



**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В.ЛОМОНОСОВА»**

ФИЗИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

Кафедра общей ядерной физики

Подготовка эксперимента для исследования воздействия ударной волны на живую клетку с помощью микрокапилляра

Дипломная работа
студентка 613 группы
Журухиной А.В.

Допущена к защите «__» _____ 2014 г.

Зав. кафедрой общей ядерной физики

д. ф.-м. н., проф. Ишханов Б. С.

Научный руководитель

д. ф.-м. н., в.н.с. Похил Г.П.

Москва, 2014 г.

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА I. ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ КАПИЛЛЯРЫ	4
1.1. Эффект гайдинга	4
1.2. Планируемое исследование с помощью конического капилляра	11
ГЛАВА II. СОЗДАНИЕ КОНИЧЕСКОГО КАПИЛЛЯРА	13
2.1. Изготовление микропипеток	13
2.2. Технология изготовления выходного окна	16
УСТАНОВКА	20
ЖИВАЯ КУЛЬТУРА	22
ЭКСПЕРИМЕНТ	24
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	25
БЛАГОДАРНОСТИ	25
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	26

ВВЕДЕНИЕ

Скользящее взаимодействие пучка ионов с поверхностью диэлектрика в последние годы очень активно изучается. Такое взаимодействие обладает удивительным свойством самоорганизации поверхностного заряда. Дело в том, что при накоплении плотности заряда, достаточной для отклонения ионов от поверхности изолятора, прекращается ее дальнейшая зарядка (рис.1). Заряд, стекающий с поверхности, компенсируется новыми ионами, сталкивающимися с поверхностью изолятора. Часть пучка ионов поддерживает заряд стенки, а другая часть пучка проходит без соприкосновения с диэлектриком (рис. 2). Таким образом, практически все частицы, которые проходят через капилляр не испытывают потерь энергии и перезарядки. В последние годы проведен ряд экспериментов, которые подтвердили возможность транспортировки пучков ускоренных заряженных частиц с помощью диэлектрических каналов без потери энергии и без изменения начального зарядового состояния. Перспектива использования таких диэлектрических каналов представляет большой практический интерес, с точки зрения управления пучками, т.к. не требует громоздких, потребляющих энергию магнитных или электростатических систем ионной оптики.

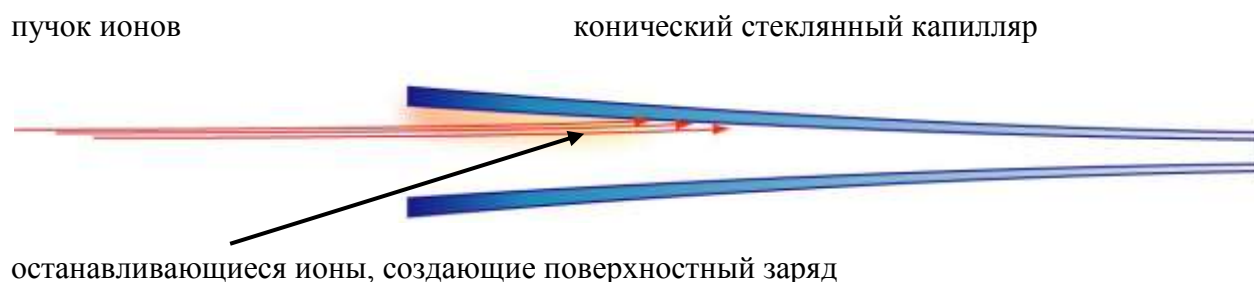


Рис. 1. Иллюстрация зарядки стенок капилляра.

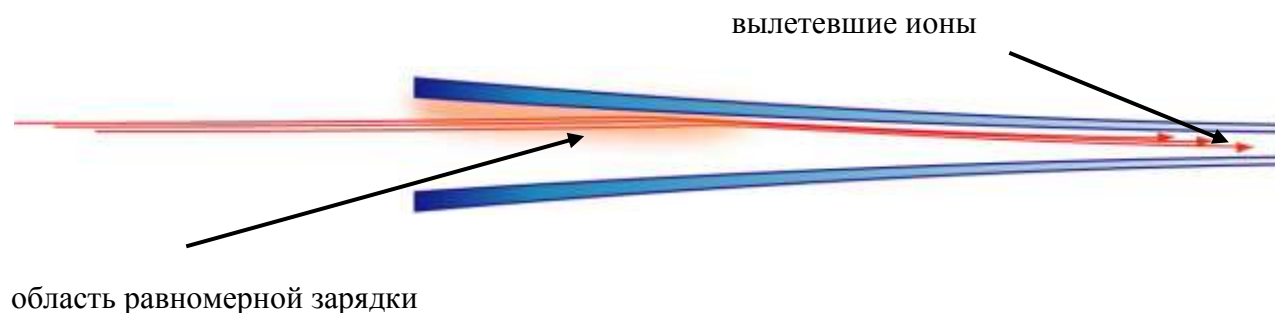


Рис. 2. Прохождение ионов без соприкосновения со стенкой.

Дипломная работа посвящена подготовке и попытке провести первые эксперименты по исследованию радиационного воздействия протонов на живую клетку с помощью конического диэлектрического микрокапилляра.

ГЛАВА I. ДИЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ КАПИЛЛЯРЫ

1.1. Эффект гайдинга

В 80-х годах была экспериментально продемонстрирована и исследована транспортировка и фокусировка импульсных сильноточных электронных пучков (энергия пучка до 800 кэВ, ток – до 80 кА) в вакуумных каналах с диэлектрическими стенками [1,2]. В вакуумном канале с металлическими стенками в отсутствие внешних фокусирующих полей пучок быстро расширяется и уходит на стенки. Однако в вакуумной камере в канале с диэлектрическими стенками пучок может сам создать условия для своего прохождения без контакта со стенками. Авторы работ [1,2] объяснили это явления так. На входе в канал головная часть электронного сгустка рассыпается под действием кулоновских сил пространственного заряда, и электроны пучка заряжают стенки канала до напряжения пробоя. В результате пробоя вблизи стенок образуется слой плазмы. Поле пространственного заряда основной части сгустка электронов вытягивает из плазмы ионы, которые, ускорившись, по инерции проникают в центр сгустка и компенсируют силы расталкивания электронов. Таким образом, фронтальная часть каждого сгустка электронного пучка на всех участках канала обеспечивает условия беспрепятственного прохождения остальной части электронов.

Перенос положительных ионов через диэлектрический канал без соударения со стенками впервые наблюдался в 2002 году [3]. В работе исследовалось прохождение пучков многозарядных ионов Ne^{7+} через диэлектрические нанокapилляры с большим, порядка 100, аспектным отношением (отношение длины капилляра к его внутреннему диаметру) в пленке PET (polyethylene terephthalate). Капилляры создавались по методике получения ядерных фильтров. Пленка PET толщиной 10 мкм облучалась быстрыми ионами ксенона (несколько сотен МэВ), затем треки ионов химически травились в щелочи NaOH. В результате образовывались прямые капилляры диаметром 100 нм и длиной 10 мкм. Чтобы избежать зарядки фронтальной и задней поверхностей пленки при работе с пучком ионов и обеспечить стекание заряда, на обе поверхности напылялся слой золота толщиной около 30 нм.

Пучок ионов Ne^{7+} с энергией 3 кэВ и током 1.3 нА пропусклся через пленку под углом 0° к оси каналов, и на выходе исследовалось зарядовое состояние прошедших через капилляры ионов. Оказалось, что большая часть ионов сохраняет свое начальное зарядовое состояние, как если бы ионы не испытывали соударений со стенками. (Это удивительно, т. к. многозарядные ионы при движении в канале должны перезарядаться

благодаря захвату электронов с внутренних стенок канала). Первые несколько минут после включения пучка выход Ne^{7+} был незначительным, но с течением времени он увеличивался и примерно через 3 мин. достигал насыщения (рис. 3).

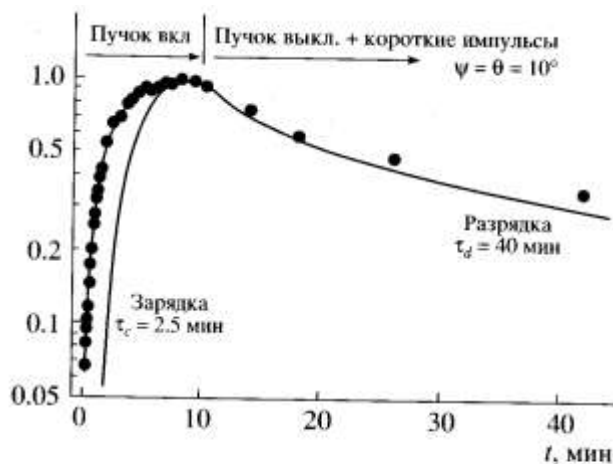


Рис. 3. Зависимость тока прошедших ионов Ne^{7+} [3], не испытывавших перезарядку, от времени.

Была исследована зависимость прошедшего тока от угла падения пучка. Ось капилляра наклоняли относительно оси пучка, и обнаружилось, что ток прошедших ионов слабо меняется в пределах от -5 до $+5$ градусов. Захват ионов в капилляр наблюдался даже при отклонении оси на 25° , причем пик выхода прошедших ионов также отклонялся на 25° , т. е. капилляры оказывают направляющее действие на пучок (рис. 4). Этот эффект был назван *guiding*-эффектом или эффектом управления пучком с помощью диэлектрического капилляра. Позже подобные результаты были неоднократно воспроизведены и исследовались для PET пленок [4-11] и при работе с капиллярами в изоляторах SiO_2 [11,12] и Al_2O_3 [13]. В большинстве экспериментов использовались пучки многозарядных ионов Ne^{7+} с энергиями от 1 до 10 кэВ. Наряду с неоном в ряде работ исследовалась транспортировка ионов молекулярного водорода H_2^+ и H_3^+ с энергией 1 кэВ через PET пленки [9], транспортировка протонов с энергией 240 кэВ через стеклянные (боросиликатные) трубки длиной до 25 см и диаметром 0.2 мм [14]. Во всех экспериментах наблюдается *guiding*-эффект.

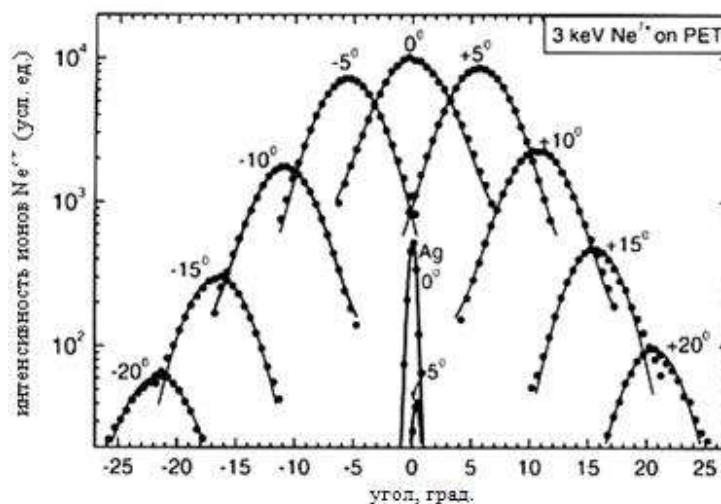


Рис. 4. Угловое распределение ионов Ne^{7+} , прошедших через капилляры в РЕТ [3] (узкий пик в центре соответствует угловому распределению ионов, прошедших через капилляр, внутренняя поверхность которого была покрыта серебром).

Объяснить этот эффект так же как эксперименты с электронным сгустком образованием плазмы нельзя, т.к. объемный заряд пренебрежимо мал из-за малой плотности пучка. По мнению авторов [3-13,15], guiding-эффект является следствием самоорганизации системы пучок-капилляр за счет того, что ионы определенным образом заряжают стенки каналов. Столтерфохт [3] предложил выделять в канале две заряженные области: область рассеяния (scattering) и область транспортировки (guiding) (рис. 5).

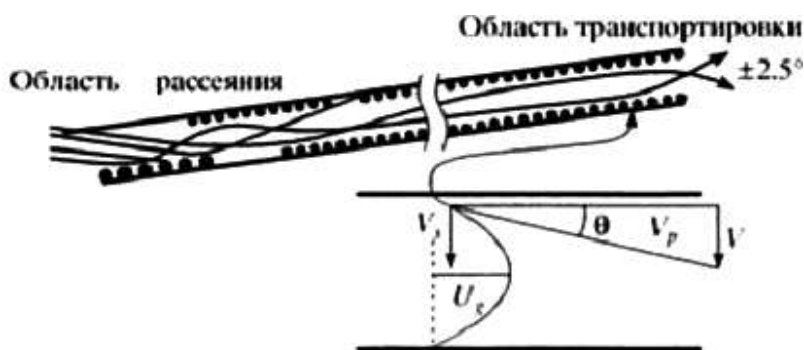


Рис. 5. Схема движения ионов в капилляре [3].

Предположение о наличии области транспортировки объясняется тем, что при любом повороте капилляров относительно оси пучка ширина углового распределения на выходе одна и та же (рис. 4). Т. е. пучок, пройдя определенный путь, как бы «забывает» начальный угол входа, и движение во второй области продолжается так, как будто ионы вошли под нулевым углом к оси капилляра. Сценарий процесса можно

представить себе так. В области рассеяния ионы падают на стенку до тех пор, пока на ее поверхности не образуется заряженное «пятно», которое отталкивает ионы и препятствует дальнейшей зарядке стенки, т.е. отклоняет ионы пучка на определенный угол так, что в дальнейшем ионы движутся параллельно оси капилляра. Далее часть частиц пучка, движущихся вдоль капилляра, соударяясь со стенкой, подзаряжают ее так, что образуется область, в которой основная часть пучка, «забывшая» о начальном направлении, транспортируется без взаимодействия со стенкой до выхода из капилляра. Глубину эффективного потенциала удержания ионов Ne^{7+} от соударения со стенками в области транспортировки можно оценить по углу расходимости пучка ± 2.5 град. после выхода из капилляра. Эта глубина составляет величину порядка 1 В. Авторы [3] оценили полный заряд, образующийся на стенке каждого капилляра в РЕТ пленке при прохождении многозарядных ионов. Он оказался равен приблизительно 5500 е (элементарных зарядов). Если предположить, что заряд равномерно распределяется на внутренней поверхности капилляра, то среднее расстояние между зарядами составляло 25 нм. Однако, по мнению авторов [3], из-за слишком большого аспектного отношения трубки поле в ней мало (в бесконечном капилляре поле строго равно 0) и недостаточно для транспортировки ионов. Поэтому авторы [3] полагают, что заряд на внутренней поверхности капилляра распределен неравномерно по азимуту и возможно образует систему квадрупольных линз, которая и обеспечивает бесконтактное прохождение ионов.

Можно написать уравнение баланса для заряда стенки капилляра:

$$\frac{dQ}{dt} = I_0 - I_t(Q(t)) - I_{leak}(Q(t)) \quad (1)$$

где I_0 – ток ионов, падающих на вход капилляра, I_t – ток прошедших ионов и I_{leak} – ток стекающих из капилляра зарядов. Авторы [4-5] вводят из общих соображений довольно экзотическую экспоненциальную зависимость тока разрядки от заряда, накопленного на поверхности капилляра. Созданная таким образом феноменологическая модель неплохо описывает полученные экспериментальные результаты, но, по мнению авторов, является лишь одним из возможных теоретических объяснений эффекта guiding и нуждается в дальнейшей доработке.

Группа японских ученых опубликовала работу [17], в которой экспериментально изучалась фокусировка пучка ионов гелия с энергией 2 МэВ и интенсивностью $7 \cdot 10^4$ ионов/(с·мм²) диэлектрическим капилляром, имеющим форму конуса (рис. 6). Пучок

частиц проходил через стеклянный капилляр, длина которого 50 мм, диаметр входного отверстия 0.8 мм, выходного — 0.8 мкм. Максимальный выход ионов составил 1.8 % от входного пучка, это означает, что плотность частиц на выходе из капилляра увеличилась более чем на 4 порядка по сравнению с первоначальной плотностью пучка. Причем прошедшие ионы не испытали значительных энергетических

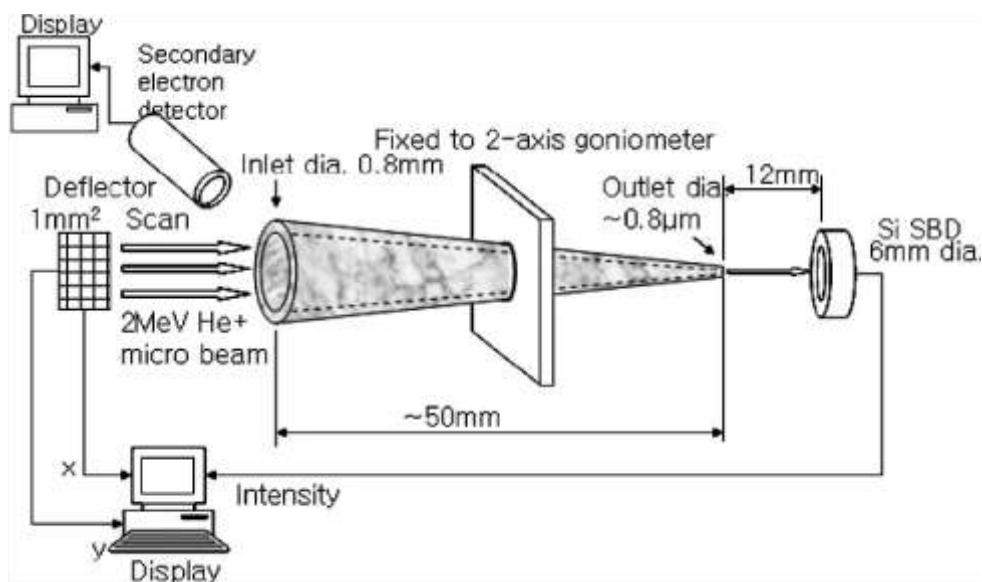


Рис. 6. Схема экспериментальной установки [19].

потерь. Авторы работы предположили, что такое поведение пучка объясняется поверхностным каналированием, т. е. тем, что ионы, падающие на поверхность под очень малыми углами скольжения, отражаются от нее практически зеркально. Они также не исключили возможность зарядки стенок капилляра, т.к. такая электростатическая зарядка, по мнению авторов [17], лишь мешает бесконтактному прохождению ионов через канал.

В этот же период в НИИЯФ проводилось исследование [18] по прохождению протонов с энергией 0.1 - 0.3 МэВ через кварцевые трубки длиной 100 мм и диаметром 1.6 мм. Было обнаружено, что при параксиальном расположении трубки относительно направления распространения пучка величина тока пучка, прошедшего через трубку, мало отличается от тока исходного пучка, и доля прошедшего пучка составляет примерно 80% исходного. Прохождение пучка через трубку наблюдалось и при отклонении оси трубки от направления пучка в пределах 3° , в то время как геометрическая прозрачность менее 1° . Объяснялся этот эффект подобно работе [3] следующим образом. В первые моменты прохождения пучка протоны сталкиваются со стенкой трубки и заряжают ее, отдавая свой заряд и выбивая электроны эмиссии.

Столкновения частиц со стенкой происходят до тех пор, пока не образуется поверхностный заряд, создающий поле, которое отталкивает протоны от стенки. Естественно, если ионы не сталкиваются со стенкой, зарядка не происходит. Таким образом, имеет место самоорганизация системы пучок - заряд стенки. В НИИЯФ проводились также эксперименты по пропусканию пучка через капилляр, имеющий форму конуса (длина 50 мм, диаметр входного отверстия 1.5 мм, диаметр выходного отверстия 0.5 мм). На выходе из конуса наблюдалось увеличение плотности пучка до 5 раз по сравнению с первоначальной плотностью.

В 2006 году была опубликована работа японских исследователей, в которой представлены результаты экспериментов по прохождению многозарядных ионов (Ar^{8+}) с энергией 8 кэВ и током пучка порядка 0.1 - 0.01 пА через стеклянные конические капилляры длиной 5 см [19]. В экспериментах использовались капилляры с входными диаметрами 2 мм и 0.8 мм и выходными диаметрами 55 мкм и 24 мкм соответственно. Плотность пучка на выходе при его падении вдоль оси капилляра увеличивалась в 10 раз. При прохождении через такие капилляры ионы сохраняли свое начальное зарядовое состояние даже при отклонении капилляров на угол ± 100 мрад. При этом ионы направлялись капиллярами при повороте в соотношении один к одному (рис. 7).

Авторы работы [19] объясняют полученные эффекты, так же как и авторы других работ по управлению пучками с помощью капилляров [3-16], образованием на внутренней поверхности капилляров самоорганизующейся системы зарядов, препятствующей столкновению проходящих ионов со стенками капилляра.

В настоящее время продолжается проведение экспериментов по транспортировке пучков различных ионов через пленки PЕТ, трубки и капилляры в форме конусов [20-23]. Все эксперименты свидетельствуют о существовании эффекта управления пучком с помощью диэлектрических каналов различных форм.

Итак, многочисленные эксперименты по прохождению заряженных частиц через диэлектрические и полупроводниковые капилляры указывают на самоорганизующийся характер взаимодействия пучка ионов со стенками капилляра, если он изготовлен не из проводника.

Исследования с коническим капилляром были простимулированы исследованиями гайдинг-эффекта. Хотя оценки показали, что при больших энергиях управление пучком происходит не за счет образования заряда на стенках, понимание всех процессов требует понимания гайдинга.

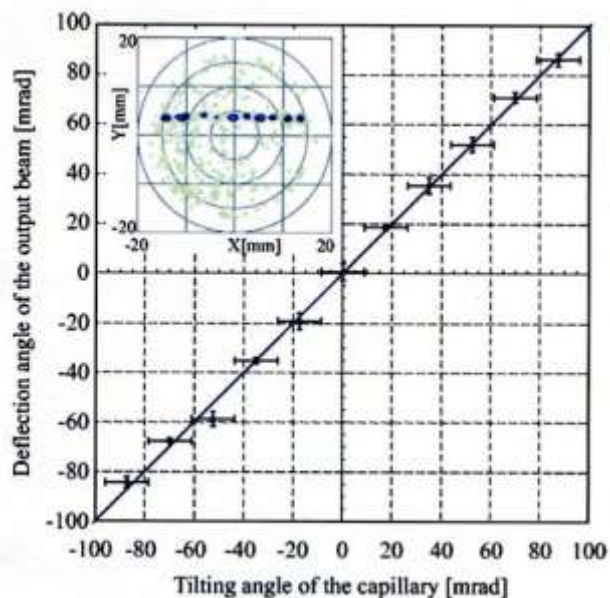


Рис. 7. Зависимость положения пика пучка проходящих через конический капилляр ионов от угла поворота капилляра (в левом верхнем углу представлен сдвиг позиции пятна прошедшего пучка при повороте капилляра, полученный с помощью позиционно чувствительного детектора) [19].

Выходное отверстие капилляра можно закрыть тонким окном [24]. Тогда получаем устройство, через которое можно пучок ускоренных ионов выводить из вакуума в плотную среду. Конический капилляр изготавливается точно так же, как микропипетка для биохимических экспериментов. Он имеет те же геометрические размеры. Поэтому микрокапилляр можно вводить внутрь живой клетки точно так же, как микропипетку. Но при этом будет вводиться не химический реагент, а ускоренные ионы. Если имеем капилляр с выходным отверстием диаметром 1 мкм, и выберем энергию так, чтобы пробег выходящих ионов в среде был тоже порядка 1 мкм, то получаем устройство, позволяющее выделить всю энергию ионов в объеме порядка 1 мкм³. Таким образом, такая система позволяет с микронной точностью «стрелять» ионами в различные элементы клетки. В нашем эксперименте возможность прицельно «стрелять» ионами будет использована для измерения влияния ударной волны, рождаемой ионами, на живую клетку в зависимости от прицельного параметра точки рождения волны относительно положения клетки.

1.2. Планируемое исследование с использованием конического капилляра

Разработана и освоена технология изготовления конических капилляров с тонким выходным окном. Создана установка для формирования микропучка на ускорителе AN-2500 НИИЯФ МГУ. Такой капилляр может вводиться в живую клетку подобно микропипетке для химического воздействия. Капилляр с тонким выходным окном дает возможность выделять энергию ионов в малом трехмерном объеме, порядка 1 куб. мкм.

Возможность создания микрокапиллярных систем для получения микропучков заряженных частиц в диапазоне энергий нескольких МэВ представляет большой интерес для постановки экспериментов с целью выяснения, какой вклад в радиационное воздействие вносят микроударные гидродинамические волны (волны сжатия), образующиеся вдоль треков плотно-ионизирующих частиц. В дальних длительных космических полетах особую опасность представляют тяжелые ионы космических лучей, обладающие повышенным радиобиологическим действием.

Как справедливо утверждал Г.А. Аскарьян в пионерской работе [25], посвященной гидродинамическому излучению от ионизирующих частиц в стабильных жидкостях, «для рассматриваемого явления характерно, что зона сильного поля излучения и, следовательно, зона эффективного воздействия значительно превосходит размеры области, непосредственно охваченные ионизацией. Действительно, даже на расстояниях от излучающего центра порядка микрона амплитуда волны сжатия все еще значительна.

В биологических экспериментах имели место ситуации, когда наблюдались радиационные повреждения клеток, хотя прохождение заряженной частицы в месте повреждения не было зарегистрировано детекторами.

И возможно, что часть повреждений клеток в радиобиологических экспериментах с тяжелыми ионами, в частности, на спутниках, когда прохождение частицы сквозь клетку не регистрировалось трековыми детекторами, было обусловлено именно ударными волнами. Однако сколько-нибудь детальные исследования этого вопроса на данный момент отсутствуют. Между тем, тяжелые ионы галактических космических лучей представляют одну из основных радиационных опасностей при дальних космических полетах и на будущих внеземных базах (лунной и на Марсе). Представляется важным как с научно-фундаментальной точки зрения, так и исходя из проблем пилотируемой космонавтики, изучить это явление.

Следует заметить, что в работе [26] была показана возможность облучения микрообъемов в пределах отдельной клетки микроколлимированным пучком протонов с энергией 3 МэВ от генератора Ван-де-Граафа. Выполнены некоторые исследования [27, 28]. Однако использование для этой цели микрокапиллярного устройства гарантирует ряд преимуществ. Как уже говорилось выше, с помощью микрокапиллярного устройства можно выделять энергию в объеме ограниченном не только в поперечном направлении, но и в продольном.

Возможность повреждения клеток при «дистантном» прохождении тяжелых заряженных частиц (т.е. когда их треки минуют клетку на каком-то расстоянии) важна и в практике радиационной терапии с использованием пучков тяжелых частиц. Возможность управления пучками ионов с помощью диэлектрических капилляров открывается новой областью исследований..

Конический диэлектрический капилляр позволяет фокусировать пучок ускоренных ионов, что обеспечивает ток, достаточный для получения измеряемого выхода продуктов ядерной реакции или характеристического рентгеновского излучения с площади микронного размера (рис. 8).

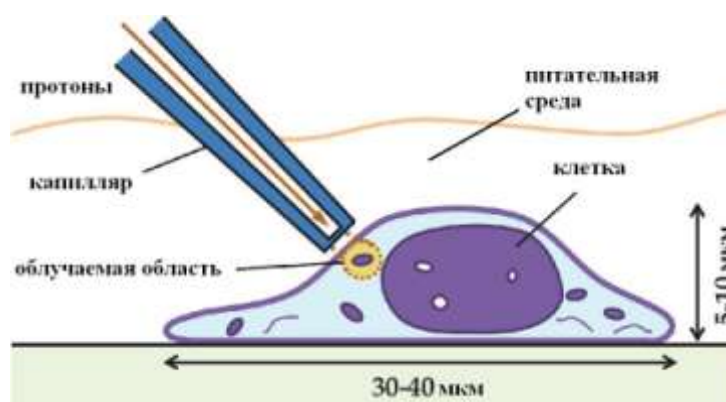


Рис. 8. Схематическое изображение капилляра. Протоны фокусируются в пятно размером 1 мкм.

Метод изготовления конических капилляров аналогичен изготовлению микропипеток, применяемых в биохимии. Метод создания тонкого выходного окна разрабатывается нами в рамках проекта. Установка для получения микропучка с выпуском его через тонкое окно создана в России впервые. Подобная установка, на которой можно "бомбить" элементы живой клетки ускоренными ионами, есть только в Японии.

ГЛАВА II. СОЗДАНИЕ КОНИЧЕСКОГО КАПИЛЛЯРА

ИЗГОТОВЛЕНИЕ МИКРОПИПЕТОК

При изготовлении микропипеток мы используем стандартный заводской прибор *Microprocessor-controlled micropipette puller* – это прибор для вытягивания микропипетки (рис.9). Процессы, которые требуются для изготовления микропипеток являются для всех *pullers* одинаковыми, но *PUL -100* удобен в использовании, так как позволяет гибко менять значения параметров, определяющих характеристики конического капилляра.



Рис. 9. Microprocessor-controlled micropipette puller



Рис. 10. Вид сверху.

Натриево кальциево силикатный капилляр удерживается зажимами, установленными на двух подвижных каретках с подшипниками, которые перемещаются на прутах нержавеющей стали. Двумя каретками можно управлять вручную для удобства установки капилляра в прибор (рис.10). При изменении параметра нагрева HEAT меняется подача тепла, которое подается на капилляр. Регулируя параметр HEAT, силу вытягивания (Pull), время задержки после окончания накаливания нити (Delay), длину вытягивания (Trip) мы можем получить необходимый конус капилляра. В начале работы необходимо делать калибровочный тест, который используется для оценки параметров создаваемого капилляра или новой нити. Новый исходный капилляр может иметь отличные рабочие температуры в зависимости от состава или диаметров капилляра и толщины стенки. Вытягивание каждого капилляра может проходить в несколько этапов (Line), от 1 до 4-х.

Можно получать пипетки с разным углом конуса.

Например:

Pgm	Line	Heat	Pull	Trip	Delay
18/6	1	870	0	140	100

Таблица 1. Значения программы для получения острой микропипетки в 1 этапе.

Pgm	Line	Heat	Pull	Trip	Delay
44/5	1	900	0	50	40
	2	900	0	15	50
	3	905	0	70	80

Таблица 2. Значения программы для получения острой микропипетки в 3 этапа.

На рисунке 11 продемонстрированы микропипетки, вытянутые по указанным выше табличным данным.



Рис. 11. Острые микропипетки

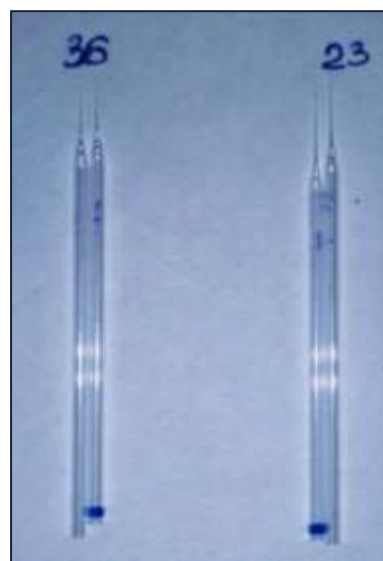


Рис. 12. Пипетки с большим углом конуса.

Получали и пипетки с большим углом конуса, выполненные в 2 и 3 этапа (рис. 12):

Pgm	Line	Heat	Pull	Trip	Delay
23/5	1	920	0	60	100
	2	893	85	60	90
	3	790	120	100	0

Таблица 3. Значения программы для получения пипетки с большим углом конуса.

Pgm	Line	Heat	Pull	Trip	Delay
36/2	1	890	0	10	40
	2	890	0	20	70

Таблица 4. Значения программы для получения пипетки с большим углом конуса.

Исходный капилляр имеет внешний диаметр 1,5 мм и внутренний 1,15 мм. В результате, были получены следующие результаты: внутренний диаметр выходного отверстия конического капилляра 1,55 мкм и внешний диаметр 4,15 мкм (рис.13-14).

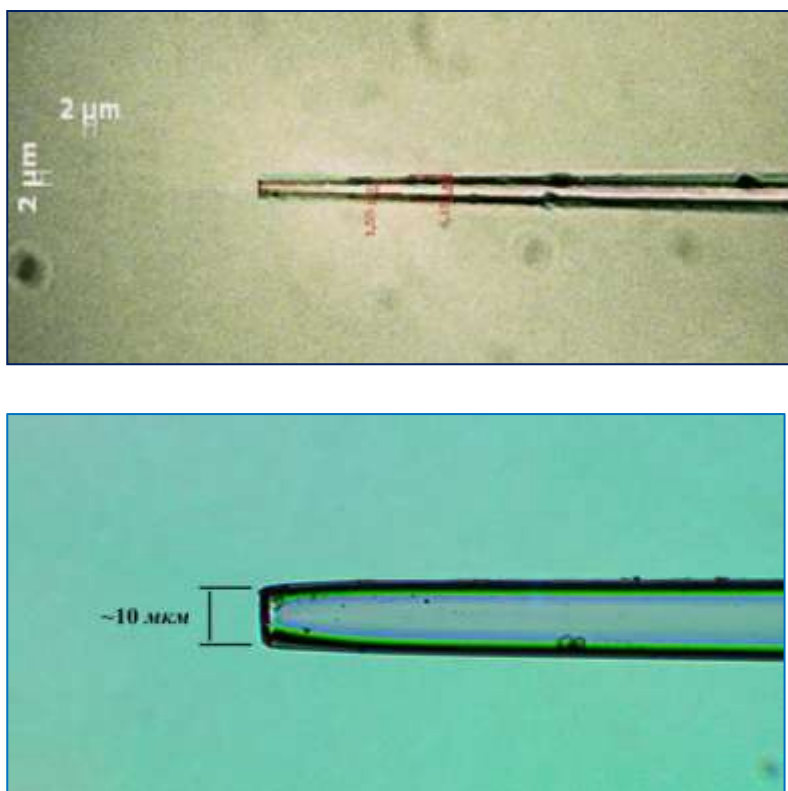


Рис. 13-14. Фотографии диэлектрического капилляра под микроскопом

В данных опытах использовались капилляры с внешним диаметром в 1,5 мм и внутренним в 1,15 мм. Калибровочное значение HEAT для наших условий было 931. Данный прибор позволяет вытягивать микропипетки до нескольких микрометров в диаметре. Получение микрометровых пипеток необходимо для того, чтобы с легкостью можно было проникать в живые клетки, не сдавливая и не сплющивая их. Таким образом, с помощью такого конуса можно исследовать влияние облучения отдельных элементов живой клетки. Также такие конические капилляры с окном позволяют проводить облучение биологического объекта, находящегося в жидкости.

ТЕХНОЛОГИЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ВЫХОДНОГО ОКНА ДЛЯ КОНИЧЕСКОГО КАПИЛЛЯРА

После получения заготовок на приборе Microprocessor-controlled micropipette puller переходим к прибору Microforge MF-90.



Рис. 15. Microforge MF-90

Это прибор для изготовления различных видов микропипеток (рис.15). Отдельные вращения механизмов вертикального и горизонтального движения позволяют пипетке подходить под любым углом, а специальное устройство в нагревателе может преобразовывать ее в любую необходимую форму.

Держатель с заготовкой закрепляется на манипуляторе, напротив которого имеется нагреватель - небольшая петля из платины или что – то подобное (рис.16)



Рис. 16. Зона изготовления окна в Microforge MF-900

Температура регулируется таким образом, чтобы при кратковременном нажатии на педаль включения тока капля стекла накалялась до красного свечения. Температура в процессе работы регулируется длительностью нажатия педали. Для включения тока используется педаль, т.к. руки заняты на ручках манипулятора, с помощью которого совершаются движения капилляра. Надо получить ровный оплавленный торец капилляра, но не перегреть его, чтобы не появились искривления кончика капилляра. Таким образом можно получить открытый капилляр 2 мкм и более в диаметре.

Теперь переходим к самому сложному – изготовлению окна. Для этого используется лавсановая пленка толщиной от 5 до 10 мкм. Капилляр вставляется в правый манипулятор, а пленка в левый (рис.17 а).

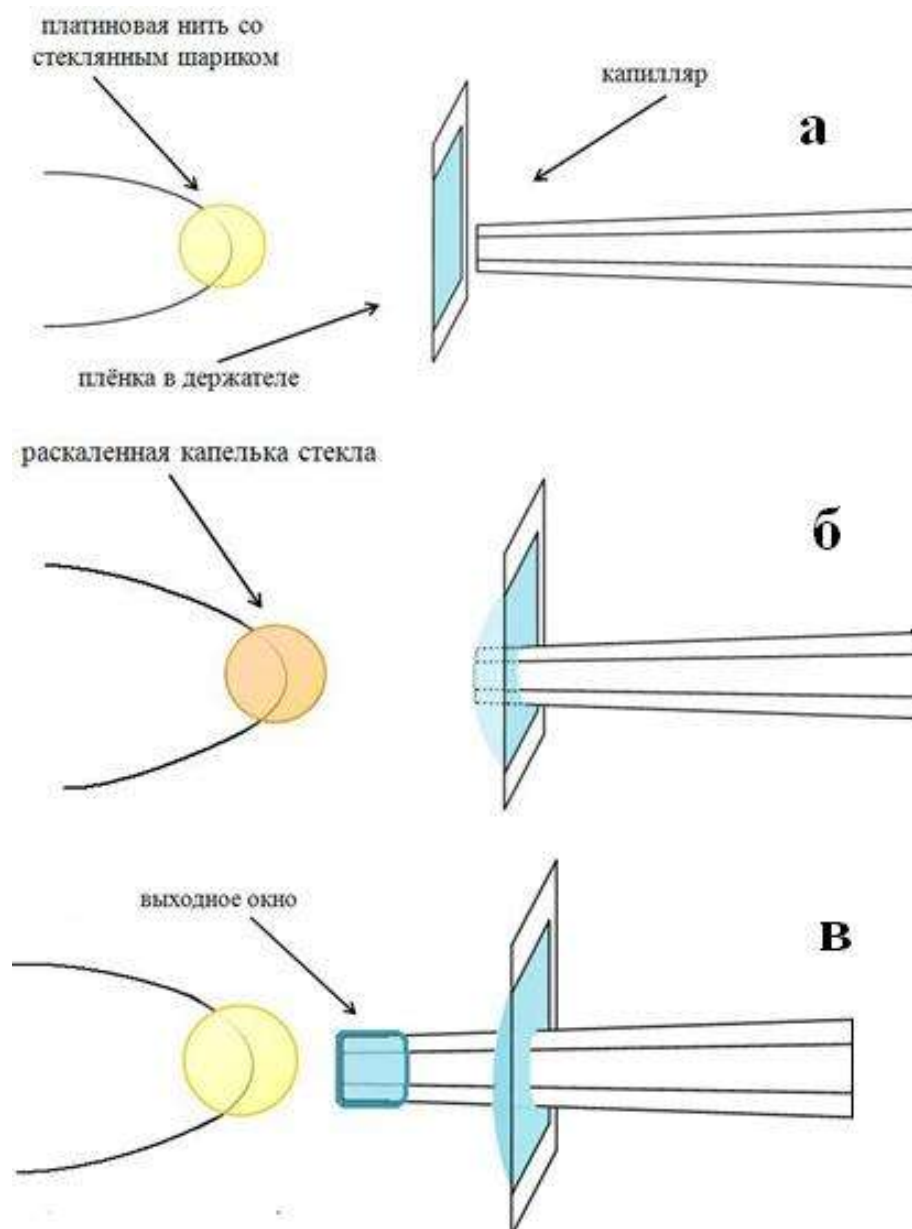


Рис.17. Три шага изготовления выходного окна: а) установка капилляра, нити накаливания и пленки PET в держателе microforge. б) капилляр упирается в пленку и слегка ее прогибает, а стеклянная капелька накаляется. в) расплавленный участок пленки закрывает выходное отверстие, образуя окно.

Кончик капилляра тонкий, поэтому гибкий и при сравнительно грубом с ним обращении не ломается. Например, даже при резком поднесении его к пленке он упирается в неё и прогибается.

Пленка устанавливается от нагреваемой капли на расстояние порядка 1мм. Нагреватель осторожно и внимательно на доли секунды включается педалью при контроле ситуации через микроскоп (рис. 17 б). Одновременно направляем капилляр к пленке. Пленка натягивается и заправляет кончик капилляра, образуя окно (рис. 17 в).

Нагревать надо с осторожностью, потому что при перегреве пленка просто расплавится, а кончик капилляра может заплываться. Толщина получающегося окна зависит от толщины используемой пленки и от температуры. Желательно делать каплю нагревания больше, чем диаметр кончика капилляра, чтобы тепло равномерно подавалось на площадь торца капилляра.

Несколько иллюстраций изготовленного тонкого выходного окна (рис.18).

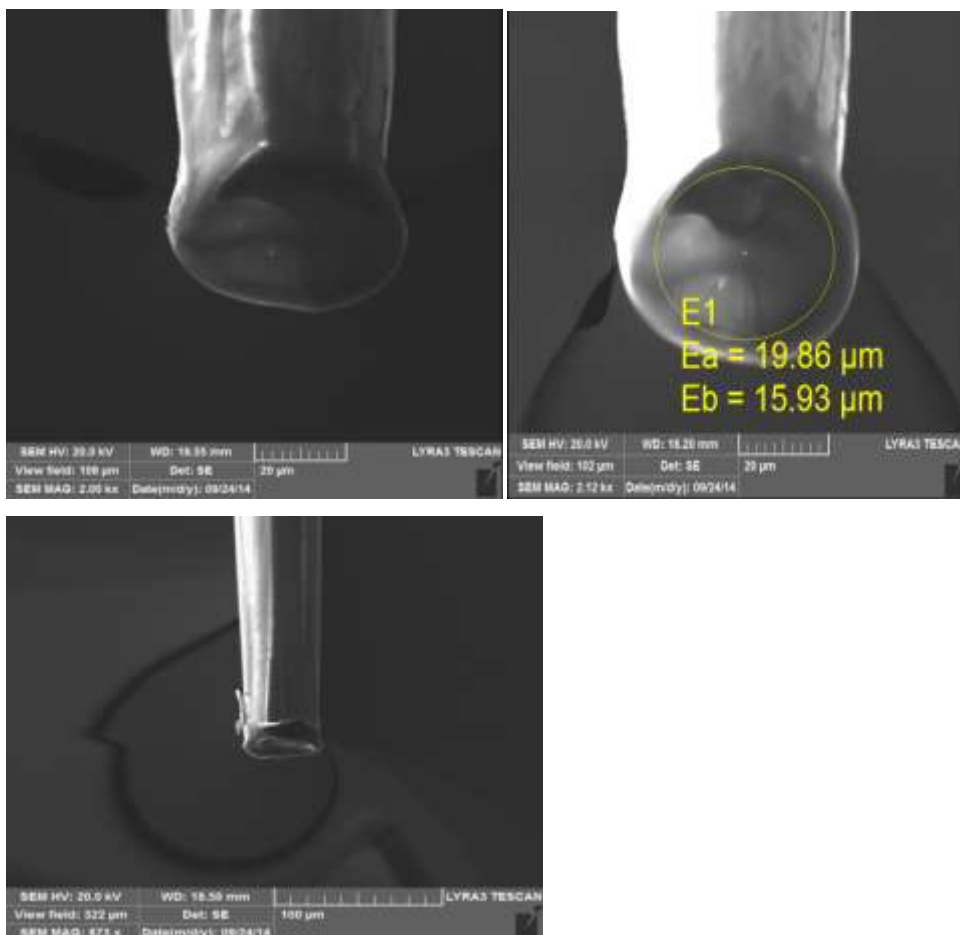


Рис. 18. Фотографии кончика капилляра с тонким выходным окном, сделанные на электронном микроскопе.

УСТАНОВКА

Экспериментальный комплекс для исследования радиационного воздействия на живую клетку создан на базе ускорителя AN-2500, находящегося в НИИЯФ МГУ. Данный ускоритель представляет собой ускоритель Ван-Де-Граафа, способный разгонять частицы (протоны и альфа-частицы) до энергии 2.5 МэВ. Схема экспериментального комплекса представлена ниже:

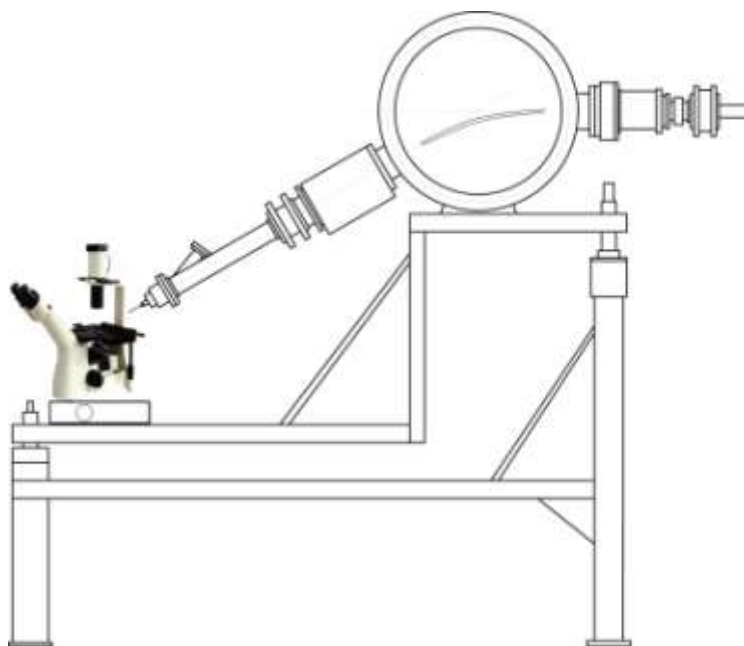


Рис. 19 . Схема экспериментального комплекса.

Установку условно можно разделить на несколько частей (рис. 19). Первая часть – участок линии от ускорителя (рис. 20, 1). Далее пучок попадает в камеру электростатического анализатора (рис. 20, 2), в которой происходит отклонение пучка вниз на 30° , после чего он попадает в мониторную камеру (рис. 20, 3), где происходит его корректировка и измеряется ток пучка. Затем пучок частиц подходит к концу линии – коническому капилляру (рис. 20, 4), который находится в непосредственном контакте с исследуемым образцом (рис. 22). Юстировка капилляра на входе в капилляр осуществляется системой двух пар отклоняющих пластин (рис. 20, 7). Наблюдение радиационного воздействия на живую клетку происходит при помощи реверсивного микроскопа фирмы AmScope (Inverted Tissue Culture Microscope 40x-800x with 9M Camera Модель IN200B-9M) (рис. 20, 5) в режиме реального времени. Реверсивный микроскоп позволяет одновременно проводить облучение и наблюдать эффекты снизу через прозрачное дно чашки Петри, в которой находится живая клетка. Наблюдать

поведение клетки можно через окуляр, либо выводить изображение на экран компьютера при помощи веб-камеры (рис. 20, 8).

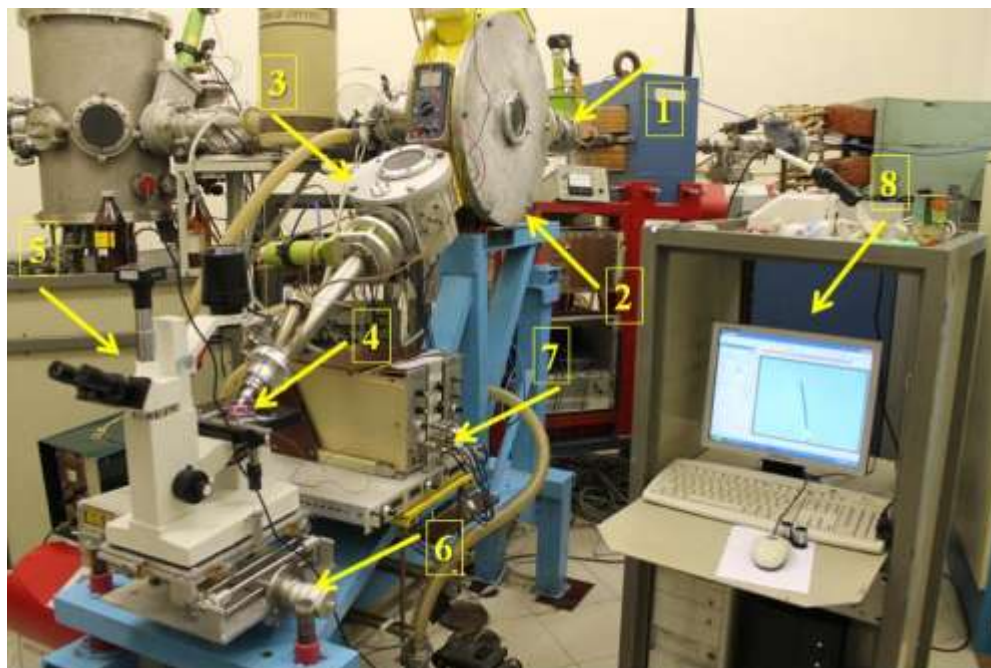


Рис. 20. Изображение установки. 1 – участок линии от ускорителя; 2 – камера электростатического анализатора; 3 – мониторная камера; 4 – конический капилляр и клетки на чашке Петри; 5 – реверсивный микроскоп; 6 – юстировочный столик; 7 – система тонкой юстировки пучка на входе в капилляр; 8 – компьютер.

Сам микроскоп установлен на специально изготовленном юстировочном столике (рис. 20, 6 и рис. 21), который может перемещаться в трех ортогональных направлениях при помощи микрометрических винтов. Это обеспечивает возможность совместить точку наблюдаемую в микроскоп, с точкой, в которую направлен пучок ионов.

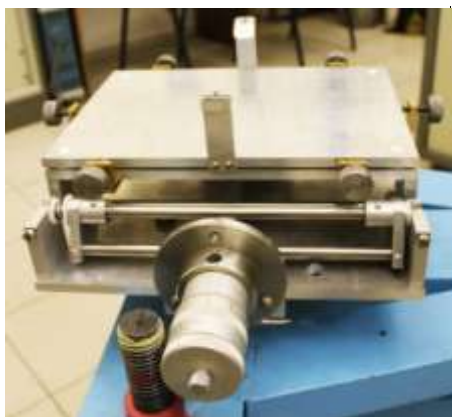


Рис. 21. Юстировочный столик.

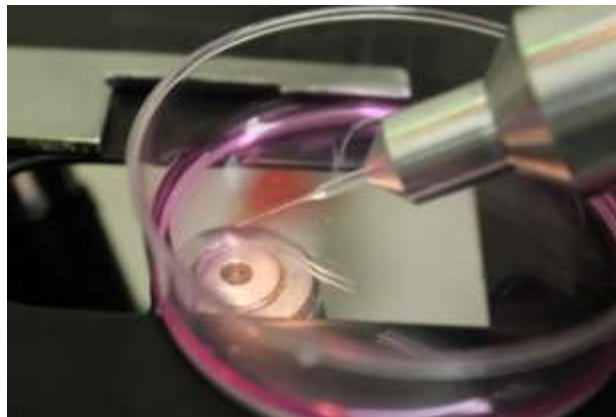


Рис. 22. Кончик капилляра с тонким выходным окном в питательной среде клеток

ЖИВАЯ КУЛЬТУРА

Для исследования выживаемости клеток в зависимости от прицельного расстояния и мощности пучка ионов используются клетки мышинной меланомы М-3, посаженные на поверхность стеклянной чашки Петри или слайд-флакона. Размер клеток – 20-30 мкм. Выживаемость клеток контролируется путем добавления красителей трипановый синий и МТТ. Трипановый синий окрашивает мертвые и поврежденные клетки. Живые клетки при этом остаются не окрашенными (рис. 23 А). Краситель локализуется в области клеточного ядра (рис. 23 Б, показано стрелочкой), но не в цитоплазме.

Первой задачей эксперимента является определение такого прицельного расстояния и такой мощности, при которых клетка не повреждается и, как следствие, не окрашивается трипановым синим.

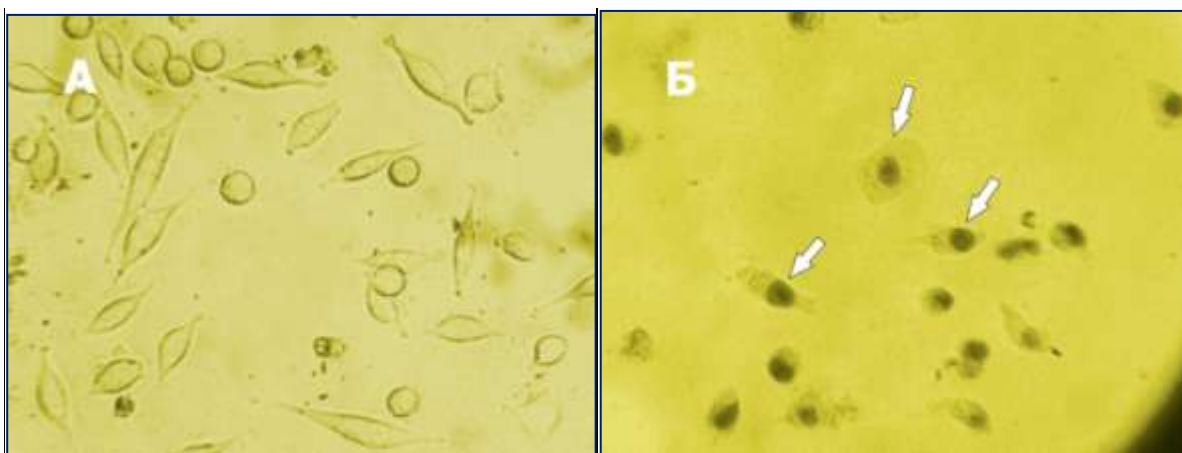


Рис. 23 Живые (А) и Мертвые (Б) клетки, окрашенные трипановым синим. Гибель клеток вызывали, добавляя формальдегид к питательной среде. Стрелочками показана локализация красителя в ядрах клеток.

Для подтверждения того, что данные параметры действительно не оказывают влияния на жизнеспособность клеток, будет проведено окрашивание методом МТТ. Суть данного метода заключается в том, что МТТ (химическая формула - 3[4,5-диметилтиазол--2-yl]-2,5 дифенилтетразолиумбромид) проникает внутрь живых клеток и под действием клеточных ферментов превращается в нерастворимый краситель формазан. Подобная трансформация возможна лишь в живых клетках, поэтому окрашивание МТТ свидетельствует об их жизнеспособности (рис. 24). При этом формазан откладывается в цитоплазме клетки, но не в клеточном ядре (рис. 24 А, показано стрелочкой).

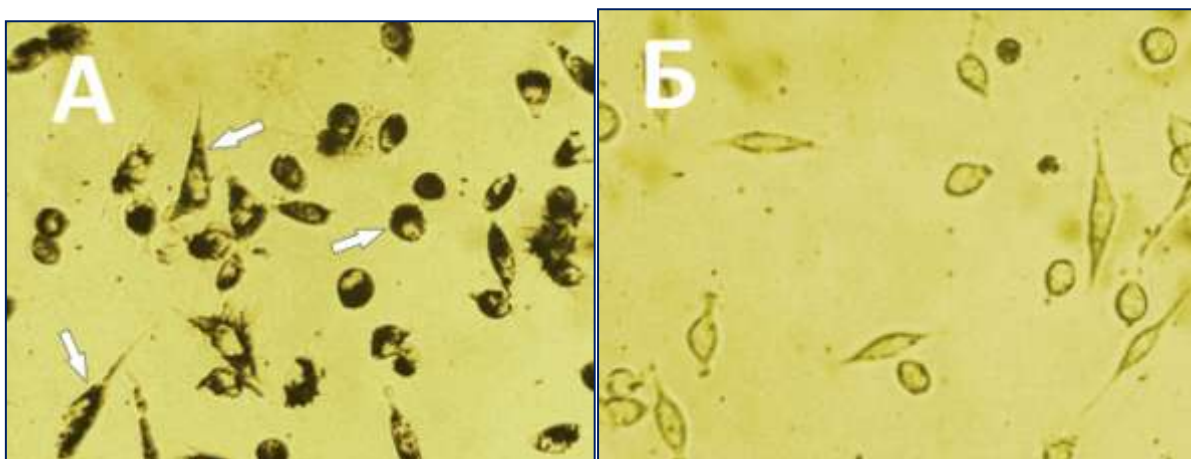


Рис. 24 Живые (А) и мертвые (Б) клетки, окрашенные МТТ. Гибель клеток вызывали, добавляя формальдегид к питательной среде. Стрелочками показана локализация формазана в цитоплазме клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТ

В ходе работы и долгих усилий пучок был выведен. Энергия пучка равна 0,804 кэВ. Вакуум в ускорителе Ван-Де-Граафа равен 10^{-6} мбар. Давление в установке достигает 10^{-5} мбар. Это хороший показатель, чтобы дальше можно было выводить пучок. Значит, в установке устранены все течи, препятствующие получению высокого вакуума. Ток пучка на выходе из ускорителя равен 2 мкА. На входе в камеру электростатического анализатора ток примерно равен 0,3 – 0,4 мкА. Из большой камеры через соединение протоны попадают в мониторинговую камеру, где ток равен 0,1 мкА и через ионопровод попадает в капилляр. При прохождении протонов через 5 мкм окно капилляра теряется 0,3 МэВ. Таким образом «бомбить» клетки мышинной меланомы мы будем пучком 0,5 МэВ. Подаваемое напряжение на электростатический анализатор для отклонения пучка совпало с расчетным и равно 16,8 кВ.

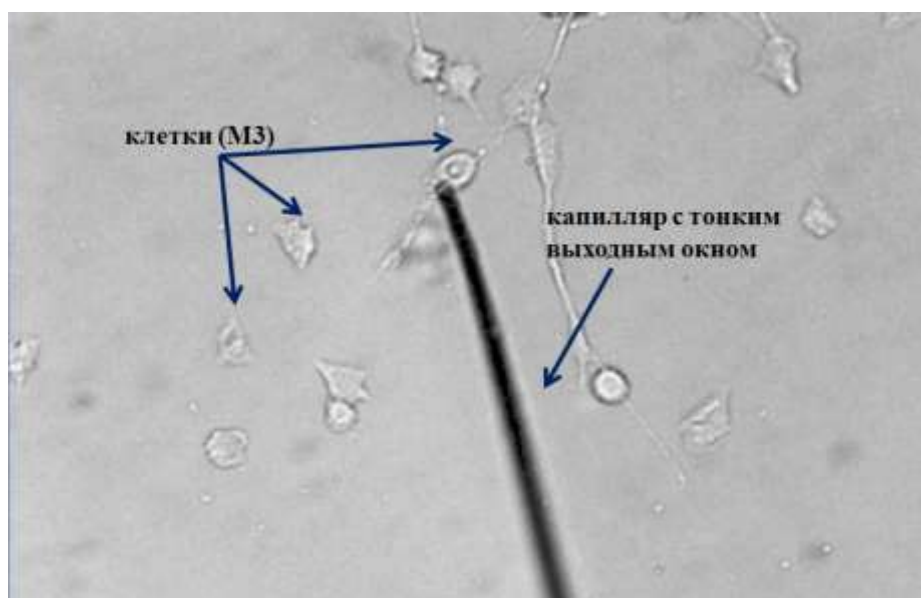


Рис. 24. Изображение введения капилляра в питательную среду. Изображение получено на реверсивном микроскопе AmScore с камерой 9M модель IN200B-9M.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате выполнения дипломной работы:

1. Создана и освоена технология изготовления конического капилляра с выходным отверстием от 2-и мкм и более.
2. Создана оригинальная методика изготовления тонкого выходного окна из лавсана толщиной порядка 5 мкм, через которое легко проходят протоны с энергией порядка 1 МэВ.
3. Освоена методика идентификации состояния (живые, неживые) клеток.
4. Установка собрана полностью и эксперимент в настоящее время проводится. Пучок проведен через весь тракт вплоть до входного отверстия капилляра.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает огромную благодарность своему научному руководителю Похилу Г. П. за проявленное терпение, наставления и ценные указания, которые были получены в ходе выполнения работы. Заведующему кафедры общей ядерной физики Ишханову Б. С., а также Куликаускасу В.С. и Криволапу В. В. за помощь в проведении эксперимента. Акасову Р. за помощь в предоставлении клеточных культур и работы с ними. Своей семье за моральную поддержку.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. N. Stolterfoht, J.-H. Bremer, V. Hoffmann, R. Hellhammer, D. Fink, A. Petrov, and B. Sulik // *Phys. Rev. Lett.* 88, 133201 (2002).
2. Г.П. Похил, К.А.Вохмянина, Л.А. Жилияков, Т. Ikeda, Y. Kanai, Y. Iwai, Т.М. Kojima, Y. Yamazaki // *Известия РАН, серия физическая*, //т.72, №5, стр. 674-679 (2008).
3. Г.П. Похил, К.А. Вохмянина, А.И. Мирончик // *Поверхность* №4, с.82-86 (2009)
4. Винецкий В. Л., Холодарь Г. А. «Радиационная физика полупроводников», изд. Наук, думка, Киев, 1979.
5. N. Stolterfoht, R. Hellhammer, J. Bundesmann, et al. // *Phys. Rev. A* 77, 032905 (2008).
6. Ikeda, Y. Kanai, T. M. Kojima, Y. Iwai, Y. Kanazawa, M. Hoshino, T. Kobayashi, G. P. Pokhil, and Y. Yamazaki, *J. Phys. Conf. Ser.* 88, 012031 (2007).
7. А.С. Камышан, Ф.Ф. Комаров, А.Е. Лагутин // Тез. докл. XXXVII Международной конференции по ФВЗЧК, Москва, 29 мая – 31 мая 2007 г. Изд-во Моск. Ун-та, с. 26.
8. Г.П. Похил, К.А. Вохмянина // *Поверхность* №3, с.71-73 (2008)
9. N. Stolterfoht, R. Hellhammer, Z. D. Pešić, V. Hoffmann, J. et al. // *Nucl. Instrum. Methods in Phys. Res. B* 225, 169 (2004).
10. П.В. Павлов, А.Ф. Хохлов «Физика твердого тела», изд. Нижегородского ГУ, Нижний Новгород, 1993.
11. М. Каминский «Атомные и ионные столкновения на поверхности металлов», изд. «Мир», Москва, 1967.
12. S.R. Ovchinskiy // *Phys. Rev. Lett.* 21, 1450 (1968)
13. Крастелев Е.Г., Яблоков Б.Н. // *Письма в ЖТФ*, 1977. Т.3, №15, с. 775.
14. Агафонов А.В., Айрапетов А.Ш., Коломенский А.А. и др. // *Физика плазмы*, 1981. Т.7, №2, с. 267.
15. N. Stolterfoht, J.-H. Bremer, V. Hoffmann et al. // *Phys.Rev.Lett.* 2002. V.88, p. 133201.
16. N. Stolterfoht, V. Hoffmann et al. // *Nucl. Instr. and Meth. in Phys.* 2003. B 203, p. 246-253.

17. R. Hellhammer, Z.D.Pes̆ic, P. Sobocinski et al. // Nucl. Instr. and Meth. in Phys. 2005. B 233, p. 213–217.
18. Gy. Vırkor, R.T. Rajendra Kumar, Z.D. Pes̆ic // Nucl. Instr. and Meth. in Phys. 2005. B 233, p. 218–221.
19. N. Stolterfoht, R. Hellhammer, P. Sobocinski // Nucl. Instr. and Meth. in Phys. 2005. B 235, p. 460–467.
20. N. Stolterfoht, R. Hellhammer, J. Bundesmann, D. Fink, Y. Kanai, M. Hoshino //in press.
21. M.B. Sahana, P. Skog, Gy. Vikor, R.T. Rajendra Kumar, R. Schuch // Phys. Rev. 2006. A 73 (4), p. 040901(R).
22. R.T.R. Kumar, X. Badel, G. Vikor // Nanotechnology 2005. V.16 (9), p. 1697.
23. P. Skog, I.L. Soroka, A. Johansson and R. Schuch //Nucl. Instr. and Meth. in Phys. 2007. B 258, p. 145-149.
24. Диссертация Г.П. Похила на соискание ученой степени доктора физико-математических наук, 2010
25. Аскаръян Г.А. Гидродинамическое излучение от треков ионизирующих частиц в стабильных жидкостях // Атом. Энергия.1957. Т. 3. №8. С. 152-153.
26. R.E., Bloom W. // Science. 1953. V. 117.P. 487.
27. Zircle R.E., Tobias C.A. // Arch. Biochem. Biophys. 1953. V. 47. P. 282.
28. Zircle R.E. In “Radiation Biology” (ed. A. Hollaender). Vol. I, Part I, P. 315. N.Y. 1954.