and reflecting light waves including biological fluids and tissues, for example, blood refers. In this paper gived a detailed description of the experimental set. As a result of the experiment the spectral characteristics of the acoustic signal for a stationary and moving liquid were obtained. The results were discussed and conclusions were made about the influence of the flow velocity on the total acoustic field resulting from the optoacoustic transformation. The experimental set and the results obtained can be useful to check theoretical calculations for development of optoacoustic flow cytometry technology.*

**Keywords:** optoacoustic effect, flow cytometry, acoustic signal, carbon nanotubes, laser sound excitation, experimental studies.

## REFERENCES

1. Galanzha E., Sarimollaoglu M., Nedosekin D.A., Keyrouz S.G., Mehta J.L., Zharov V.P. In vivo flow cytometry of circulating clots using negative photothermal and photoacoustic contrasts. // Journal of cytometry, Volume 79(10), 2011.
2. Dmitry A. Nedosekin, Jacqueline Nolan, Alexandru S. Biris, Vladimir P. Zharov. Photoacoustic bio-quantification of graphene based nanomaterials at a single cell level (Conference Presentation). / Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing, Volume 10064, 2017.
3. Quanyu Zhou, Ping Yang, Qiyan Wang, Kai Pang, Hui Zhou, Hao He, Xunbin Wei. Label-free counting of circulating cells by in vivo photoacoustic flow cytometry. // Biophotonics and Immune Responses XIII, Volume 10495, 2018.
4. Kiran Bhattacharyya, Benjamin S. Goldschmidt, John A. Viator, Detection and capture of breast cancer cells with photoacoustic flow cytometry. // Journal of Biomedical Optics, Volume 21(8), 2016.
5. G.Ju. Dzhuplina, V.A. Zakarjan, G.V. Kalashnikov, A.V. Saenko, I.B. Starchenko. Jeksperimental'nye issledovanija optoakusticheskogo jeffekta v model'nyh suspenzijah nanotrubok i nanovolokon s ispol'zovaniem infrakrasnogo lazera. // IZVESTIJa JuFU. TEHNICHESKIE NAUKI. No.9(22). 2011. pp.180-186.

6. Kravchuk D.A., Orda-Zhigulina D.V., Sliva G.Ju. Jeksperimental'nye issledovanija optoakusticheskogo jeffekta v dvizhushhejsja zhidkosti. // Izvestija JuFU. Tehnicheskie nauki. 2017. No. 4 (189). pp.246-254.
7. S.A. Regirer. Hidrodinamika krovoobrashhenija. Moskva: Mir, 1971. – 270 s.
8. Starchenko I.B., Maljukov S.P., Orda-Zhigulina D.V., Saenko A.V. Izmeritel'nyj kompleks dlja lazernoj diagnostiki bioob#ektov s ispol'zovaniem nanochastic na baze LIMO 100. // Prikaspijskij zhurnal: upravlenie i vysokie tehnologii. 2013. No. 2 (22). pp.166-173.
9. A.E. Medvedev. Dvuhfaznaja model' techenija krovi. // Rossijskij zhurnal biomehaniki. Vol. 17. No.4(22). S.22-36.
- 10.D.A. Kravchuk, I.B. Starchenko. Matematicheskoe modelirovanie optikoakusticheskogo signala ot jeritroцитов. // Vestnik novyh medicinskih tehnologij. No. 1. 2018. PP.96-101.
- 11.Kravchuk D.A., Orda-Zhigulina D.V., Sliva G.Ju. Jeksperimental'nye issledovanija optoakusticheskogo jeffekta v dvizhushhejsja zhidkosti. // Izvestija JuFU. Tehnicheskie nauki. 2017. No.4 (189). pp.246-254.
- 12.Kravchuk D.A, Starchenko I.B. Modelirovanie processa nasyshhenija kislorodom biologicheskikh tkanej s pomoshh'ju optoakusticheskogo metoda // Nauchnoe priborostroenie. – 2018. – T. 28, № 2. – S. 20-25.
- 13.Starchenko I.B., Kravchuk D.A., Kirichenko I.A. Prototip optoakusticheskogo lazernogo citometra // Medicinskaja tehnika. – 2017. – № 5. – С. 4-7.