

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|---|-----------|
| Предисловие к первому изданию | 5 |
| Предисловие ко второму изданию | 8 |
| Глава 1. Основы лазерной биомедицины. | 10 |
| 1.1. Введение | 10 |
| 1.2. Виды взаимодействия лазерного излучения с живыми объектами. | 12 |
| 1.3. Структура биологических тканей и клеток | 16 |
| 1.4. Рассеяние и поглощение света | 20 |
| 1.5. Простейшие дискретные модели ткани | 28 |
| 1.6. Флуоресценция | 41 |
| 1.6.1. Однофотонная флуоресценция (41). 1.6.2. Многофотонная флуоресценция (44). | |
| 1.7. Действие лазерного излучения на биоткань | 46 |
| 1.7.1. Виды фотовоздействий (46). 1.7.2. Тепловые эффекты (48). 1.7.3. Фотодинамическое и фотохимическое воздействие (59). | |
| 1.8. Примеры применения лазеров в биомедицинской диагностике, терапии и хирургии | 66 |
| 1.9. Проблемы и перспективы | 92 |
| Глава 2. Распространение света в биологических тканях | 94 |
| 2.1. Распространение непрерывного излучения | 94 |
| 2.2. Распространение коротких импульсов | 103 |
| 2.3. Диффузионные волны фотонной плотности | 105 |
| 2.4. Принципы оптической диффузионной спектроскопии и томографии | 110 |
| 2.4.1. Диффузионная оптическая спектроскопия (110). 2.4.2. Диффузионная оптическая томография (110). | |
| 2.5. Взаимодействие поляризованного излучения с биологическими объектами. | 127 |
| 2.5.1. Анизотропия биотканей (127). 2.5.2. Описание поляризованного излучения. Слабо рассеивающие биоткани (129). 2.5.3. Сильно рассеивающие биоткани (131). | |
| 2.6. Оптические свойства тканей глаза | 135 |
| 2.6.1. Оптические модели тканей глаза (135). 2.6.2. Спектры пропускания и рассеяния (136). 2.6.3. Поляризационные свойства тканей глаза (138). | |
| 2.7. Особенности взаимодействия лазерного излучения с биотканями. | 143 |
| 2.7.1. Введение (143). 2.7.2. Формирование спеклов и интерферометрия рассеивающих сред (144). 2.7.3. Динамическое рассеяние света (150). 2.7.4. Конфокальная микроскопия (161). 2.7.5. Оптическая когерентная томография (164). 2.7.6. Цифровая голографическая и интерференционная | |

| | |
|--|-----|
| микроскопия (173). 2.7.7. Генерация второй гармоники (181). 2.7.8. Терагерцовая спектроскопия (182). | |
| Глава 3. Измерение и управление оптическими свойствами биотканей | 189 |
| 3.1. Методы измерения оптических параметров биотканей | 189 |
| 3.2. Управление оптическими свойствами биотканей | 210 |
| Глава 4. Лазеры для биомедицины | 212 |
| 4.1. Принцип работы лазера и свойства лазерного излучения | 212 |
| 4.2. Газовые лазеры | 219 |
| 4.3. Жидкостные лазеры | 232 |
| 4.4. Твердотельные лазеры | 234 |
| 4.5. Полупроводниковые лазеры | 241 |
| 4.6. Твердотельные лазеры с диодной накачкой | 246 |
| 4.7. Перестраиваемые лазерные источники | 249 |
| 4.8. Лазеры с короткой и сверхкороткой длительностью импульсов | 252 |
| Глава 5. Волоконные световоды для биомедицины | 260 |
| 5.1. Физика и техника волоконных световодов | 260 |
| 5.2. Медицинские волоконные световоды и облучатели биотканей | 275 |
| 5.3. Волоконные лазеры | 285 |
| 5.4. Микроструктурные световоды | 288 |
| 5.5. Биомедицинские волоконно-оптические датчики и зонды | 290 |
| Глава 6. Лазерная спектрофотометрия и фурье-спектроскопия | 307 |
| 6.1. Введение | 307 |
| 6.2. Спектрофотометрия | 309 |
| 6.3. ИК-фурье-спектроскопия | 320 |
| 6.4. Абсорбционная спектроскопия быстропротекающих процессов | 324 |
| Глава 7. Оптико-калориметрическая спектроскопия биообъектов | 328 |
| 7.1. Физические основы методов оптико-калориметрической спектроскопии | 328 |
| 7.2. Экспериментальные исследования и типичные измерительные установки | 333 |
| 7.3. Конструкции спектрофонов и зондов | 341 |
| 7.4. Области применения оптико-калориметрических методов в биологии и медицине | 350 |
| Глава 8. Лазерный микроспектральный анализ в биомедицинских исследованиях 370 | |
| 8.1. Введение | 370 |
| 8.2. Микроскопия и микроспектрофотометрия | 370 |
| 8.3. Флуоресцентный микроанализ | 379 |
| 8.4. КР-микророба | 390 |
| 8.5. Эмиссионная спектроскопия лазерной микроробы и метод LAMMA | 405 |
| Библиографический список | 413 |
| Предметный указатель | 480 |

Предисловие к первому изданию

*Моим внукам
Даше, Жене, Степе и Серафиму*

Среди большого круга вопросов, рассматриваемых в рамках оптической биофизики, можно выделить лазерную биомедицину, включающую три главных направления: лазерную хирургию и деструкцию биотканей, клеток и биомолекул; лазерную терапию и фотобиологию и, наконец, лазерную микро- и макродиагностику [1–10].

Традиционная фотобиология с использованием обычных (тепловых) источников света довольно успешно развивалась в течение многих лет с выходом в практическую фотомедицину. Имеются существенные достижения в понимании процессов фотосинтеза растений и бактерий, выяснении природы зрения, фотопериодических явлений. Появление принципиально нового инструмента — лазера — стимулировало дальнейшее быстрое развитие фотобиологии, постановку и успешное решение многих проблем, которые раньше или вовсе не ставились (из-за отсутствия соответствующих источников излучения) или решались косвенным путем. В отличие от тепловых источников света лазеры обладают высокой степенью монохроматичности, временной и пространственной когерентности, направленности и поляризованности излучения при значительной его интенсивности и яркости, могут перестраиваться по длинам волн и излучать световые импульсы рекордно короткой длительности.

За почти сорокалетний период развития лазерной физики и техники был создан широкий арсенал лазеров и лазерных систем, по своим параметрам в значительной мере удовлетворяющих потребностям лазерных технологий, включая биотехнологию и фотомедицину. Сложность строения биологических объектов, значительное разнообразие в характере их взаимодействия со светом определяют необходимость использования многих типов лазеров и лазерных систем в фотобиологии, а также стимулируют разработку новых лазерных средств, включая средства доставки лазерного излучения к объекту исследования или воздействия, наилучшими из которых являются разнообразными волоконные световоды. Для целей биомедицины пригодны надежные, с большим сроком службы газоразрядные лазеры, высокоинтенсивные химические и эксимерные лазеры, перестраиваемые в широком диапазоне длин волн жидкостные лазеры на красителях, высокоинтенсивные твердотельные лазеры со сверхкороткой длительностью импульсов, малогабаритные полупроводниковые лазеры и др. Лазеры покрывают широкий диапазон длин волн от 10^2 до 10^5 нм; уровни выходной мощности непрерывных лазеров и средней мощности импульсных составляют от нескольких милливатт до десятков и сотен ватт; энергия в импульсе изменяется в пределах от нескольких миллиджоулей до нескольких джоулей; длительности импульсов также изменяются в широком диапазоне, от нескольких миллисекунд до единиц наносекунд; ширина линии излучения лазеров — от нескольких килогерц до десятков гигагерц, угловая расходимость составляет от десятков градусов у полупроводниковых лазеров до долей миллирадиана у газоразрядных. Специальные оптические системы на основе лазеров позволяют значительно расширить возможности лазерного излучения. Так, преобразование частоты излучения

с помощью средств нелинейной оптики позволяет увеличить диапазон длин волн и осуществить непрерывную перестройку длин волн в широкой области, эффективно усиливать излучение малой мощности, существенно сокращать длительность (до единиц фемтосекунд), увеличивая тем самым ширину спектра излучения вплоть до нескольких десятков и даже сотен нанометров («белый» лазер) и уменьшая при этом длину когерентности до нескольких микрометров, или, наоборот, уменьшать ширину линии (до единиц и долей герца), существенно повышая тем самым предельное спектральное разрешение.

Для целого ряда методов, например упругого и квазиупругого рассеяния, достаточно иметь лазер, работающий на фиксированной длине волны с умеренной или даже малой мощностью излучения. Другие применения, в том числе спектроскопия комбинационного рассеяния, требуют более мощных лазеров с перестройкой длины волны излучения. Еще большие уровни мощности и режим импульсной генерации необходимы для лазерного микроспектрального анализа и лазерной масс-спектрологии. При изучении фотобиологических процессов малой длительности используются лазеры с короткими и сверхкороткими импульсами.

Очевидно, что успешное применение лазеров в биомедицине в значительной мере зависит от выбора источника лазерного излучения и средства доставки излучения к биообъекту, адекватных решаемой задаче. В связи с этим много внимания в книге уделено описанию разнообразных лазеров, волоконных световодов и волоконно-оптических систем, а также измерительных устройств и автоматизированных комплексов уже применяемых или перспективных для применения в биологии и медицине. Достаточно подробно анализируются особенности взаимодействия лазерного излучения с биотканями как сильно рассеивающими средами со случайной организацией или прозрачными средами с квазиупорядоченной структурой. В качестве примеров из области лазерных медицинских технологий представлено довольно детально описание некоторых методов микродиагностики биообъектов: абсорбционной, калориметрической и фотоионизационной спектроскопии, а также лазерного микроспектрального анализа.

Настоящая книга включает ряд разделов специального курса лекций «Оптика биотканей», читаемого автором в течение ряда лет для студентов и аспирантов Саратовского госуниверситета, а также ежегодных кратких курсов лекций по биомедицинской оптике для международной аудитории научных работников, аспирантов, инженеров и медицинского персонала, читаемых автором в США в рамках Международного симпозиума по биомедицинской оптике (Biomedical Optics, 1992–1998).

Монография выпускается как переработанное и дополненное учебное пособие, рекомендованное в 1993 году Комитетом по высшей школе Миннауки России в качестве учебного пособия для студентов высших учебных заведений, обучающихся по направлениям «Физика», «Биология» и специальностям «Оптика и спектроскопия», «Биофизика» и «Биотехнические и медицинские аппараты и системы».

Оригинальные материалы, вошедшие в монографию, были получены при финансовой поддержке гранта РФФИ «Ведущие научные школы» №96-15-96389, гранта RB1-230 CRDF USA – Russia, а также гранта №372p Международной соросовской программы образования в области точных наук.

Автор благодарен Российскому фонду фундаментальных исследований, без финансовой поддержки которого книга не увидела бы свет.

Выражаю также глубокую благодарность А. В. Приезжеву, всем своим коллегам, особенно Д. А. Зимнякову, И. Л. Максимовой, А. Б. Правдину, Ю. П. Синичкину, С. Р. Утцу, С. С. Ульянову и И. В. Ярославскому, за совместную работу, обсуждение и ценные замечания, С. П. Черновой и О. А. Перепелицыной за огромную помощь в оформлении рукописи и подготовку макета книги, а также всем, кто прислал от-

тиски своих работ, материалы которых использованы в книге, особенно А. А. Ораевскому, А. Я. Хайруллиной, М. J. C. van Gemert, J. R. Lakowicz, H. J. C. M. Sterenborg, J. R. Zip, S. L. Jacques, R. G. Johnston, J. Greve, R. M. Verdaasdonk, S. M. Khanna, Y. Aizu, R. Navarro, M. S. Patterson, B. Ruth, G. Mueller, H. Rinneberg, R. L. McCally, J. D. Briers, B. Chance, A. Yodh, M. Keijzer, W. M. Star, A. J. Welch, L. O. Svaasand, P. Rol, M. A. DellaVecchia, B. Pierscionek, M. Ferrari, A. Knuttel, E. Gratton, A. F. Fercher, B. R. Masters, W. P. van de Merwe, S. E. Braslavsky, Y. Ozaki, A. Bertoluzza, N.-T. Yu, J. M. Schmitt.

И наконец, что не менее важно, я благодарен моей жене и семье за исключительное терпение.

Предисловие ко второму изданию

Первое издание настоящей книги появилось уже более 10 лет тому назад [11], за это время в мире было издано более 30 книг, относящихся к различным аспектам лазерной биомедицины [12–41], что свидетельствует о бурном развитии этой отрасли науки и ее приложений. В последнее время в России также было выпущено несколько монографий и практических руководств, в которых обсуждаются различные аспекты взаимодействия лазерного и когерентного излучения от других источников с биологическими тканями [13, 21, 24–26, 29, 31]. В них также описаны медицинские применения лазерных и когерентно-оптических методов и аппаратуры. Каждая из названных книг детально анализирует конкретную проблему в области биологии или медицины. Например, книга Лопатина и др. [24] является фундаментальной монографией, в которой обобщены исследования закономерностей взаимодействия электромагнитного излучения с оптически мягкими частицами различной формы и структуры с целью совершенствования схем решения обратных оптических задач методами интегральной и «пролетной» индикатрис однократного светорассеяния на основе полученных аналитических связей. Монография, вышедшая под редакцией Баграташвили и др. [25], обобщает последние достижения в области фотомодификации хрящевой ткани и, по сути, является хорошим полным справочником по указанной проблеме. Руководство по оптической когерентной томографии Гладковой и др. [29] является также справочным пособием, исчерпывающим проблему на сегодняшний день. Все эти книги решают конкретные медицинские проблемы с глубокой проработкой и анализом теоретических и экспериментальных исследований. Книга Тучина «Оптическая биомедицинская диагностика» [13] является переводной коллективной монографией, в которой обсуждается широкий круг вопросов, связанных с оптической медицинской диагностикой, изложенных различными авторами и в основном по результатам их собственных исследований. Книга Тучина «Оптика биологических тканей: методы рассеяния света в медицинской диагностике» [31] является переводом монографии, вышедшей в США вторым изданием, в которой обсуждаются фундаментальные основы оптики биологических тканей в приложении к медицинской диагностике.

Второе издание книги «Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях» [11] отличается от предыдущего существенной переработкой той части, в которой обсуждаются фундаментальные проблемы распространения и взаимодействия света (лазерного излучения) с биологическими тканями. Для усиления именно этого аспекта книги во втором издании одна большая глава по описанию взаимодействия оптического излучения с биотканями преобразована в три главы, в каждой из которых излагаются определенные фундаментальные проблемы взаимодействия света с биологическими объектами. Изложение фундаментальных вопросов, как правило, сопровождается представлением практических приложений для биомедицинских исследований.

Со времени первого издания книги автор и его коллектив активно работали в области поляризационной оптики биотканей, управления оптическими свойствами биотканей и крови, развития методов измерения оптических параметров биотканей, а также развития методов когерентной оптики для исследования статических и динамических характеристик живых объектов с приложениями в биомедицинской диагностике и терапии. По каждому из этих направлений опубликованы многочисленные

оригинальные научные статьи, обобщающие обзорные работы, выпущены специальные выпуски журналов. Все материалы хорошо апробированы на крупных международных конференциях, где автор выступал с пленарными или приглашенными докладами. Некоторые из наиболее интересных результатов, имеющих фундаментальное значение, вошли во второе издание книги.

В новой редакции книги расширено изложение таких важных разделов, как взаимодействие когерентного и поляризованного излучения с биологическими тканями; включены новые разделы, описывающие линейную флуоресценцию биологических объектов, многофотонную флуоресцентную микроскопию и визуализацию тканей и клеток, микроскопию на основе генерации второй гармоники, цифровую голографическую интерферометрию, оптическую когерентную томографию, лазерные источники терагерцового излучения, методы спектроскопии биотканей в терагерцовом диапазоне, а также цитометрию *in vivo* с использованием фототермического и фотоакустического эффектов.

Некоторые разделы настоящей книги являются основой специальных курсов лекций «Оптика биотканей», «Медицинские лазеры и волоконные световоды» и «Оптические измерения в биомедицине», разработанных и читаемых автором в течение ряда лет для студентов, магистров и аспирантов Саратовского госуниверситета. Материалы книги были апробированы при чтении кратких курсов лекций по оптике биотканей и оптическим измерениям в биомедицине для международной аудитории научных работников, аспирантов, инженеров и медицинского персонала, читаемых автором в Европе, США, Канаде и Корее в рамках международных научных школ и конференций.

Оригинальные материалы, вошедшие в монографию, были получены при финансовой поддержке многих грантов и научных программ, таких как гранты РФФИ и Президента РФ «Поддержка научных школ» 00-15-96667, 25.2003.2, НШ-208.2008.2; программа «Ведущие научно-образовательные коллективы», гранты 2.11.03, 1.4.09 Министерства образования РФ; исследовательские и международные гранты РФФИ 98-02-17997, 03-02-17359, 05-08-50318-а, 06-02-16740-а, 08-02-92224-ГФЕН_а; ФНТП по приоритетным направлениям науки и технологий, контракт № 40.018.1.1.1314 Министерства промышленности, науки и технологий РФ; РНП «Развитие потенциала высшей школы» Федерального агентства по образованию РФ, 2.1.1.4473, 1.4.06, 2.1.1/4989, 2.2.1.1/2950; ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. (контракты: 02.740.11.0484, 02.740.11.0770, 02.740.11.0879); CRDF REC-006; CRDF Next Step to the Market Program, RUB1-570-SA-04; CRDF BP1M06 RUX0-006-SR-06; CRDF RUB1-2932-SR-08; гранты Королевского общества, 2002–2006; Европейский проект по программе FP-7, PHOTONICS4LIFE, Network of Excellence for Biophotonics, IST-2007.3.5, № 224014.

Автор благодарен Российскому фонду фундаментальных исследований за финансовую поддержку второго издания книги.

Выражаю глубокую благодарность В. Н. Баграташвили за предложение подготовить второе издание книги, Г. Б. Альтшулеру, В. П. Жарову, А. В. Приезжеву, М. М. Назарову и всем своим коллегам по Саратовскому университету и Институту проблем точной механики и управления РАН, особенно Г. Г. Акчурину, А. Н. Башкатову, Е. И. Галанжа, Э. А. Гениной, Д. А. Зимнякову, В. И. Кочубею, К. В. Ларину, И. Л. Максимовой, И. В. Меглинскому, А. Б. Правдину, В. П. Рябухо, Ю. П. Синичкину, Г. В. Симоненко, Ю. С. Скибиной, И. В. Федосову, И. В. Ярославскому, А. Н. Ярославской, О. С. Жерновой, а также многочисленным зарубежным коллегам, особенно Qingming Luo, Ricky Wang, Lihong Wang, Stoyan Tanev за совместную работу, обсуждение и ценные замечания.

Я благодарен моей жене и всей семье за исключительное терпение и понимание.

Глава 1

ОСНОВЫ ЛАЗЕРНОЙ БИМЕДИЦИНЫ

1.1. Введение

Современные медицинские технологии базируются на фундаментальных исследованиях в физике, математике, химии и биологии. Хорошими примерами являются последние достижения в области медицинской томографии [1, 21]: например, компьютерная рентгеновская томография и магнитно-резонансная визуализация обеспечивают получение анатомической информации с большим разрешением в двух- и трехмерном измерениях, более того, помимо структурных данных, магнитно-резонансная спектроскопическая визуализация, так же как и позитронная эмиссионная томография, позволяет локально регистрировать метаболическую информацию и, тем самым, изучать локальные физиологические процессы. Значительные перспективы, с точки зрения безопасности, простоты и надежности устройств, а также получения надежной информации о физиологических процессах, имеют оптическая диффузионная томография [1, 12, 13, 31, 32, 41] и оптическая когерентная томография [12, 13, 16, 21, 29, 31, 32].

Другой не менее важный пример относится к развитию лазерных технологий терапии рака и других заболеваний [2, 3]. В общем случае применение лазеров в медицинских исследованиях основано на использовании широкого круга явлений, связанных с разнообразными эффектами взаимодействия света с биологическими объектами [1–160].

В настоящей книге представлены результаты теоретических и экспериментальных исследований оптических свойств биотканей, описание которых проводится на основе фундаментальных оптических явлений, таких как упругое и квазиупругое (статическое и динамическое) рассеяние, дифракция и интерференция оптических полей и волн фотонной плотности (волн интенсивности). Эти результаты являются принципиальными как для понимания процессов распространения света (лазерных пучков) в рассеивающих средах с поглощением, так и для развития новых оптических медицинских технологий диагностики заболеваний и их лечения.

С оптической точки зрения, биоткани (включая и биожидкости: кровь, лимфу и пр.) можно разделить на два больших класса: 1 — сильно рассеивающие (оптически мутные), такие как кожа, мозг, стенка сосуда, кровь, склера, оптические свойства которых могут быть достаточно хорошо описаны в модели многократного рассеяния скалярных волн в случайно-неоднородной среде с поглощением; 2 — слабо рассеивающие (прозрачные), такие как ткани переднего отрезка глаза (роговица, хрусталик), оптические свойства которых описываются в модели однократного (или малократного) рассеяния упорядоченной среды с плотной упаковкой рассеивателей, которые содержат поглощающие центры [1–3, 5, 13, 30–32, 57, 161–163].

Однако скалярное приближение является недостаточным, так как не учитывает векторную природу падающих и рассеянных волн; особенно это существенно для прозрачных тканей. В рассеивающей среде векторный характер волн проявляется как возникновение поляризации у первоначально неполяризованного пучка света или как

деполяризация при распространении в среде первоначально поляризованного пучка [3, 5, 13, 19, 27, 31, 32, 57, 76, 123, 164–171].

В задачах оптической диагностики и спектроскопии биотканей, а также дозиметрии света в локализованных объемах ткани следует различать два режима облучения: непрерывный (может быть квазинепрерывный, если используются длинные часто повторяющиеся импульсы) и с разрешением во времени (когда длительность импульса соизмерима с временем пролета фотона между актами взаимодействия со средой (рассеяние или поглощение) или длительностью элементарного акта взаимодействия) [1–3, 13, 18, 30–32, 43–45, 62, 64, 92, 95–98, 161, 162]. Режим с разрешением во времени может быть реализован как путем облучения рассеивающего объекта короткими лазерными импульсами ($\tau \cong 10^{-9}$ – 10^{-11} с) и приема уширенных импульсов рассеянного излучения — так называемый временной подход (time-domain), так и путем облучения модулированным по интенсивности светом на частотах в диапазоне 100 МГц — 10 ГГц и регистрации глубины модуляции интенсивности рассеянного излучения и соответствующего сдвига фазы на частотах модуляции — так называемый частотный (или фазовый) подход (frequency-domain). Возможна и комбинация, когда облучение импульсное, а прием частотный (или фазовый) с разложением по отдельным гармоникам модуляции интенсивности рассеянного поля. Фундаментальная основа режима с временным разрешением состоит в возбуждении в сильно рассеивающей среде спектра волн фотонной плотности, что может быть описано в рамках нестационарной теории переноса излучения (ТПИ), в то время как режим непрерывного облучения описывается в рамках стационарной ТПИ [1–3, 13, 18, 30–32, 45, 91, 92, 96, 161–163].

Поскольку по многим причинам, как фундаментального характера, так и технического, фотомедицинские технологии используют лазерное излучение, то вопросы когерентности имеют важное значение при рассмотрении взаимодействия света с биотканью (рассеивающей средой). Эта проблема также может быть представлена, с одной стороны, как потеря когерентности за счет рассеяния света в случайно-неоднородной среде с многократным рассеянием, с другой стороны, как появление усиленной когерентной узконаправленной составляющей в обратно рассеянном излучении при зондировании биоткани лазерным импульсом сверхкороткой длительности [1, 3, 13, 19, 31, 64, 172, 173]. Узкая локализация обратно рассеянного света и его усиление обусловлено интерференцией рассеянного импульса со своим «двойником», возникающим при обратном ходе импульса в случайной среде.

Когерентность света оказывается принципиальной при селекции фотонов, не испытавших совсем или испытавших малое число актов рассеяния, а также при получении спекл-модулированных полей от рассеивающих фазовых объектов с однократным и многократным рассеянием [1, 3, 19, 174–176]. Такие подходы важны для когерентной томографии, фотон-корреляционной спектроскопии и спекл-интерферометрии биотканей и потоков биожидкостей [1, 3, 5, 13, 16, 18, 19, 21, 22, 27–34, 47, 78, 98, 101, 103–106, 111–121, 125, 128, 142, 156, 174–182]. Использование световых источников с малой длиной когерентности открывает новые возможности в когерентной интерферометрии и томографии биотканей и органов [1, 3, 13, 16, 19, 21, 29, 31–33, 47, 78, 101, 104, 106, 111–113, 116, 117, 120, 121, 125, 142, 183].

Хорошо известно, что свет ближнего инфракрасного (ИК) диапазона может проникать на несколько сантиметров в глубь биоткани, что связано с отсутствием в живой биоткани сильных собственных хромофоров, поглощающих свет в этом диапазоне длин волн. Это очень важно для просвечивания объемных органов человека (мозг, молочная железа и пр.). Однако рассеяние ИК-излучения биотканями оказывается еще достаточно сильным, несмотря на падающую с длиной волны зависимость, что затрудняет получение четких изображений сильно поглощающих (или сильно

рассеивающих), по сравнению с фоном, неоднородностей, возникающих в ткани за счет различных патологий, например образования опухоли, локального увеличения объема крови за счет кровоизлияния или разрастания микрососудов. Поэтому в оптической томографии важна разработка методов селекции фотонов, несущих изображение в сильно рассеивающей среде. Такие методы могут быть построены только на основе фундаментальных исследований распространения света в рассеивающих средах с поглощением [1, 3, 13, 18, 19, 27, 30–34, 57, 64, 75, 161–163, 184].

Другое важное направление, в котором часто бывает необходимо глубинное зондирование биоткани, — это отражательная спектроскопия ткани, например пульсовая оксиметрия, служащая для определения изменения степени оксигенации гемоглобина крови в работающей мышечной ткани, в головном мозге новорожденных с патологией или взрослых, в процессе активной деятельности мозга [1–3, 13, 17, 18, 30–32, 45, 88, 91–97, 135, 161–163, 185].

Конечно же, все многообразие оптических медицинских технологий не сводится лишь к использованию ближнего ИК-излучения. Ультрафиолетовое (УФ), видимое, среднее и дальнее ИК-излучения находят свои конкретные применения как в медицинской диагностике, так и терапии (в данном случае нас интересует в основном дозиметрический аспект). Поэтому для ряда задач особенности взаимодействия света различных длин волн с биотканями рассматривают с точки зрения взаимодействия света с рассеивающими средами, игнорируя и фотохимическое, и тепловое действие света, а также переизлучение света в виде флуоресценции, считая, что уход энергии по этим каналам очень мал по сравнению с объемной плотностью энергии фотонов, циркулирующих в биоткани. В принципе, при решении конкретных задач указанные процессы могут быть учтены в виде изменения оптических параметров биотканей под действием распространяющегося в среде света [2, 3]. С другой стороны, те же процессы лежат в основе хорошо продвинутых в биомедицине методов лазерной диагностики, таких как флуоресцентная и калориметрическая спектроскопия, или в основе методов лазерной фототерапии, которые также будут рассмотрены в этой и последующих главах.

В настоящей главе представлено обсуждение характера взаимодействия лазерного излучения с живыми объектами, особенностей строения биологических тканей и клеток, определяющих рассеяние, поглощение и переизлучение распространяющегося в них света. Описываются также виды фотовоздействий на биоткань, лежащие в основе лазерной терапии и хирургии. Многочисленные примеры применения лазеров в биомедицинской диагностике, терапии и хирургии сопровождаются обсуждением проблем и перспектив лазерных биомедицинских технологий.

1.2. Виды взаимодействия лазерного излучения с живыми объектами

Лазерное излучение, так же как и обычный свет, может поглощаться, отражаться, рассеиваться, переизлучаться биологической средой; и каждый из указанных процессов несет информацию о микро- и макроструктуре этой среды, движении и форме отдельных ее составляющих (рис. 1.1). Видимый и ультрафиолетовый свет могут оказывать фотобиохимическое действие (примером является механизм зрения).

Световое излучение — от ультрафиолетового (УФ) до инфракрасного (ИК) — обладает большей специфичностью по отношению к биологическим системам, чем коротковолновое рентгеновское и γ -излучение или длинноволновое электромагнитное излучение радиодиапазона, что связано с большим разнообразием процессов взаимодействия света с молекулами (диссоциация, электронное возбуждение, колебательное

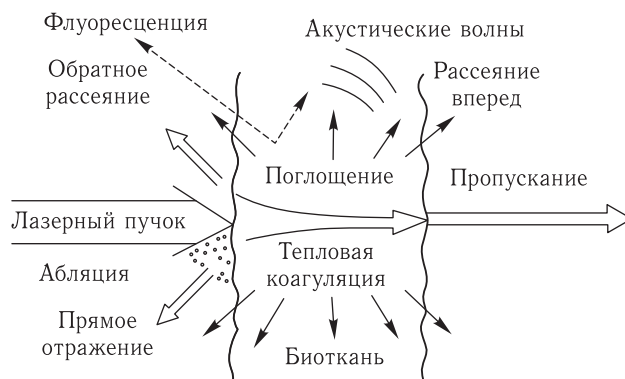


Рис. 1.1. Виды взаимодействия лазерного излучения с биотканью [62, 89]

или вращательное возбуждение) (рис. 1.2). Фотоны малых энергий (далее ИК и терагерцовое излучение, излучение крайне высоких частот (КВЧ) и сверхвысоких частот (СВЧ) радиодиапазона) могут оказывать селективное действие на некоторые биомолекулы и их комплексы с окружением, например за счет возбуждения вращательных уровней, механических колебаний макромолекул или акустических колебаний в клеточных мембранах, но в основном их действие неспецифическое и сводится к тепловому. Фотоны рентгеновского и более коротковолнового излучения имеют настолько высокую энергию, что могут с одинаковой эффективностью ионизировать любую молекулу, входящую в состав сложноорганизованной биологической материи, поэтому их взаимодействие с молекулами не зависит от химической природы молекул.

Лазерное излучение умеренной интенсивности оказывает неспецифическое тепловое, а высокой интенсивности — разрушающее (деструктивное) действия на биообъекты, т. е. проявляет себя как электромагнитное излучение любой другой природы. В отличие от нелазерных источников света тепловое действие и фоторазрушение могут быть осуществлены в очень малых объемах (в пределах клетки или даже ее частей).

Таким образом, процессы, характеризующие взаимодействие лазерного излучения с биообъектами, можно разделить на три группы. К первой группе относятся все невозмущающие процессы (по крайней мере, не оказывающие заметного действия на биообъект), ко второй — процессы, в которых проявляется фотохимическое или тепловое действие, и к третьей — процессы, приводящие к фоторазрушению (абляция, фотокоагуляция) (см. рис. 1.1).

Поскольку мы имеем дело с живыми объектами, то помимо физико-химических проявлений светового излучения необходимо учитывать влияние света на функционирование живой материи, определяющееся степенью гомеостаза живого объекта. Степень гомеостаза является функцией эволюционного развития и оказывается наименьшей у биологических молекул и наивысшей у позвоночных животных. Излучение малой интенсивности не запускает адаптационные механизмы биосистемы, т. е. не затрагивается ее гомеостаз. При небольшом увеличении интенсивности происходят лишь возмущения локального гомеостаза, и не во всяких исследованиях они обнаруживаются. Рост интенсивности включает общие адаптационные и регуляторные механизмы живого объекта, полностью восстанавливающие систему, если интенсивность не слишком велика. При дальнейшем увеличении интенсивности они уже не справляются с полным восстановлением системы и происходят частично необратимые

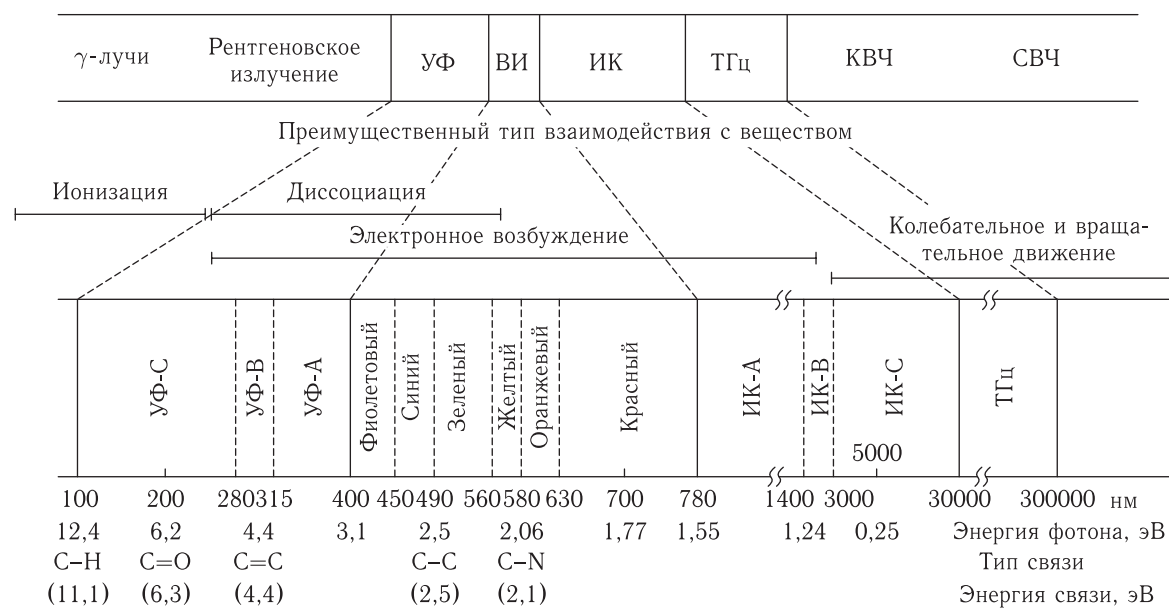


Рис. 1.2. Шкала электромагнитных волн и типы взаимодействий излучения с веществом (УФ — ультрафиолетовое излучение, ВИ — видимое излучение, ИК — инфракрасное излучение, ТГц — терагерцовый диапазон частот, КВЧ — крайне высокие частоты радиодиапазона, СВЧ — сверхвысокие частоты радиодиапазона) [30, 62, 75, 89]

процессы. Такие необратимые изменения нарастают, и происходят разрушения в системе, но объект можно еще считать «живым». В области очень больших интенсивностей разрушения оказываются настолько значительными, что объект уже не может считаться «живым».

Таким образом, при сравнительно малых интенсивностях оказывается возможным с помощью света изучать процессы, происходящие в живом объекте, не внося серьезных возмущений в его поведение. Представляет интерес область очень малых интенсивностей, в которой возможно применение ряда наиболее чувствительных методов исследования, не требующих сильных световых потоков и, следовательно, не вносящих искажений в результаты измерений за счет гомеостаза живой материи даже на локальном уровне. В области очень больших интенсивностей измерения также оказываются неискаженными за счет регуляторных механизмов биосистемы, поскольку она уже «неживая», однако исследователь в данном случае имеет дело лишь с органической материей, состав и свойства которой соответствуют моменту прекращения жизнедеятельности.

Важно ввести количественные критерии, которые могли хотя бы грубо определять уровень высокой и низкой (для функционирования живого организма) интенсивности. При этом важно сравнивать интенсивности света лазерного и нелазерного, используемого в том или ином исследовании. В зависимости от условий эксперимента такое сравнение следует вести либо по параметрам плотности мощности (интенсивности) ($\text{Вт}/\text{см}^2$) или энергии ($\text{Дж}/\text{см}^2$) светового излучения, падающего на объект, либо по параметрам спектральной плотности мощности ($\text{Вт}/(\text{см}^2 \cdot \text{нм})$) или энергии ($\text{Дж}/(\text{см}^2 \cdot \text{нм})$). Для ориентировки можно считать пороговыми параметрами для низкоинтенсивного излучения параметры излучения естественного светила — Солнца. Интегральная плотность мощности излучения Солнца в зените в диапазоне 250–2500 нм составляет $85 \text{ мВт}/\text{см}^2$, а спектральная плотность в максимуме кривой излучения на $\lambda = 500 \text{ нм}$ — $0,15 \text{ мВт}/(\text{см}^2 \cdot \text{нм})$ (рис. 1.3).

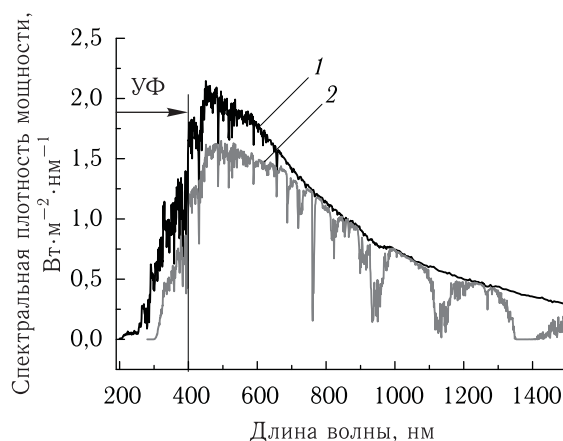


Рис. 1.3. Спектр солнечного излучения выше атмосферы (1) и на уровне моря (2) [186]

Для взаимодействия света с биологическими объектами являются важными время облучения, режим облучения (непрерывный или импульсный), периодичность и длительность процессов. В этом также может проявить себя гомеостазная природа живой материи. В зависимости от длины волны и интенсивности света пороговая длительность облучения, при которой начинают происходить морфологические изменения, может быть весьма различной для одного и того же объекта, т. е. для живого объекта

произведение интенсивности на время облучения не является константой. В зависимости от периодичности световых импульсов возможны резонансные явления в области частот, соответствующих периоду колебаний фотоотклика биологических систем, который изменяется в пределах от 10^{-3} до 10^3 с.

Следует отметить, что сложность исследования поведения биологических систем заключается в том, что из-за включения адаптационных и регуляторных механизмов их отклик является нелинейным даже при очень малых интенсивностях света.

1.3. Структура биологических тканей и клеток

Морфологическое разнообразие биотканей определяет различный характер прохождения света через них. Размеры клеток и структурных элементов клеток и соединительной биоткани лежат в диапазоне от нескольких десятков нанометров до сотен микрометров [13, 25, 31, 188]. Например, клетки крови (эритроциты, лейкоциты и тромбоциты) имеют следующие параметры: нормальный эритроцит в плазме имеет форму вогнуто-вогнутого диска диаметром от 7,1 до 9,2 мкм, толщиной 0,9–1,2 мкм в центре и 1,7–2,4 мкм на периферии и имеет объем порядка 90 мкм^3 ; лейкоциты по форме близки к сфере и имеют широкий разброс по диаметрам, 8–22 мкм; тромбоциты в потоке крови представляют собой двояковыпуклые дискообразные частицы диаметром от 2 до 4 мкм. В норме кровь содержит $(4-5) \cdot 10^6 \text{ мм}^{-3}$ эритроцитов, что примерно в 10–20 раз больше, чем тромбоцитов, которых порядка $(2-3) \cdot 10^5 \text{ мм}^{-3}$, и $(4-9) \cdot 10^3 \text{ мм}^{-3}$ лейкоцитов, что примерно в 30–50 раз меньше, чем тромбоцитов.

Большинство других клеток млекопитающих имеют диаметры 5–75 мкм. В эпидермальном слое клетки большие (со средней площадью сечения 80 мкм^2) и весьма однородны по размеру. Жировые клетки, каждая из которых содержит одну капельку липидов, заполняющую почти всю клетку, что приводит к эксцентрическому расположению цитоплазмы и ядра, сильно различаются по диаметру, который может быть от нескольких микрометров до 50–75 мкм. При патологиях жировые клетки могут достигать в диаметре 100–200 мкм.

Внутри клеток имеются разнообразные структуры, определяющие рассеяние света тканью. Ядра клеток имеют диаметр порядка 5–10 мкм, митохондрии, лизосомы и пероксисомы — порядка 20 нм, а структуры внутри различных органелл могут иметь размер до нескольких сотен нанометров. Как правило, рассеивающие элементы внутри клеток не обладают сферической формой. Более типична здесь модель вытянутых эллипсоидов с отношением осей от 2 до 10.

Полые органы тела выстланы тонким слоем эпителиальной ткани с выраженной клеточной структурой, который поддерживается нижележащим слоем относительно бесклеточной соединительной ткани — стромы. В здоровых тканях эпителий часто состоит из одного хорошо организованного слоя клеток, у которых диаметр части, обращенной к поверхности, составляет 10–20 мкм, а высота 25 мкм. При дисплазии клетки эпителия пролиферируют, их ядра увеличиваются и выглядят темнее при окрашивании (гиперхроматичность) [189]. Увеличенные ядра являются главными индикаторами рака, дисплазии и регенерации клеток в большинстве тканей человека.

Верхний защитный слой кожи человека — эпидермис также относится к эпителиальным тканям с живыми клетками, начиная от границы дерма–эпидермис, где находятся базальные клетки (*stratum basale*), вплоть до рогового слоя (*stratum corneum*), где клетки уже мертвые (рис. 1.4) [190]. Клетки рогового слоя сильно уплощены, содержат много кератина и плотно примыкают друг к другу, представляя собой защитный экран от внешних механических и химических повреждений.

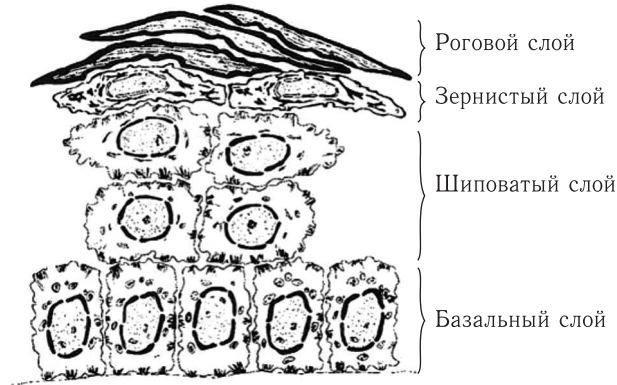


Рис. 1.4. Структура эпидермиса (эпителиального слоя) кожи [190]

В волокнистых (соединительных) тканях, содержащих слои волокон (роговица, склера, твердая мозговая оболочка (*dura mater*), мышца, миокард, сухожилие, хрящ, стенка сосуда, слой нервных волокон сетчатки глаза и т. п.), которые состоят, в основном, из микрофибрилл и/или микротубул, типичный диаметр цилиндрических структурных элементов составляет 10–400 нм. Их длина может быть от 10–25 мкм до нескольких миллиметров.

Для артерии доминирующими в рассеянии могут быть волокна, клетки или субклеточные органеллы. Мышечные артерии имеют три основных слоя. Внутренний слой состоит из клеток эндотелия со средним диаметром менее 10 мкм. Средний слой состоит, главным образом, из плотно упакованных клеток гладкой мышцы со средним диаметром 15–20 мкм; в этом слое также содержится небольшое количество соединительной ткани, включающей эластин, коллагеновые и ретикулиновые волокна, а также немного фибробластов. Наружный адвентициальный слой состоит из плотной фиброзной соединительной ткани, которая образована, главным образом, коллагеновыми волокнами диаметром до 10–12 мкм и более тонкими эластиновыми волокнами диаметром 2–3 мкм.

Два других примера сложных рассеивающих структур — это миокард и слой нервных волокон сетчатки. Миокард состоит, в основном, из сердечной мышцы, образованной миофибриллами (мышечными волокнами диаметром около 1 мкм), которые, в свою очередь, состоят из цилиндрических миофиламентов (мышечных нитей диаметром 6–15 мкм) и асферических митохондрий диаметром 1–2 мкм. Слой нервных волокон сетчатки содержит пучки безмиелиновых аксонов, которые проходят по поверхности сетчатки. Цилиндрические органеллы слоя нервных волокон сетчатки — это мембраны аксонов, микротубулы, нервные волокна и митохондрии. Мембраны аксонов, как и все клеточные мембраны, представляют собой тонкие (6–10 нм) фосфолипидные двойные слои, которые образуют цилиндрические оболочки, заключающие в себе аксонную цитоплазму. Аксонные микротубулы — длинные трубчатые полимеры белка тубулина с внешним диаметром ≈ 25 нм, внутренним диаметром ≈ 15 нм и длиной 10–25 мкм. Нейрофиламенты — стабильные белковые полимеры с диаметром ≈ 10 нм. Митохондрии — эллипсоидальные органеллы, которые содержат плотно связанные перепонки из липидов и белков. Они имеют толщину 0,1–0,2 мкм и длину 1–2 мкм.

Мягкая ткань состоит из плотно упакованных групп клеток и сети из волокон, через которую просачивается межтканевая (межклеточная) или интерстициальная жидкость. В микроскопическом масштабе компоненты биоткани не имеют четких

границ. Они сливаются в непрерывную структуру с пространственно меняющимся показателем преломления.

Поскольку лазерное излучение довольно эффективно используется в стоматологии [59], рассмотрим особенности строения зубной ткани с точки зрения прохождения света через нее [145, 191–200]. В твердой части зуба различают эмаль и дентин. Эмаль покрывает коронку зуба. Она построена из эмалевых призм с поперечным размером 4–6 мкм. Призмы располагаются пучками, имеют извитой характер и залегают почти перпендикулярно к поверхности дентина. Между призмами находится менее обызвествленное склеивающее вещество (эмалевая жидкость, составляющая 0,2% объема эмали). Эмаль является сравнительно прозрачной тканью, поэтому оптические свойства зуба (поглощение, рассеяние, цвет) определяются, в основном, дентином.

Дентин образует большую часть коронки, шейки и корня зуба и построен из основного вещества, пронизанного канальцами (тубулами). Канальцы берут начало в пульпе, около внутренней поверхности дентина, и, веерообразно расходясь, заканчиваются на его наружной поверхности. Некоторые канальцы проникают в эмаль. Внутренний слой стенки дентиновых канальцев содержит много минерализованных, по сравнению с остальным веществом дентина, волокон (рис. 1.5 [195, 196]). Внутренний диаметр дентиновых канальцев составляет 1–3 мкм, по некоторым данным 1,58 ($\pm 0,28$) мкм [145], а плотность колеблется в широком диапазоне $(0,5–9,0) \cdot 10^6 \text{ см}^{-2}$, однако наиболее вероятно более узкое распределение $(0,8–5,7) \cdot 10^6 \text{ см}^{-2}$ [197], или по другим данным $(1,5–6,5) \cdot 10^6 \text{ см}^{-2}$ со средним значением $\sim 3,5 \cdot 10^6 \text{ см}^{-2}$ [145]. Вариации размеров тубул и их плотности зависят от локализации в зубе и могут быть связаны с некоторыми патологиями.

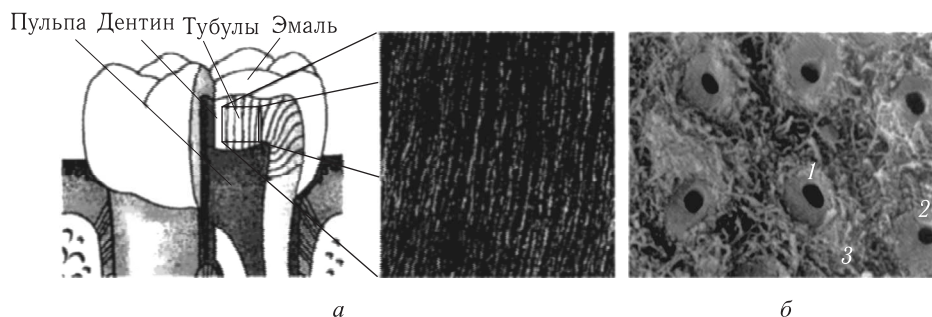


Рис. 1.5. Схематическое представление зуба, включая дентинные канальцы — тубулы (а); изображение тубул, полученное с помощью лазерной сканирующей микроскопии (размеры изображения: $\sim 90 \times 90$ мкм) (б) [195]; сканирующая электронная микрограмма дентина человека; хорошо видны дентиновые тубулы (канальцы) (1), более плотный и однородный перитубулярный дентин (2) и менее плотный и менее однородный межтубулярный дентин (3) (в) [196]

Тубулы окружены перитубулярным дентином с диаметром $3,0 (\pm 1,8)$ мкм и высоким содержанием минералов порядка $90 (\pm 6) \%$ по объему. Между тубулами с окружающим их перитубулярным дентином находится межтубулярный дентин с меньшим содержанием минерального компонента, порядка $40 (\pm 6) \%$ по объему. Межтубулярный дентин состоит на 90% по объему из коллагеновых волокон (фибрилл) с встроеными кристаллами минералов и на 10% по объему из межфибрилярного дентина. Тропоколлагеновые молекулы в фибриллах представляют собой образования сильно вытянутой формы с размерами $280 \times 1,5$ нм с молекулярным весом $\sim 360\,000$. Фибриллы с диаметром порядка 50–150 нм распределены в дентине с более или

менее случайной ориентацией. Кроме тубул все составляющие содержат минеральные иглообразные кристаллы гидроксиапатита диаметром 2,0–3,5 нм и выше, до ~ 5 нм, и длиной ~ 20 нм и выше, вплоть до 100 нм. В видимой области показатель преломления гидроксиапатита $\approx 1,62$ (см. табл. 1.1).

Таблица 1.1. Измеренные *in vitro* средние значения фазового n или группового n_g показателей преломления тканей зуба и их составляющих; в скобках даны значения среднеквадратичного отклонения

| Ткань зуба | λ , нм | n, n_g | Источник |
|-----------------|----------------|--------------------|----------|
| Эмаль | 220 | $n = 1,73$ | [204] |
| Эмаль | 400–700 | $n = 1,62$ | |
| Гидроксиапатит | 400–700 | $n \geq 1,623$ | |
| Матрикс дентина | 400–700 | $n = 1,553(0,001)$ | [198] |
| Эмаль | 856 | $n_g = 1,62(0,02)$ | [199] |
| Дентин | 856 | $n_g = 1,50(0,02)$ | |
| Эмаль | 850 | $n_g = 1,65$ | [200] |
| Дентин | 850 | $n_g = 1,54$ | |

Итак, основными поглотителями в дентине являются белковоподобные молекулы, а рассеивателями — кристаллы гидроксиапатита.

Таким образом, строение зуба представляет собой пучки согласованных природных световодов. Извитая форма световодов определяет высокую эффективность освещения пульпы практически независимо от того, каким образом свет попадает на внешнюю поверхность зуба. Свет, падая на поверхность эмали, рассеивается на неоднородностях и частично захватывается оптическими волноводами, роль которых в эмали выполняют эмалевые призмы, а в дентине — область дентина между канальцами (см. гл. 7). Такие природные волноводы обеспечивают эффективный транспорт световой энергии от поверхности эмали к пульпе. Каждая точка поверхности эмали оказывается оптически связанной с вполне определенной точкой полости зуба. Волноводный эффект существенно более выражен в дентине, чем в эмали. Оптические характеристики зуба удовлетворительно описываются в рамках модели волноводно-рассеивающей среды [191, 192].

Рассеяние света на периодических структурах зубной ткани дает информацию о строении ткани. Обычно для этих целей используют шлифы зубной ткани. Однако, как показали исследования рассеяния лазерного излучения с $\lambda = 633$ нм, на периодических структурах дентина (свет направляется поперек дентинных канальцев) существующие теоретические модели дифракции света на оптических неоднородностях дентина не в полной мере описывают экспериментальные результаты. Оптические характеристики дентина и эмали зуба в видимой области существенно отличаются от характеристик мягких биотканей [145, 191–200] (см. табл. 1.2).

Таблица 1.2. Оптические характеристики дентина и эмали зуба на длине волны He–Ne лазера (633 нм) [193]

| Ткань зуба | $\mu_s, \text{см}^{-1}$ | $\mu_a, \text{см}^{-1}$ | g |
|-----------------|-------------------------|-------------------------|------|
| Эмаль быка | 0,54 | 0,97 | — |
| Эмаль человека | 1,1 | 0,97 | — |
| Дентин быка | 2000 | 3,5 | 0,36 |
| Дентин человека | 1200 | 6,0 | 0,44 |

1.4. Рассеяние и поглощение света

Биологические ткани являются оптически неоднородными поглощающими средами со средним показателем преломления большим, чем у воздуха, поэтому на границе раздела биообъект–воздух часть излучения отражается (френелевское отражение), а остальная часть проникает в биоткань. За счет многократного рассеяния и поглощения лазерный пучок уширяется и затухает при распространении в биоткани. Объемное рассеяние является причиной распространения значительной

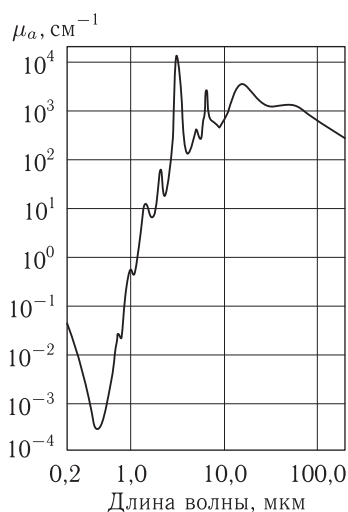


Рис. 1.6. Спектр поглощения воды [89]

доли излучения в обратном направлении (обратное рассеяние) (см. рис. 1.1). Клеточные мембраны, ядра и органеллы, такие как митохондрии, а также гранулы меланина в клетках являются основными рассеивателями для многих биотканей [201–204]. Имеются данные о том, что в зависимости от степени малигнизации (злокачественности) новообразований ткани увеличивается хаотизация клеточных структур, возрастает разброс размеров отдельных клеточных ядер относительно среднего значения, которое также увеличивается от 10–12 мкм в норме до 20–50 мкм для патологических тканей, одновременно может изменяться и относительный показатель преломления ядро — цитоплазма [190]. Все это ведет к изменению характера рассеяния ткани.

Поглощенный свет преобразуется в тепло, преизлучается в виде флуоресценции, а также тратится на фотобиохимические реакции. Спектр поглощения определяется типом доминирующих поглощающих центров и содержанием воды в биоткани (рис. 1.6–1.8) [13, 30–32, 75, 89, 90, 203].

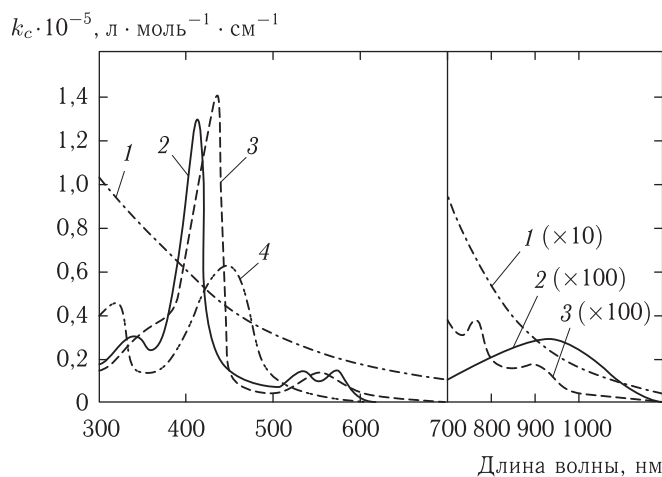


Рис. 1.7. Молярные спектры ослабления растворов основных пигментов кожи человека: 1 — ДОФА-меланин (H_2O); 2 — оксигемоглобин (H_2O); 3 — гемоглобин (H_2O); 4 — билирубин ($CHCl_3$) [90]

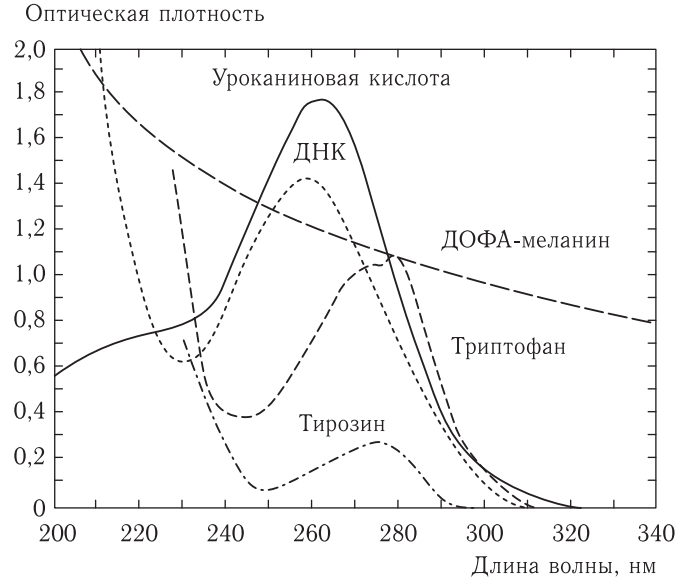


Рис. 1.8. УФ-спектры поглощения эпидермальных хромофоров (ДОФА-меланин, 1,5 мг % в H_2O ; уроканиновая кислота, 10^4 М в H_2O ; ДНК тимуса теленка, 10 мг % в H_2O (рН = 4,5); триптофан, $2 \cdot 10^4$ М (рН = 7)) [90]

Ослабление коллимированного (лазерного) пучка в биоткани происходит по экспоненциальному закону. Интенсивность прошедшего коллимированного света через тонкий образец ткани со значительным поглощением, по сравнению с рассеянием, может быть оценена на основе закона Бугера–Бера:

$$I(z) = (1 - R)I_0 \exp(-\mu_t z), \quad (1.1)$$

где R — коэффициент френелевского отражения при нормальном падении пучка, $R = [(n - 1)/(n + 1)]^2$, n — относительный показатель преломления биоткани; I_0 — интенсивность падающего света; $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ — коэффициент экстинкции (коэффициент взаимодействия или ослабления), μ_a — коэффициент поглощения, μ_s — коэффициент рассеяния; z — толщина образца.

Средняя длина свободного пробега однократно рассеянного фотона в биоткани определяется как $l_{ph} = \mu_t^{-1}$. Абсолютные значения коэффициентов поглощения типичных биотканей лежат в пределах 10^{-2} – 10^4 $см^{-1}$ [1–3, 12, 13, 30–32, 43–45, 49, 69–75, 89, 161, 162, 204–208]. Коэффициенты поглощения для некоторых биотканей, измеренные на отдельных лазерных длинах волн, представлены в табл. 1.2 и 1.3. В УФ- и ИК- ($\lambda \geq 2$ мкм) областях спектра превалирует поглощение, поэтому вклад рассеяния сравнительно мал и свет неглубоко проникает в биоткань, всего на один или несколько клеточных слоев (рис. 1.9). Для коротковолновой видимой области глубина проникновения типичной биоткани составляет 0,5–2,5 мм (падение интенсивности в e раз). В данном случае имеет место как поглощение, так и рассеяние, поэтому около 15–40% падающего излучения отражается на этих длинах волн. Рассеяние несколько уменьшается с увеличением длины волны, но при этом поглощение уменьшается более существенно, так что рассеяние превалирует над поглощением, а, следовательно, глубина проникновения света увеличивается до 8–10 мм в области длин волн 600–1600 нм. Также существенно увеличивается

Таблица 1.3. Коэффициенты поглощения, μ_a , некоторых биотканей, измеренные на отдельных лазерных длинах волн, λ [5, 9, 10, 43–45]

| Биоткань | λ , нм | μ_a , см ⁻¹ | Биоткань | λ , нм | μ_a , см ⁻¹ |
|--|----------------|----------------------------|--|----------------|----------------------------|
| Кровь | 308 | 265 | Атеросклеротическая бляшка в известко- вом состоянии | 249 | 650 |
| Ткань артериаль- ной стенки человека (в норме) | 193 | 10 ⁴ | | 308 | 137 ± 33 |
| | 248 | 10 ³ | | 351 | 118 ± 17 |
| | 308 | 180 ± 16 | | 488 | 42 ± 7,9 |
| | 351 | 145 ± 8,0 | | 532 | 34 ± 3,7 |
| | 488 | 32 ± 4,4 | | 1064 | 7,2 |
| 532 | 30 ± 1,8 | 2940 | | 5000 | |
| Ткань артериаль- ной стенки человека (патология) | 308 | 108 ± 17 | Роговица глаза бычков | 193 | 2700 |
| | 351 | 116 ± 11 | | 248 | 210 |
| | 488 | 25 ± 3,7 | | | |
| | 532 | 37 ± 4,5 | | | |

интенсивность отраженного биотканью излучения (за счет обратного рассеяния), вплоть до 35–70% от падающего. Измеренные *in vivo* значения полного коэффициента отражения (зеркальный и диффузный компоненты) и экспериментальные значения глубины проникновения света для некоторых биотканей на отдельных лазерных и близких им длинах волн представлены в табл. 1.4 и 1.5.

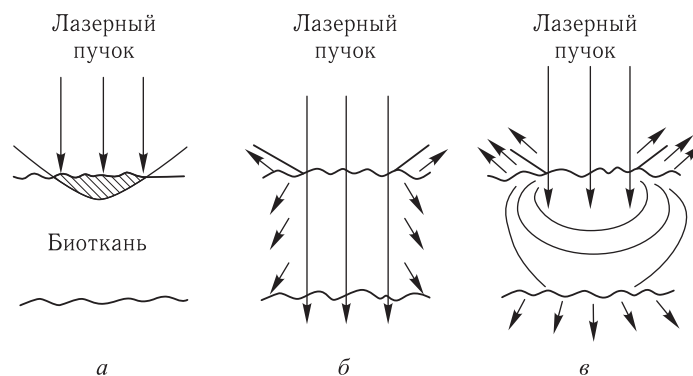


Рис. 1.9. Поглощение и рассеяние лазерного излучения биологическими тканями: а — преобладает поглощение; б — поглощение и рассеяние дают примерно равные вклады; в — преобладает рассеяние [89]

Например, из-за многослойной и многокомпонентной структуры кожи взаимодействие света с ней оказывается весьма сложным [62, 90] (рис. 1.10, 1.11). Роговой слой отражает около 5–7% падающего излучения. Коллимированный пучок света преобразуется в диффузный из-за микроскопических неоднородностей на границе воздух — роговой слой. Большая часть отраженного кожей света образуется за счет обратного рассеяния различными слоями ткани (роговой слой, эпидермис, дерма и микрососудистая система). Поглощение рассеянного света пигментами кожи дает количественную информацию о концентрации билирубина, насыщении гемоглобина кислородом и содержании лекарственных препаратов в ткани и крови, например

Таблица 1.4. Измеренные *in vivo* коэффициенты отражения некоторых биотканей, % (френелевский (зеркальный) и диффузный (рассеянный) компоненты [62, с. 114])

| Тип ткани | λ , нм | Тип ткани | λ , нм | | | |
|--|----------------|--|----------------|-----|-----|------|
| | 1064 | | 488/515 | 630 | 665 | 1064 |
| Кожа руки негра | 44 | Кожа руки европейца | – | – | 45 | 44 |
| Кожа мышцы: линия C57 бестимусная линия C3H | 29 | Кролик пигментированный: мышечная ткань печень селезенка жировая клетчатка | 11 | – | 19 | 23 |
| | 35 | | | | | |
| | 24 | | | | | |
| | 24 | | | | | |
| Мышечная ткань мышь: линия C57 бестимусная | 23 | Меланома пигментная (мышь — линия C57) | 5 | 6 | 8 | 23 |
| | 23 | | | | | |
| Печень мышцы: бестимусная линия C3H | 41 | Ретинобластома человека, перевитая бестимусной мышь: типичная ткань ткань в геморрагической области | 12 | 23 | 19 | 17 |
| | 31 | | | | | |
| Селезенка бестимусной мышь | 25 | Карцинома молочной железы (мышь — линия C3H) | 9 | 25 | 35 | 35 |
| | | Непигментированная меланома Грина передней камеры глаза кролика | 9 | – | 26 | 26 |

Примечание. Типичная относительная ошибка измерений составляет $\pm 0,12$.

фотодинамических красителей, что является основой методов диагностики и терапии ряда заболеваний (см. рис. 1.7). Значительное проникновение видимого и ближнего ИК-света через кожу внутрь организма человека, в области длин волн так называемого терапевтического окна (600–1600 нм, см. рис. 1.11), является основой ряда методов фототерапии. Достаточно высокая прозрачность кожи в длинноволновом УФ-свете (УФА), определяемая спектрами поглощения ДНК, триптофана, тирозина, уроганиновой кислоты и меланина (см. рис. 1.8), позволяет осуществлять ряд методов фотохимиотерапии кожи с использованием УФА-излучения [3, 67, 83, 84, 87, 90].

Другим примером гетерогенно многокомпонентной ткани является молочная железа, которая, в основном, состоит из жировой и фиброзной тканей и сосудистой системы. Полосы поглощения гемоглобина крови, жира и воды ясно видны в спектре, измеренном *in vitro* в слое ткани молочной железы толщиной 3 мм, как показано на рис. 1.12 [209]. Измерение производилось с помощью спектрометра с интегрирующей сферой. Между 700 и 1100 нм имеется широкое окно прозрачности ткани, более узкие окна прозрачности с несколько меньшим пропусканием находятся вблизи длин волн 1300 и 1600 нм.

Таблица 1.5. Глубина проникновения света в биоткань (экспериментальные значения) [9, 43–45, 62]

| Тип ткани | λ , нм | l_p , мм | Тип ткани | λ , нм | l_p , мм | |
|--|---------------------------------|--|---|----------------|------------|-----------|
| Ткани руки человека (<i>in vivo</i>) | 600 | 1,4 | Стенка мочевого пузыря | 633 | 1,9 | |
| | 650 | 2,0 | | 1064 | 5,2 | |
| | 700 | 2,6 | Эпителиальная карцинома мочевого пузыря | 633 | 2,2–2,3 | |
| | 750 | 2,7 | | 1064 | 5,2 | |
| | 800 | 3,0 | Слизистая оболочка бронхов | 633 | 1,1 | |
| | 850 | 3,0 | | | | |
| 900 | 3,0 | | | | | |
| Ткани человека (посмертно) | | | Спавшаяся ткань легких | 633 | 0,9 | |
| Белое вещество мозга подростка | 515 | 0,4–0,6 | Чешуйчатая карцинома легких | 633 | 1,6 | |
| | 660 | 1,2–1,6 | | | | |
| | 1064 | 3,2–4,3 | | | | |
| Мозг новорожденного | 515 | 1,1–1,7 | Стенка аорты: частично обызвествленная в области некротической язвы в норме при ненарушенном кровоснабжении | 515 | 0,2–0,4 | |
| | 660 | 3,7–5,4 | | 633 | 0,7–1,0 | |
| | 1064 | 7,1–8,8 | | | | |
| Астроцитомы | 515 | 0,5–1,3 | | 633 | 0,4 | |
| | 660 | 2,0–3,0 | | 515 | 0,4 | |
| | 1064 | 3,0–6,3 | | 633 | 1,1 | |
| Полиморфная глиобластома | 515 | 1,4 | Жировая ткань, прилегающая к аорте | 515 | 0,7 | |
| | 1064 | 6,6 | | 633 | 1,8 | |
| Овсяно-клеточные метастазы рака легких в мозге | 515 | 0,6 | Измерения <i>in vitro</i> | | | |
| | 660 | 1,3 | Ретинобластома человека, перевитая бестимусной мышью | 600 | 2,9 | |
| | 1064 | 2,8 | | 650 | 3,8 | |
| | | 700 | | 4,0 | | |
| Опухолевые ткани мыши (измерения <i>in vivo</i> с помощью изотропного волоконного датчика) | Ретинобластома бестимусной мыши | 488/ | | 750 | 4,0 | |
| | | 515 | | 1,6 | 800 | 4,1 |
| | | 630 | | 3,3 | 850 | 4,2 |
| | | 665 | | 3,6 | 900 | 4,3 |
| | | 1064 | | 7,5 | 1064 | 5,1 |
| Карцинома молочной железы (линия СЗН) | 488/ | Ткани быка (измерения с помощью волоконного датчика) | Мышечная ткань | 633 | 2,6 ± 0,5 | |
| | 515 | | | 1,1 | 1064 | 4,3 ± 0,9 |
| | 630 | | | 2,0 | | |
| | 665 | | | 2,3 | | |
| В16 пигментированная меланома (линия С57) | 630 | 0,5 | Печень | 633 | 1,5 ± 0,1 | |
| | 665 | 0,5 | | 1064 | 3,1 ± 0,5 | |
| | 1064 | 2,0 | Мозг теленка | 633 | 2,9 ± 0,7 | |
| | | 1064 | | 4,0 ± 0,8 | | |
| В16 пигментированная меланома бестимусной мыши | 650 | 0,28 | Мозг свиньи | 600 | 1,8 | |
| | 700 | 0,34 | | 650 | 2,4 | |
| | 750 | 0,41 | | 700 | 2,9 | |
| | 800 | 0,50 | | 750 | 3,0 | |
| | 850 | 0,56 | | 800 | 3,3 | |
| | 900 | 0,64 | | 850 | 3,5 | |
| | 1064 | 1,4 | | 900 | 3,7 | |
| | | | | 1064 | 4,0 | |

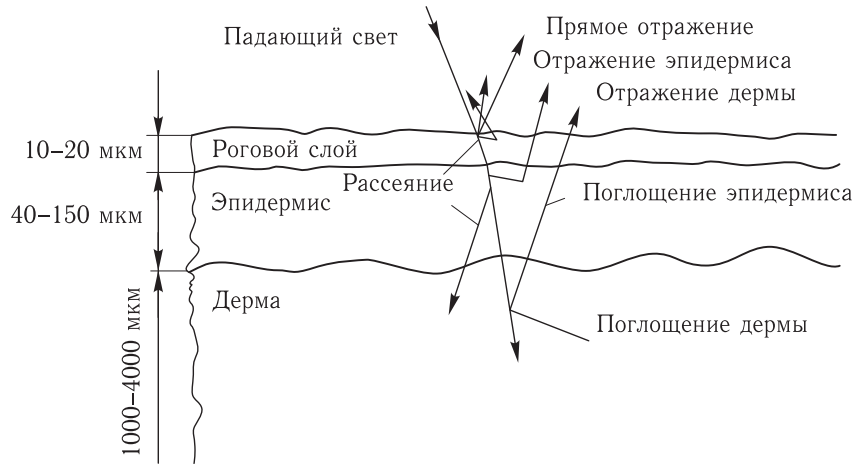


Рис. 1.10. Взаимодействие света с кожей [90]

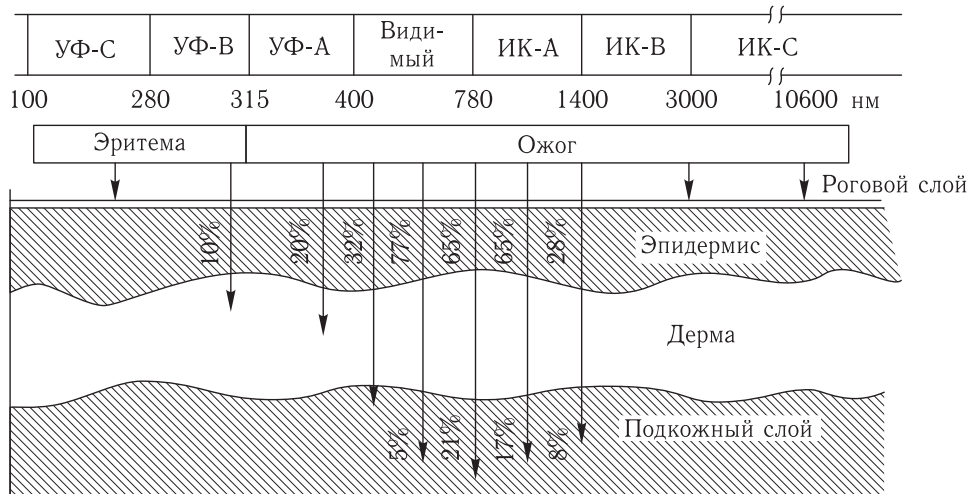


Рис. 1.11. Пропускание света различных длин волн кожей [62]

Твердые ткани, такие как ребра и черепная коробка, и цельная кровь также демонстрируют сравнительно хорошее пропускание в видимой и ближней ИК-области спектра [3, 46, 69, 187] (рис. 1.13–1.15).

При анализе распространения света в биотканях с многократным рассеянием предполагают обычно равномерное распределение поглощающих и рассеивающих центров. Для УФ-А, видимого и ближнего ИК-излучения типичным является анизотропное рассеяние, которое характеризуется сильной направленностью однократно рассеянных фотонов, что связано с присутствием больших клеточных органелл, таких как митохондрии, лизосомы, внутренние мембраны (аппарат Гольджи) [3, 13, 30–32, 201, 202]. Сильная анизотропия рассеяния биотканей и многократный его характер приводят к отклонению характера пропускания света от закона Бугера–Бера (см. уравнение (1.1)).

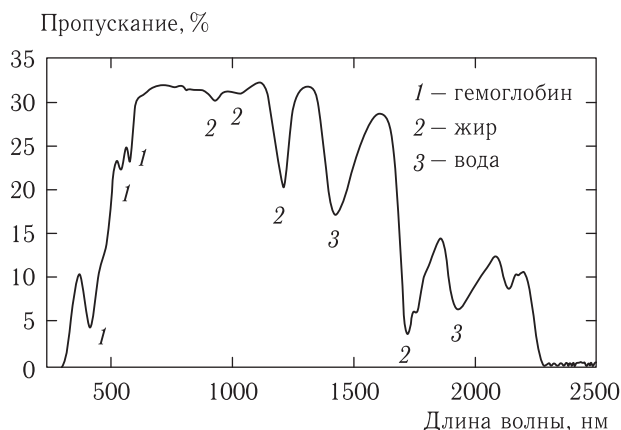


Рис. 1.12. Спектр пропускания 3-мм слоя биоткани молочной железы. Использовался спектрометр с интегрирующей сферой. Отмечены вклады полос поглощения компонентов биоткани: 1, гемоглобин; 2, жир; 3, вода [209]

Кроме того, для многих тканей, таких как, например, кожа, сетчатка глаза, кровь, характерна и неоднородность поглощения. Известно, что значение коэффициента поглощения меланиновых гранул сетчатки глаза в 10 раз больше, чем окружающей ткани, а распределение их неравномерное. Неравномерно распределен также гемоглобин, сильно поглощающий свет в синей области (см. рис. 1.7), в суспензии нативных эритроцитов. При неравномерном распределении молекул хромофоров в среде проявляется так называемый эффект сита и измеряемая оптическая плотность занижается [83]. Это занижение тем больше, чем выше оптическая плотность поглотителей. В результате как рассеяние света, так и эффект сита приводят к сглаживанию спектров ослабления по сравнению со спектрами поглощения молекул хромофоров. В максимумах спектров ослабления, где эффект сита оказывается сильнее, оптическая плотность занижается, а в минимумах, где проявляется влияние рассеяния света, эта величина завышается.

Многочисленное рассеяние и поглощение отвечают за уширение лазерного пучка и его ослабление по мере распространения в ткани, в то время как объемное рассеяние является основной причиной возникновения значительной дисперсной составляющей излучения в обратном направлении. Таким образом, распространение света в ткани зависит от рассеивающих и поглощающих свойств ее компонентов: клеток, клеточных органелл и разнообразных волокнистых структур [1-3, 31, 48, 211-214]. Размеры, форма и плотность этих структур, их показатель преломления по отношению к окружающему веществу, поляризационное состояние падающего света — все это играет важную роль в распространении света через ткани [1-3, 13, 30-32].

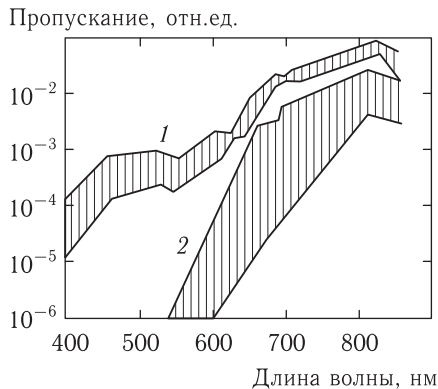


Рис. 1.13. Спектры пропускания: 1 — стенка грудной клетки в области ребра (толщина 16–20 мм, 5 человек); 2 — черепная коробка с кожным покровом (толщина 2–13 мм, 3 трупа) [46]

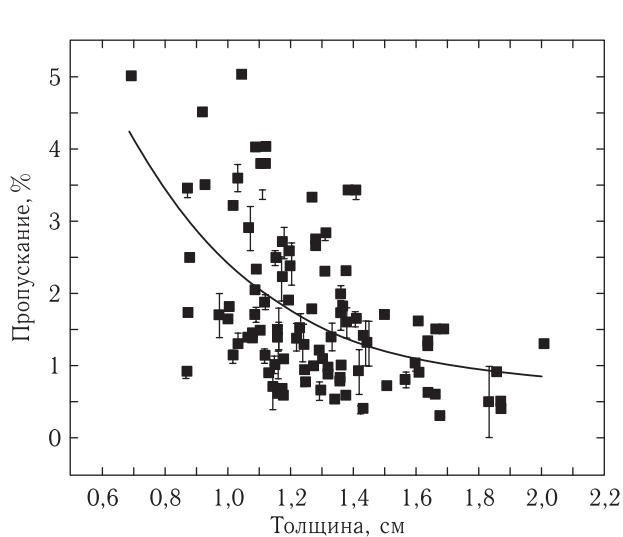


Рис. 1.14. Зависимость пропускания черепной коробки человека с кожным покровом (20 трупов, 5 областей: лобная часть, левая и правая височная части, затылочная и теменная части, всего 100 экспериментальных точек) для коллимированного излучения диодного лазера на длине волны 810 нм (мощность 1 Вт, диаметр расширенного пучка 30 мм) от ее толщины [187]

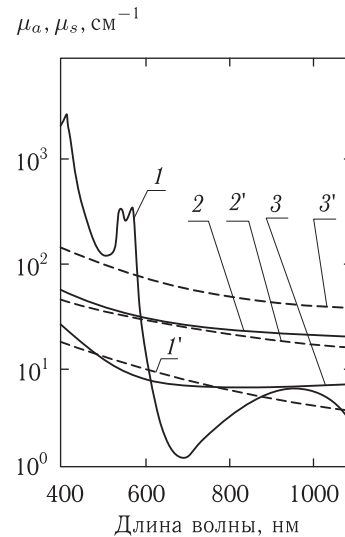


Рис. 1.15. Спектральные зависимости для коэффициентов поглощения (μ_a) и рассеяния (μ_s) крови (1, 1'), эпидермиса (2, 2') и дермы (3, 3') [69]

Ввиду огромного разнообразия и структурной сложности тканей разработка адекватных оптических моделей, учитывающих рассеяние и поглощение света, часто представляет собой наиболее сложную часть исследования. Два подхода обычно используются для моделирования тканей. В первом из них ткань моделируется средой со случайным непрерывным распределением оптических параметров в пространстве, а во втором ткань рассматривается как дискретный ансамбль рассеивателей [1–3, 13, 30–32]. Выбор подхода диктуется как структурной спецификой изучаемой ткани, так и типом искомым характеристикам светорассеяния.

Большинство тканей состоит из структур, размеры которых варьируют в широком диапазоне, что чаще всего можно описать как случайный континуум неоднородностей показателя преломления с переменным пространственным масштабом. В частности, с помощью фазоконтрастной микроскопии было показано, что структура неоднородностей показателя преломления в тканях млекопитающих во многих случаях аналогична структуре замороженной турбулентности [215, 216]. Этот факт имеет фундаментальное значение для понимания особенностей распространения света в ткани и может послужить ключом к решению обратной задачи реконструкции структуры ткани. Данный подход применим к тканям, не имеющим выраженных границ между элементами, обладающими значительной неоднородностью. Процесс рассеяния в таких структурах при определенных условиях может быть описан с использованием модели фазового экрана.

Второй подход к моделированию тканей состоит в их представлении системой дискретных рассеивающих частиц. В частности, эта модель успешно использовалась для описания угловой зависимости поляризационных характеристик рассеянного

излучения. Кровь является наиболее важным биологическим примером дисперсной системы, полностью соответствующей модели дискретных частиц.

Биологические среды часто моделируются ансамблем однородных сферических частиц, поскольку многие клетки и микроорганизмы, в частности клетки крови, по форме близки к сферам или эллипсоидам. Система невзаимодействующих сферических частиц является простейшей моделью ткани. Дифракция света на сферической частице строго описывается теорией Ми [217, 218]. Развитие этой модели включает учет структуры сферических частиц, а именно многослойные сферы и сферы с радиальной неоднородностью, анизотропией и оптической активностью [219, 220].

Поскольку соединительные ткани состоят из волокнистых структур, наиболее подходящей моделью для них является система длинных цилиндров. Мышечная ткань, дерма кожи, твердая мозговая оболочка (*dura mater*), роговица глаза и склера принадлежат к этому типу тканей, образованному преимущественно коллагеновыми волокнами. Решение задачи дифракции света на одном однородном или многослойном цилиндре также хорошо известно [217].

Для некоторых тканей распределение рассеивающих частиц по размерам может быть существенно монодисперсным, а для других — напротив, весьма широким. Примерами двух таких противоположных случаев являются прозрачная строма роговицы глаза, имеющая острое монодисперсное распределение, и мутная склера глаза, имеющая весьма широкое распределение коллагеновых волокон по диаметрам [13, 31]. Не существует универсальной функции распределения частиц по размерам, которая могла бы описать все ткани с одинаковой степенью адекватности. В оптике дисперсных систем типичными являются гауссово, гамма и степенное распределения [221]. Полидисперсность для случайно распределенных рассеивателей может быть учтена путем использования гамма-распределения, либо асимметричного логарифмического распределения по диаметрам, сечениям или объемам [13, 31, 215, 216, 222, 223]. В частности, для сильно рассеивающих тканей, таких как склера глаза, применимо гамма-распределение по радиусам [222, 223].

1.5. Простейшие дискретные модели ткани

Простейшая модель биологической ткани, дающая приемлемое количественное описание оптических свойств в достаточно широком диапазоне длин волн, может быть представлена в виде монодисперсной системы невзаимодействующих дискретных частиц [225, 226]. Поскольку основными компонентами биоткани являются сравнительно крупные частицы, то рассеяние и поглощение света этими частицами рассчитываются по теории Ми, справедливой для отдельной сферической частицы. При этом радиус частицы a и ее комплексный показатель преломления,

$$n_s(\lambda_0) = n'_s(\lambda_0) + in''_s(\lambda_0), \quad (1.2)$$

показатель преломления основной среды, в которую погружены частицы, $n_0(\lambda_0)$, и относительный показатель преломления вещества рассеивающих частиц и основного материала, $m = n_s/n_0$, являются параметрами, которые нужно задавать при моделировании. Здесь λ_0 — длина волн света в вакууме. Мнимая часть комплексного показателя преломления материала характеризует потери из-за поглощения.

В рамках теории Ми выражения для сечений рассеяния σ_{sca} и поглощения σ_{abs} , а также среднего косинуса угла рассеяния ϑ , так называемого фактора анизотропии

рассеяния $g = \langle \cos \vartheta \rangle$, для одной частицы можно записать в виде [217]:

$$\sigma_{sca} = \frac{\lambda_0^2}{2\pi n_0^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1)(|a_n|^2 + |b_n|^2), \quad (1.3)$$

$$\sigma_{abs} = \frac{\lambda_0^2}{2\pi n_0^2} \sum_{n=1}^{\infty} (2n+1)[\operatorname{Re}(a_n + b_n) - (|a_n|^2 + |b_n|^2)], \quad (1.4)$$

$$g = \frac{\lambda_0^2}{\pi n_0^2 \sigma_{sca}} \left\{ \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} \operatorname{Re}(a_n b_n^*) + \sum_{n=1}^{\infty} \frac{n(n+2)}{n+1} \operatorname{Re}(a_n a_{n+1}^* + b_n b_{n+1}^*) \right\}, \quad (1.5)$$

где a_n и b_n — коэффициенты Ми, являющиеся функциями относительного комплексного показателя преломления частиц (m) и параметра $2\pi a n_0 / \lambda_0$; звездочка обозначает комплексное сопряжение:

$$a_n = \frac{\psi_n(\alpha) \psi'_n(m\alpha) - m \psi_n(m\alpha) \psi'_n(\alpha)}{\xi(\alpha) \psi'_n(m\alpha) - m \psi_n(m\alpha) \xi'_n(\alpha)}, \quad (1.6)$$

$$b_n = \frac{m \psi'_n(m\alpha) \psi_n(\alpha) - \psi_n(m\alpha) \psi'_n(\alpha)}{m \psi'_n(m\alpha) \xi_n(\alpha) - \psi_n(m\alpha) \xi'_n(\alpha)}, \quad (1.7)$$

$$\alpha = \frac{2\pi a n_0}{\lambda_0}, \quad (1.8)$$

где ψ_n , ξ_n , ψ'_n , ξ'_n — функции Риккати–Бесселя первого и второго рода.

Коэффициенты поглощения μ_a и рассеяния μ_s для ансамбля невзаимодействующих частиц вычисляются с учетом плотности частиц в ткани:

$$\mu_s = \rho \sigma_{sca}, \quad \mu_a = \rho \sigma_{abs}, \quad (1.9)$$

где ρ — плотность рассеивающих частиц.

Среднее сечение рассеяния на одну частицу можно представить в виде, удобном для экспериментальных оценок [217]:

$$\sigma_{sca} = \frac{\lambda^2}{2\pi} \frac{1}{I_0} \int_0^\pi I(\vartheta) \sin \vartheta d\vartheta, \quad (1.10)$$

где I_0 — интенсивность падающего света, $I(\vartheta)$ — угловое распределение света, рассеянного частицей, ϑ — угол рассеяния. Для макроскопически изотропных и однородных сред среднее сечение рассеяния не зависит от направления и поляризации падающего света. Средние сечения экстинкции, $\sigma_{ext} = \sigma_{sca} + \sigma_{abs}$, и поглощения, σ_{abs} , также не зависят от направления и состояния поляризации падающего света.

В свою очередь, фактор анизотропии рассеяния g определяется видом фазовой (или угловой) функции рассеяния $p(\vartheta)$:

$$g \equiv \langle \cos \vartheta \rangle = \int_0^\pi p(\vartheta) \cos \vartheta \cdot 2\pi \sin \vartheta d\vartheta. \quad (1.11)$$

Фазовая функция рассеяния $p(\vartheta)$ характеризует элементарный акт рассеяния в среде, будучи функцией плотности вероятности рассеяния света в определенном направлении, отличным от направления падающей на частицу волны. Фазовая функция зависит только от угла рассеяния ϑ (угол между направлениями) в том случае, если рассеяние симметрично относительно направления падающей волны.

Введение удельных коэффициентов рассеяния и поглощения, экстраполированных к объемной доле 100 %, полезно для описания рассеивающих и поглощающих свойств моделируемой среды. В этом случае, при условии, что частицы достаточно удалены друг от друга чтобы предотвратить зависимое рассеяние, коэффициент рассеяния μ_s , приведенный (транспортный) коэффициент рассеяния $\mu'_s = (1 - g)\mu_s$ и коэффициент поглощения μ_a пропорциональны объемной доле рассеивающих частиц c_s :

$$\begin{aligned}\mu_s &= c_s \hat{\sigma}_{sca}, \\ \mu'_s &= c_s \hat{\sigma}_{sca} [1 - g(\lambda_0, a)], \\ \mu_a &= c_s \hat{\sigma}_{abs},\end{aligned}\quad (1.12)$$

где удельные коэффициенты рассеяния и поглощения $\hat{\sigma}_{sca}$ и $\hat{\sigma}_{abs}$ выражены в см^{-1} . Среднее расстояние d_s между центрами тяжести частиц определяется их радиусом a и объемной долей c_s :

$$d_s = \frac{2a}{\sqrt[3]{c_s}}. \quad (1.13)$$

Теория Ми строго применима только к частицам определенной правильной формы, но ее результаты полезны и в случае частиц неправильной формы. При этом колебания коэффициента рассеяния и фактора анизотропии при изменении размера частиц, наблюдаемые для сферических частиц (см. рис. 1.16), усредняются [217]. Удельный транспортный коэффициент рассеяния μ'_s/c_s существенно увеличивается с ростом относительного показателя преломления n'_s/n_0 . В свою очередь, фактор анизотропии рассеяния g максимален и стремится к единице, а $\mu'_s/c_s = 0$, когда указанное отношение равно 1 (рис. 1.16).

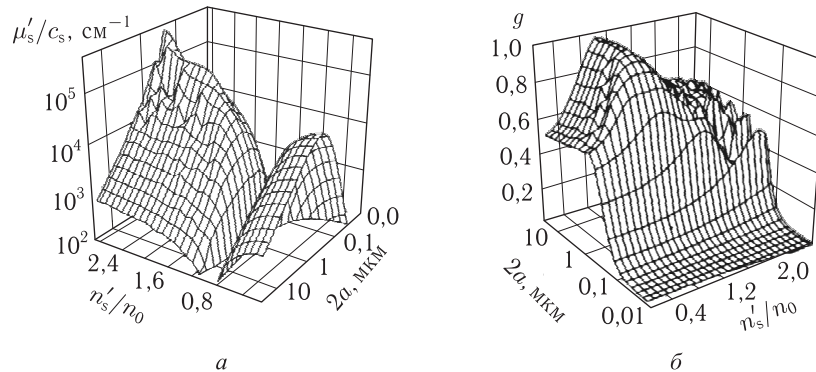


Рис. 1.16. Рассеивающие свойства непоглощающих частиц на длине волны He-Ne-лазера (633 нм), рассчитанные с использованием теории Ми [225, 226]. Удельный транспортный коэффициент рассеяния μ'_s/c_s (а) сильно зависит как от размера частиц ($2a$), так и от их относительного показателя преломления (n'_s/n_0). При условии, что показатели преломления рассеивателей и окружения согласованы ($n'_s/n_0 = 1$), коэффициент рассеяния равен нулю, а фактор анизотропии рассеяния максимален и стремится к 1 (б). Быстрые осцилляции на графиках связаны с наличием резонансов Ми

Зависимости параметров рассеяния частиц с показателем преломления, близким к показателю преломления окружающей среды, $n'_s/n_0 = 1,07$, что характерно для многих биологических тканей и крови, от длины волны показаны на рис. 1.17. При расчетах пренебрегали дисперсией материала частиц и окружающей среды, однако на практике она может быть важна. Из этих расчетов следует, что коэффициент рассеяния системы частиц с диаметром, меньшим длины волны, убывает

с ростом длины волны, в то время как при диаметре частиц, большем длины волны, он почти постоянен (рис. 1.17, а). Фактор анизотропии рассеяния g менее зависим от длины волны. Имеются плато в зависимостях при размерах частиц много меньше (изотропное рассеяние, $g \approx 0$) и много больше (сильно анизотропное рассеяние $g \leq 1$), чем длина волны, между которыми расположен участок кругового возрастания (рис. 1.17, б).

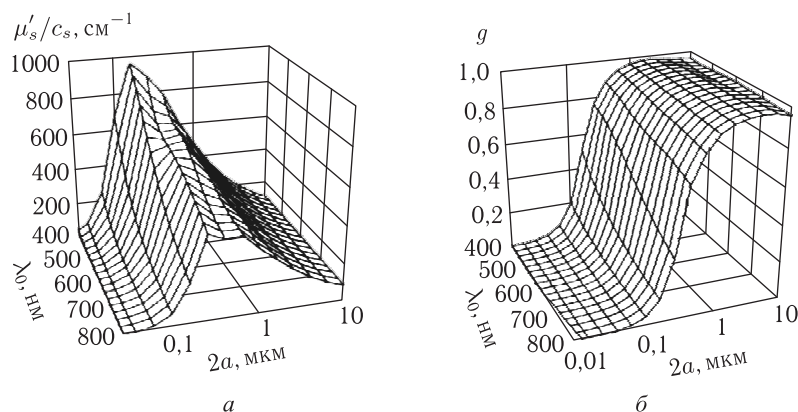


Рис. 1.17. Зависимости параметров рассеяния непоглощающих частиц от длины волны при $n'_s/n_0 = 1,07$, рассчитанные с использованием теории Ми [225, 226]. Удельный транспортный коэффициент рассеяния μ'_s/c_s (а) для частиц с размерами, меньшими длины волны, сильно растет в сторону коротких длин волн. Частицы с диаметром больше длины волны имеют почти постоянный удельный транспортный коэффициент рассеяния по всему видимому диапазону. Фактор анизотропии рассеяния g (б) почти не зависит от длины волны, но сильно зависит от размера частиц

Представленная модель показывает, что для адекватного описания оптических свойств биологической ткани нужно знать размеры и показатели преломления ее структурных элементов. Учет распределения частиц по размерам и показателям преломления, а также взаимодействия между частицами при их плотной упаковке существенно улучшает модель.

Показатель преломления биоткани может быть рассчитан с использованием закона Глэдстоуна и Дейла, из которого следует, что для многокомпонентной среды при отсутствии химического взаимодействия между компонентами, ее показатель преломления является средним от показателей преломления компонентов с их объемными долями в качестве весовых множителей, т. е. [227]

$$\bar{n} = \sum_{i=1}^N n_i f_i, \quad \sum_i f_i = 1, \quad (1.14)$$

где n_i и f_i — показатель преломления и объемная доля отдельных компонентов клетки или ткани соответственно, а N — число компонентов.

Средний показатель преломления основного вещества ткани определяется как взвешенное среднее показателей преломления цитоплазмы клеток, составляющих ткань, n_{cp} , и интерстициальной жидкости, окружающей клетки и волокнистые структуры ткани, n_{is} , как

$$\bar{n}_0 = f_{cp} n_{cp} + (1 - f_{cp}) n_{is}, \quad (1.15)$$

где f_{cp} — объемная доля цитоплазмы, содержащейся внутри клеток биоткани. Поскольку примерно 60% всей жидкости в мягкой ткани содержится в межклеточном пространстве, а $n_{\text{cp}} = 1,367$ и $n_{\text{is}} = 1,355$ [201], то из соотношения (1.15) следует, что $\bar{n}_0 = 1,362$. Показатель преломления материала частицы можно представить как сумму показателя преломления основного вещества и добавки $\langle \Delta n \rangle$ за счет других компонентов,

$$\bar{n}_s = \bar{n}_0 + \langle \Delta n \rangle. \quad (1.16)$$

Среднее значение вариации показателя преломления $\langle \Delta n \rangle$ определяется объемно-взвешенным средним, зависящим от содержания компонентов ткани:

$$\langle \Delta n \rangle = f_{\text{f}}(n_{\text{f}} - n_{\text{is}}) + f_{\text{nc}}(n_{\text{nc}} - n_{\text{cp}}) + f_{\text{ог}}(n_{\text{ог}} - n_{\text{cp}}). \quad (1.17)$$

Здесь нижние индексы f, is, nc, cp и og относятся соответственно к волокнам, межтканевой жидкости, ядрам клеток, цитоплазме и другим органеллам. Члены в круглых скобках представляют собой разности между показателями преломления более плотных компонентов ткани и их окружения, множители — объемные доли компонентов ткани. Показатель преломления волокон соединительной ткани составляет около 1,47, что соответствует примерно 55% гидратации коллагена, их основного компонента. Ядра и такие органеллы, как митохондрии и рибосомы, имеют показатели преломления, лежащие в сравнительно узком интервале 1,38–1,41. При условии, что $n_{\text{nc}} \cong n_{\text{ог}} = 1,40$, можно выразить $\langle \Delta n \rangle$ только через объемную долю фиброзной ткани f_{f} :

$$\langle \Delta n \rangle = f_{\text{f}}(n_{\text{f}} - n_{\text{is}}) + (1 - f_{\text{f}})(n_{\text{nc}} - n_{\text{cp}}). \quad (1.18)$$

Коллаген и эластин составляют примерно 70% сухого веса обезжиренной кожи, 45% ткани сердца и 2–3% немышечных внутренних органов [216]. Поэтому, в зависимости от типа биоткани, f_{f} может быть и малой величиной около 0,02, и большой около 0,7. Для $n_{\text{f}} - n_{\text{is}} = 0,115$ и $n_{\text{nc}} - n_{\text{cp}} = 0,033$ вариации среднего показателя преломления, соответствующие этим двум предельным случаям, равны $\langle \Delta n \rangle = 0,035$ и 0,09, или для $\bar{n}_0 = 1,362$, $\bar{n}_s = \bar{n}_0 + \langle \Delta n \rangle = 1,397$ и 1,452.

Полидисперсность случайно распределенных рассеивающих частиц можно учесть с помощью гамма-распределения, либо асимметричного логарифмического распределения частиц по диаметрам, сечениям или объемам [13, 215, 216, 222, 224, 228]. Например, для склеры глаза применимо гамма-распределение по радиусам волокон [222, 224]:

$$\eta(a) = a^\mu \exp(-\mu\beta), \quad (1.19)$$

где $\sigma/a_m = 2,35\mu^{-0,5}$, $\beta = a/a_m$, σ — полуширина распределения, а a_m — наиболее вероятный радиус рассеивающей частицы.

Двухфазная система, состоящая из ансамбля малых частиц одинакового размера с примесью небольшого числа более крупных частиц, представляет собой хорошую модель катаракты хрусталика глаза человека [229].

Для эпителиальных тканей, у которых основными рассеивателями являются структуры ядер, митохондрий и других органелл, характерно логарифмически-нормальное распределение по размерам сферических или слегка вытянутых эллипсоидальных частиц вида [230]

$$\eta(a) = \frac{1}{a\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left\{-\frac{[\ln(a) - \ln(a_m)]^2}{2\sigma^2}\right\}. \quad (1.20)$$

В частности, при исследовании карциномы простаты крысы для клеток эпителия и компонентов их ядер были найдены два логарифмически-нормальных распреде-

ления для мелких и крупных сферических рассеивающих частиц со следующими параметрами [230]: $a_{m1} = 0,012$ мкм, $\sigma_1 = 1,15$ мкм и $a_{m2} = 0,59$ мкм, $\sigma_2 = 0,43$ мкм.

Рассеивающие центры в ткани имеют широкий диапазон размеров и тенденцию к образованию агрегатов сложной формы с фрактальными свойствами. Как физически наиболее обоснованная функция асимметричного логарифмического распределения широко используется при анализе ансамблей частиц [216]. Для объемной доли частиц диаметра $2a$ она имеет следующий вид:

$$\eta(2a) = \frac{F_v}{C_m} (2a)^{3-D_f} \exp \left\{ -\frac{[\ln(2a) - \ln(2a_m)]^2}{2\sigma^2} \right\}, \quad (1.21)$$

где $C_m = \sigma\sqrt{2\pi} (2a_m)^{4-D_f} \exp[(4 - D_f)^2\sigma^2/2]$ — нормирующий множитель; $F_v = \int_0^\infty \eta(2a)d(2a)$ — полная объемная доля частиц, а величины $2a_m$ и σ определяют центр и ширину распределения, соответственно; D_f — фрактальная (объемная) размерность. В пределе бесконечно широкого распределения частиц по размерам

$$\eta(2a) \approx (2a)^{3-D_f}. \quad (1.22)$$

Для $3 < D_f < 4$ это степенное соотношение описывает зависимость объемных долей субъединиц идеального массового фрактала от их диаметра $2a$.

Ансамбль дискретных частиц ткани характеризуется плотностью упаковки или, другими словами, долей объема, занимаемой частицами. Объемная доля частиц, содержащихся в конкретной ткани, может быть найдена экспериментально с использованием электронных микроизображений ее тонких срезов или простым взвешиванием нативной ткани и ее сухого остатка. Правда, в первом случае можно еще дополнительно выявить структурную организацию ткани, распределение частиц по размерам и т. д. (см. например рис. 1.5, в), а во втором получить только объемную долю всех частиц.

Доля объема, занятая частицами, в мышечной ткани, роговице, склере и хрусталике глаза, составляет от 20 до 40%. Клетки занимают 35–45% объема крови. Объемная доля f эритроцитов в крови называется гематокритом и обозначается Hct . Для нормальной крови $Hct = 0,4$. Оставшиеся 60% объема крови занимает, в основном, плазма — чрезвычайно прозрачный водный раствор солей.

Большинство тканей имеют в своем составе клеточные и субклеточные структуры, расположенные близко друг к другу. Вообще говоря, в плотно упакованных структурах может проявляться когерентное рассеяние — эффект, наблюдаемый, например, в строме роговицы глаза [13, 167, 231–234]. Роговица образована отдельными коллагеновыми волокнами, которые плотно упакованы параллельно друг другу в тонкие пластинки — ламели (см. раздел 2.6). Если бы все волокна роговицы рассеивали свет независимо, роговица рассеивала бы 90% падающего на нее света и мы не видели бы практически ничего. Однако волокна рассеивают не независимо, поэтому необходимо учитывать эффекты интерференционного сложения рассеянных волн. Наблюдаются также и когерентные поляризационные эффекты [167, 233–236]. Например, с ростом концентрации в суспензиях сферических частиц, по мере того как концентрация превосходит значение, при котором рассеяние можно считать независимым, степень поляризации зондирующего излучения увеличивается, а не уменьшается [235, 236].

При очень малых плотностях упаковки имеет место некогерентное рассеяние независимыми частицами. Если доля объема, занимаемая частицами, равна или больше 0,01–0,1, появляются когерентные концентрационные эффекты. Концентрация рассеивающих частиц в большинстве тканей такова, что расстояния между

отдельными частицами сравнимы с размерами самих частиц. Если распределение частиц по размерам достаточно узкое, то плотная упаковка вносит в расположение частиц определенную степень упорядоченности.

Пространственная упорядоченность исключительно важна для оптических тканей глаза — роговицы, хрусталика и стекловидного тела [13, 167, 168, 231–234, 237]. Пространственный порядок в той или иной степени присущ и другим тканям, в частности, таким как сухожилие, хрящ, твердая мозговая оболочка (*dura mater*), дерма кожи и мышечная ткань. Высокая степень упорядоченности плотно упакованных рассеивающих частиц гарантирует прозрачность роговицы и хрусталика глаза.

Структуры ткани со статистически упорядоченными периодическими изменениями показателя преломления с масштабом порядка длины волны, как у фотонных кристаллов [238], в одних спектральных областях демонстрируют высокое пропускание, а в других — полосы, в которых распространение электромагнитных волн запрещено. Положение и глубина этих полос зависит от размера, показателя преломления и пространственной упорядоченности рассеивающих частиц.

Коэффициент упаковки частиц различной формы с объемной долей f_s выражается следующей формулой [217]:

$$\omega_p = \frac{(1 - f_s)^{p+1}}{[1 + f_s(p - 1)]^{p-1}}, \quad (1.23)$$

где p — упаковочная размерность, которая характеризует, как быстро пустое пространство между частицами сокращается по мере роста плотности частиц. Упаковка сферических частиц хорошо описывается размерностью $p = 3$. Упаковка частиц в виде плоских листов или стержней характеризуется размерностями, приближающимися к 1 и 2 соответственно. Элементы ткани имеют все эти формы и могут одновременно проявлять цилиндрическую и сферическую симметрию, поэтому упаковочная размерность может принимать любые значения между 1 и 5. При расчете оптических параметров среды с высокой концентрацией распределение по размерам $\eta(2a)$, полученное для невзаимодействующих частиц (см. формулы (1.19)–(1.22)), следует скорректировать на корреляцию частиц [216]:

$$\eta'(2a) = \frac{[1 - \eta(2a)]^{p+1}}{[1 + \eta(2a)(p - 1)]^{p-1}} \eta(2a). \quad (1.24)$$

На основе сочетания теории многократного рассеяния (см. главу 2) с представлением ткани как системы частиц была разработана микро-оптическая модель, описывающая многие наблюдаемые оптические характеристики мягких биотканей [216]. В модели ткань рассматривается как набор рассеивающих частиц, объемные доли которых подчиняются асимметричному логарифмически-нормальному распределению, модифицированному упаковочным множителем p для учета коррелированного рассеяния света плотно упакованными частицами (см. формулы (1.21), (1.22) и (1.24)). Предполагая, что волны, рассеянные отдельными частицами в тонком слое моделируемой ткани, складываются случайно, можно аппроксимировать объемный коэффициент рассеяния суммой коэффициентов рассеяния частиц данного диаметра, а именно

$$\mu_s = \sum_{i=1}^{N_p} \mu_s(2a_i), \quad (1.25)$$

где

$$\mu_s(2a_i) = \frac{\eta(2a_i)}{v_i} \sigma_s(2a_i), \quad (1.26)$$

N_p — число разных диаметров частиц; $\eta(2a_i)$ — объемная доля частиц с диаметром $2a_i$; $\sigma_s(2a_i)$ — оптическое сечение отдельной частицы диаметра $2a_i$ и объема v_i . Усредненная по объему фазовая функция $p(\vartheta)$ (и параметр анизотропии рассеяния g) слоя ткани есть взвешенная сумма угловых функций рассеяния $p_i(\vartheta)$ (и параметров анизотропии g_i) отдельных частиц, где в качестве весовых множителей берутся соответствующие коэффициенты рассеяния:

$$p(\vartheta) = \frac{\sum_{i=1}^{N_p} \mu_s(2a_i) p_i(\vartheta)}{\sum_{i=1}^{N_p} \mu_s(2a_i)}; \quad (1.27)$$

$$g = \frac{\sum_{i=1}^{N_p} \mu_s(2a_i) g_i(2a_i)}{\sum_{i=1}^{N_p} \mu_s(2a_i)}. \quad (1.28)$$

Усредненный по объему коэффициент рассеяния назад можно определить как сумму сечений частиц с весовыми множителями, в качестве которых берутся значения угловых функций рассеяния при 180° ,

$$\mu_b = \sum_{i=1}^{N_p} \frac{\eta(2a_i)}{v_i} \sigma_s(2a_i) p_i(180^\circ). \quad (1.29)$$

Произведение μ_b ($\text{см}^{-1}/\text{ср}$) и толщины слоя ткани дает отраженную долю падающей плотности энергии на единицу телесного угла в направлении, противоположном направлению падающего света. Приведенный (транспортный) коэффициент рассеяния как обычно определяется как $\mu'_s = \mu_s(1 - g)$, где g описывается соотношением (1.28).

Расчет в соответствии с обсуждаемой моделью и использованием теории Ми для описания ансамбля сфер с широким разбросом диаметров позволяет получить хорошие оценки для всех параметров μ_s , μ'_s , μ_b и g для типичной мягкой ткани при следующем наборе параметров распределения и упаковки частиц: объемная фрактальная размерность $D_f = 3,7$, средний показатель преломления основной среды ткани $\bar{n}_0 = 1,352$, средний показатель преломления рассеивающих частиц $\bar{n}_s = 1,420$, центр распределения частиц по размерам $2a_m = 1,13$ мкм, ширина этого распределения $\sigma = 2$ мкм и коэффициент упаковки $p = 3$. В качестве примера в табл. 1.6 приведены оптические характеристики соединительной ткани с разным содержанием

Таблица 1.6. Оптические коэффициенты модельной соединительной биологической ткани с тремя различными весовыми долями сухого волокна (f_i), при $D_f = 3,7$ [216]

| Длина волны, нм | 633 | | | 800 | | | 1300 | | |
|-----------------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| f_i | 0,03 | 0,3 | 0,7 | 0,03 | 0,3 | 0,7 | 0,03 | 0,3 | 0,7 |
| $\mu_s, \text{см}^{-1}$ | 105 | 224 | 402 | 69 | 146 | 274 | 29 | 63 | 119 |
| $\mu'_s, \text{см}^{-1}$ | 8,0 | 20 | 45 | 5,7 | 14 | 32 | 3,0 | 7,5 | 16,5 |
| $\mu_b, \text{см}^{-1}/\text{ср}$ | 0,8 | 2,2 | 5,0 | 0,5 | 1,3 | 3,1 | 0,3 | 0,9 | 2,0 |
| g | 0,92 | 0,91 | 0,89 | 0,92 | 0,90 | 0,88 | 0,90 | 0,88 | 0,86 |

доли сухого веса волокон ($f_f = 0,03; 0,3$ и $0,7$), рассчитанные для трех длин волн (633, 800 и 1300 нм). В целом эти расчеты хорошо согласуются с данными экспериментальных исследований оптических параметров мягких тканей в условиях *in vitro* и даже *in vivo*.

Итак, представленная модель позволяет заключить, что [216] 1) биоткань лучше всего описывается ансамблем частиц с широким распределением по размерам; 2) коэффициент рассеяния убывает с длиной волны примерно по степенному закону $\mu_s \sim \lambda^{2-D_f}$ при $600 \leq \lambda \leq 1400$ нм, где D_f — ограничивающая фрактальная размерность 3) частицы с диаметрами между $\lambda/4$ и $\lambda/2$ определяют рассеяние назад; 4) частицы с диаметрами между 3λ и 4λ ответственны за экстинкцию света, рассеянного вперед.

Однако, как следует из работы [239], фрактальная размерность D_f сильно зависит от того, как проводится дискретизация непрерывного распределения частиц по размерам. В модели десяти сфер фрактальная размерность лежит в диапазоне $3 < D_f < 4$ [216]. Для модели сфер, размер которых меняется от 5 нм до 30000 нм с шагом 5 нм, диапазон фрактальной размерности определен как $4 < D_f < 5$ [239]. Однако и в этой модели коэффициент рассеяния убывал с длиной волны по степенному закону $\mu_s \sim \lambda^{3-D_f}$ при $600 \leq \lambda \leq 1500$ нм. Следовательно, обе модели дают степенной закон зависимости коэффициента рассеяния от длины волны $\mu_s \sim \lambda^{-h}$ с показателем h , лежащим в интервале 1–2.

Приведенный (транспортный) коэффициент рассеяния также убывает с ростом длины волны в соответствии со степенным законом, что было продемонстрировано экспериментально для нормальной, обезвоженной и коагулированной аорты человека *in vitro* [240, 241]:

$$\mu'_s \propto \lambda^{-h}. \quad (1.30)$$

Экспериментальные данные для контрольных и обработанных образцов аорты человека представлены в табл. 1.7. Например, при прямом нагреве (100 °C) наблюдалось наибольшее снижение показателя h от 1,38 до 1,06.

Таблица 1.7. Значения показателей h степенной зависимости от длины волны $\mu'_s \propto \lambda^{-h}$ для контрольных (h_{control}) и экспериментальных (h_{exp}) спектров приведенного коэффициента рассеяния (400–1300 нм) для аорты человека (в скобках приведены среднеквадратичные отклонения) [240, 241]

| h_{control} | h_{exp} | Условия эксперимента |
|----------------------|------------------|-------------------------------------|
| 1,15 (0,10) | 1,22 (0,13) | Дегидратация |
| 1,21 (0,12) | 1,28 (0,04) | Нагрев до 60 °C |
| 1,30 (0,01) | 1,10 (0,10) | Нагрев до 70 °C |
| 1,38 (0,11) | 1,06 (0,07) | Нагрев до 100 °C (прямой нагрев) |
| 1,26 (0,08) | 1,03 (0,05) | Нагрев до 100 °C (в обернутом виде) |

In vitro исследование воздействия глицерина на кожу крысы также подтвердило степенную зависимость для μ'_s в диапазоне длин волн 500–1200 нм с $h = 1,12$ для кожи в норме с последующим уменьшением h по мере выдержки кожи в глицерине (скорее всего за счет эффекта дегидратации) [242]. Значения h составляли 1,09 через 5 мин, 0,85 через 10 мин, 0,52 через 20 мин и 0,9 при обратном гидратировании образца после окончания действия глицерина.

In vivo измерения диффузного отражения от кожи человека также продемонстрировали степенной закон зависимости μ'_s от длины волны [243]:

$$\mu'_s = q\lambda^{-h} \text{ (см}^{-1}\text{, } \lambda \text{ в микрометрах)}. \quad (1.31)$$

В частности, для спектров отражения от предплечья человека в диапазоне длин волн 700–900 нм $q = 5,50 \pm 0,11$ и $h = 1,11 \pm 0,08$. Из теории Ми следует, что показатель степени h связан со средним размером рассеивающих частиц — эквивалентным радиусом Ми a_M . Определив h , можно найти эквивалентный радиус из соотношений [243]

$$h = -1109,5a_M^3 + 341,67a_M^2 - 9,36961a_M - 3,9359 \quad (a_M < 0,23 \text{ мкм}), \quad (1.32)$$

$$h = 23,909a_M^3 - 37,218a_M^2 + 19,534a_M - 3,965 \quad (0,23 < a_M < 0,60 \text{ мкм}). \quad (1.33)$$

Эти соотношения были записаны для относительного показателя преломления $m = 1,037$. Для $h = 1,11$ $a_M = 0,30$ мкм, что примерно в 2 раза меньше, чем средний радиус (0,57 мкм), использованный в обсуждавшейся выше модели типичной мягкой ткани в виде упакованных сфер с большим разбросом диаметров [216]. Очевидно, что для конкретных тканей их характеристики могут сильно отличаться как по величине среднего радиуса рассеивателей, так и по другим параметрам.

Используя теорию многократного рассеяния, были получены приближенные выражения для коэффициентов поглощения μ_a и рассеяния μ_s , описывающих распространение света в слое крови [244]. Гематокрит крови Hct связан с концентрацией эритроцитов ρ и объемом эритроцита V_e следующим простым соотношением [244, 245]:

$$\rho = \frac{Hct}{V_e}. \quad (1.34)$$

Тогда коэффициент поглощения слоя крови μ_a можно представить в виде

$$\mu_a = \frac{Hct}{V_e} \sigma_a. \quad (1.35)$$

Для достаточно малых значений Hct ($Hct < 0,2$) коэффициент рассеяния дается выражением

$$\mu_s = \frac{Hct}{V_e} \sigma_s. \quad (1.36)$$

Для $Hct > 0,5$ частицы становятся плотно упакованными, а среда — почти однородной. В этом случае кровь можно считать однородной средой, содержащей гемоглобин, в которую погружены рассеивающие частицы, образованные окружающей эритроциты плазмой крови. В пределе $Hct \rightarrow 1$ «плазменные частицы» исчезают и коэффициент рассеяния должен стремиться к нулю. Это приводит к следующему приближенному выражению для μ_s [244, 245]:

$$\mu_s \approx \frac{Hct(1 - Hct)}{V_e} \sigma_s, \quad (1.37)$$

где множитель $(1 - Hct)$ отвечает за подавление рассеяния при $Hct \rightarrow 1$. Однако абсолютно плотная упаковка ($Hct = 1$) реально не достижима; например, в приближении недеформируемых твердых сфер Hct не может превышать 0,64. С учетом этого факта и физиологических условий необходимо описывать влияние упаковки клеток крови на рассеяние более сложной функцией

$$\mu_s = \frac{Hct}{V_e} \sigma_s F(Hct), \quad (1.38)$$

где функция упаковки $F(Hct)$ учитывает физиологические условия для эритроцитов, в частности деформируемость клеток при высоких концентрациях.

Теория рассеяния волн Тверски [244, 246] вполне согласуется с данными измерений оптической плотности для слоя цельной крови [247]. Однако она не описывает пространственное распределение отраженного и прошедшего света и потому не позволяет использовать ее при других взаимных расположениях источника и приемника, кроме как на одной оптической оси. Напротив, обсуждаемая далее во второй главе теория переноса излучения, в частности ее диффузионное приближение, преодолевает эти ограничения теории рассеяния волн. Однако для ее применения к описанию системы плотно упакованных тканей необходимо учитывать эффекты взаимодействия частиц и распределения их по размерам. Например, при расчетах в рамках диффузионной теории была скорректирована зависимость (1.37) коэффициента рассеяния μ_s от гематокрита для тонкого слоя крови [247]:

$$\mu_s \approx \frac{Hct}{V_e} \sigma_s (1 - Hct)(1,4 - Hct). \quad (1.39)$$

Соотношения (1.37)–(1.39) используются при описании оптических параметров крови в зависимости от гематокрита, и, наоборот, по измерениям оптических характеристик могут быть оценены значения гематокрита крови. На рис. 1.18–1.21 представлены экспериментальные данные для относительного коэффициента поглощения $\mu_a(Hct)/\mu_a(8,6\%)$, коэффициента рассеяния $\mu_s(Hct)/\mu_s(8,6\%)$, параметра анизотропии рассеяния $g(Hct)/g(8,6\%)$ и приведенного коэффициента рассеяния $\mu'_s(Hct)/\mu'_s(8,6\%)$ суспензии эритроцитов крови в физиологическом растворе в зависимости от гематокрита Hct , усредненные для двух диапазонов длин волн 250–600 нм и 600–1100 нм и двух отдельных длин волн 250 и 415 нм [248].

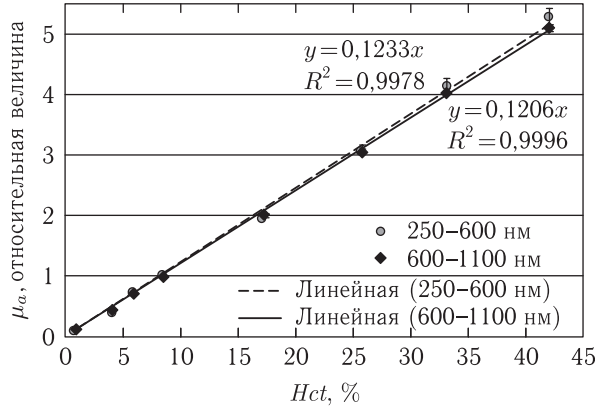


Рис. 1.18. Значения относительного коэффициента поглощения $\mu_a(Hct)/\mu_a(Hct = 8,6\%)$ суспензии эритроцитов крови в физиологическом растворе в зависимости от гематокрита Hct , усредненные для двух диапазонов длин волн 250–600 нм (линейная аппроксимация с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,9978$) и 600–1100 нм (линейная аппроксимация с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,9996$) [248]

Значения оптических параметров для гематокрита 8,6% и концентрации гемоглобина 2,87 г/л для некоторых длин волн, близких к лазерным линиям, представлены в табл. 1.8. На основании экспериментальных данных, представленных на рис. 1.18–1.21, были получены следующие аппроксимирующие функции для расчета зависимостей оптических параметров от гематокрита и длины волны, при этом в качестве исходных берутся значения из табл. 1.8 или из более полной таблицы

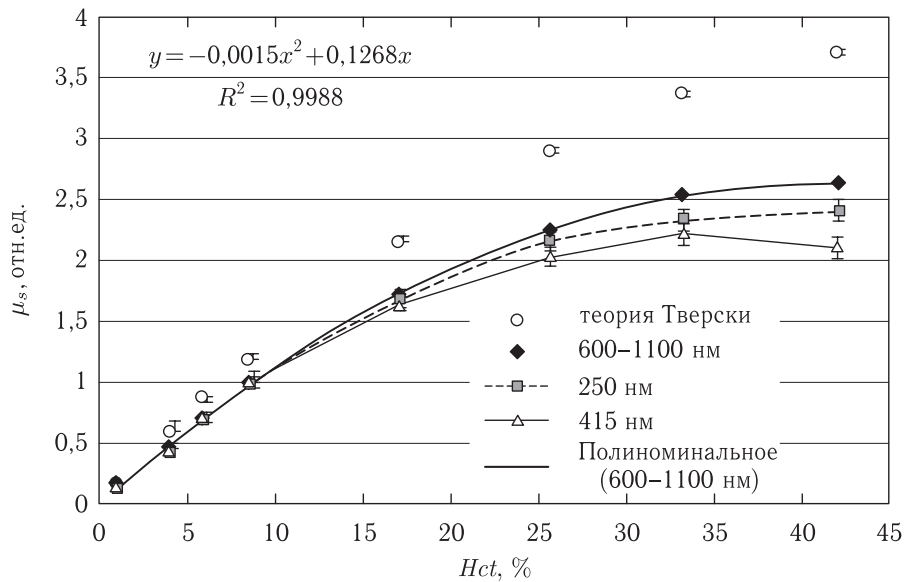


Рис. 1.19. Значения относительного коэффициента рассеяния $\mu_s(Hct)/\mu_s(Hct = 8,6\%)$ суспензии эритроцитов крови в физиологическом растворе в зависимости от гематокрита Hct , усредненные для диапазона длин волн 600–1100 нм (полиномиальная аппроксимация с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,9988$) и двух отдельных длин волн 250 и 415 нм; оценки по теории Тверски, формула (1.37), [244] показаны незаполненными кружочками [248]

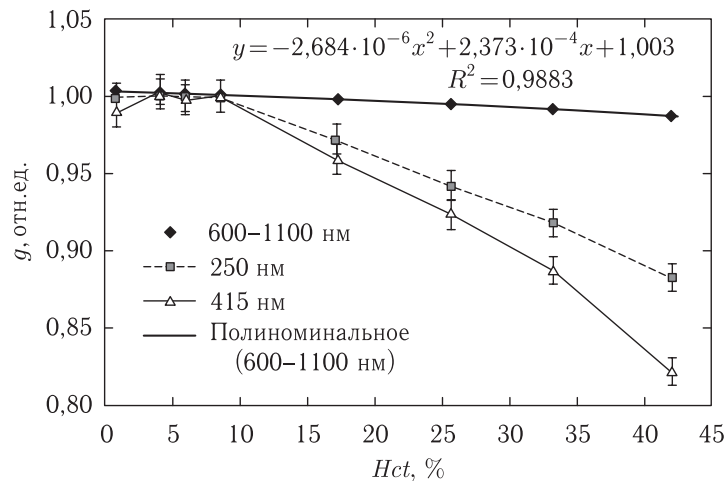


Рис. 1.20. Значения относительного параметра анизотропии рассеяния $g(Hct)/g(Hct = 8,6\%)$ суспензии эритроцитов крови в физиологическом растворе в зависимости от гематокрита Hct , усредненные для диапазона длин волн 600–1100 нм (полиномиальная аппроксимация с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,9883$) и двух отдельных длин волн 250 и 415 нм [248]

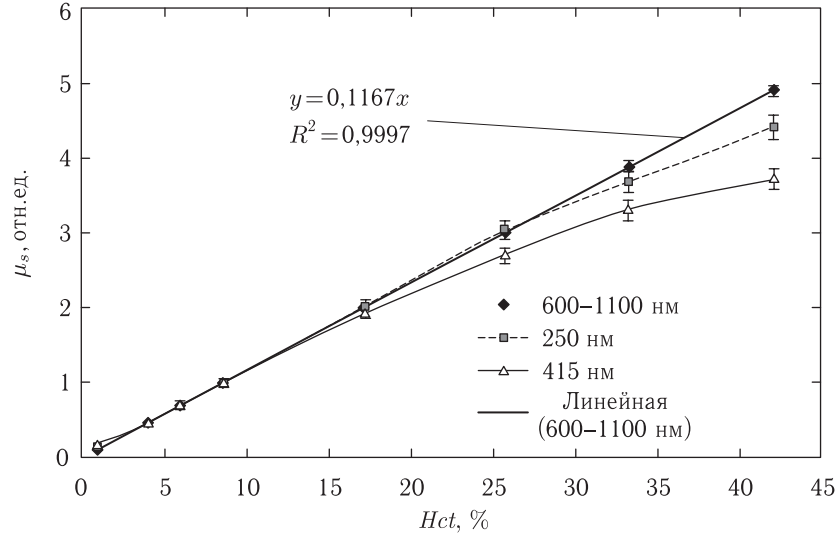


Рис. 1.21. Значения относительного приведенного коэффициента рассеяния $\mu'_s(Hct)/\mu'_s(Hct = 8,6\%)$ суспензии эритроцитов крови в физиологическом растворе в зависимости от гематокрита Hct , усредненные для диапазона длин волн 600–1100 нм (линейная аппроксимация с коэффициентом корреляции $R^2 = 0,9997$) и двух отдельных длин волн 250 и 415 нм [248]

работы [248]:

$$\begin{aligned} \mu_a(\lambda, Hct) &= 0,1206\mu_{a0}(\lambda)Hct, & 0,84\% < Hct < 42,1\%; \\ \mu_s(\lambda, Hct) &= (0,1268Hct - 0,0015Hct^2)\mu_{s0}(\lambda), \\ &\text{для } 250\text{--}1100 \text{ нм}, & 0,84\% < Hct < 17,1\%, \\ &\text{для } 600\text{--}1100 \text{ нм}, & 17,1\% < Hct < 42,1\%; \\ g(\lambda, Hct) &= (1,003 - 2,373 \cdot 10^{-4}Hct - 2,684 \cdot 10^{-6}Hct^2)g_0(\lambda), & (1.40) \\ &\text{для } 600\text{--}1100 \text{ нм}, & 0,84\% < Hct < 42,1\%; \\ \mu'_s(\lambda, Hct) &= 0,1167\mu'_{s0}(\lambda)Hct, \\ &\text{для } 250\text{--}1100 \text{ нм}, & 0,84\% < Hct < 17,1\%, \\ &\text{для } 600\text{--}1100 \text{ нм}, & 17,1\% < Hct < 42,1\%. \end{aligned}$$

Таблица 1.8. Значения оптических параметров суспензии эритроцитов в физиологическом растворе для гематокрита, равного 8,6%, и концентрации гемоглобина, равной 2,87 г/л, измеренные для некоторых длин волн, близких к лазерным линиям [248]

| λ , нм | μ_{a0} , см ⁻¹ | μ_{s0} , см ⁻¹ | g_0 | μ'_{s0} , см ⁻¹ |
|----------------|-------------------------------|-------------------------------|--------|--------------------------------|
| 480 | 25,2 | 318 | 0,9806 | 6,19 |
| 630 | 0,496 | 342 | 0,9863 | 4,69 |
| 800 | 0,641 | 308 | 0,9868 | 4,07 |
| 980 | 1,33 | 261 | 0,9836 | 4,28 |
| 1060 | 0,879 | 250 | 0,9838 | 4,06 |

Примечание: средние значения относительного стандартного отклонения для измеренных величин составляли для μ_{a0} – 4,9%, μ_{s0} – 8,4%, $(1 - g_0)$ – 12,8%, μ'_{s0} – 16,0%.

Отметим, что теория Тверски [244] (см. формулу (1.37) и рис. 1.19) не в полной мере описывает зависимость коэффициента рассеяния от гематокрита. По-видимому, необходим поиск более совершенных моделей, учитывающих физиологическое состояние эритроцитов, чтобы полнее описать эмпирические формулы (1.40).

1.6. Флуоресценция

1.6.1. Однофотонная флуоресценция. Одним из фундаментальных явлений, возникающих при взаимодействии света с биологическими объектами, является их люминесценция — широкополосное свечение на более длинных волнах по сравнению с длиной волны возбуждения. Люминесценцию можно разделить на флуоресценцию, соответствующую разрешенному оптическому переходу со сравнительно большим квантовым выходом и малым (наносекунды) временем жизни, а также фосфоресценцию, соответствующую «запрещенному» переходу с низким квантовым выходом и большим временем распада порядка нескольких микро- или миллисекунд [249, 250].

Поглощение света связано с электронным переходом из основного состояния в возбужденное состояние молекулы вещества. В результате свет, проходящий через слой толщины d , ослабляется как [251]

$$I(\lambda) = I_0 \exp(-\mu_a d) = I_0 10^{-\varepsilon_\lambda c_{ab} d}, \quad (1.41)$$

где $I(\lambda)$ — интенсивность прошедшего света, I_0 — интенсивность падающего света, ε_λ — молярный коэффициент экстинкции, а c_{ab} — концентрация поглощающих молекул. В рассеивающих образцах коэффициенты поглощения μ_a и рассеяния μ_s (опущенный в уравнении (1.41)) суммируются, обуславливая последующее ослабление проходящего света (см. уравнение (1.1)).

Флуоресценция возникает после поглощения света и связана с электронным переходом из возбужденного состояния молекулы в основное состояние. Ее интенсивность дается выражением [251]

$$I_F(\lambda) = I_0 [1 - 10^{-\varepsilon_\lambda c_{ab} d}] \eta_F \frac{\Omega}{4\pi}, \quad (1.42)$$

где η_F — квантовый выход флуоресценции, а Ω — телесный угол, в котором регистрируется изотропное излучение флуоресценции (угловая апертура приемника). В случае тонких образцов, например, клеточных монослоев или образцов биопсии толщиной несколько микрометров, выражение (1.42) может быть представлено в виде

$$I_F(\lambda) = I_0 \ln 10 \varepsilon_\lambda c_{ab} d \eta_F \frac{\Omega}{4\pi}. \quad (1.43)$$

Интенсивность флуоресценции пропорциональна концентрации и квантовому выходу флуоресценции поглощающих молекул. В рассеивающих средах длина пробега рассеянных и нерассеянных фотонов внутри образца различны, и выражения (1.42) и (1.43) требуют модификации с учетом эффектов многократного рассеяния. Однако в практически однородных тонких образцах линейная связь между I_F , c_{ab} и η_F сохраняется.

Энергии электронных состояний молекулы являются сложными функциями межъядерных расстояний, обычно образующими «потенциальные ямы», как показано на рис. 1.22, *a* для основного (S_0) и первого возбужденного (S_1) состояний. Каждая «потенциальная яма» содержит большое число колебательных уровней энергии ν_i , каждый из которых расщеплен на многочисленные вращательные подуровни (не показанные на рис. 1.22, *a*). Электронный переход между энергетическими уровнями происходит по «вертикали», так как за короткое время такого перехода положение

ядер не успевают измениться (принцип Франка–Кондона). Электронные переходы обычно происходят из основных вибронных состояний (для возбуждения S_0 и ν_0 , для флуоресценции S_1 и ν_0). Вероятность каждого перехода пропорциональна квадрату дипольного момента перехода и определяется перекрытием соответствующих колебательных волновых функций в основном и возбужденном электронных состояниях молекулы. Таким образом, спектры поглощения и флуоресценции получаются в результате наложения нескольких переходов, что часто приводит к образованию широких спектральных полос. Рисунок 1.22, *а* показывает, что так называемый 0–0-переход между самыми низкими колебательными уровнями лишь слегка выражен, поскольку перекрытие соответствующих волновых функций мало. По этой причине спектр флуоресценции всегда сдвинут в сторону более низких энергий ΔW , что соответствует большим длинам волны $\lambda = \Delta W/hc$, по сравнению со спектром поглощения или возбуждения (h — постоянная Планка, c — скорость света). Это явление называется *стоксовым сдвигом*.

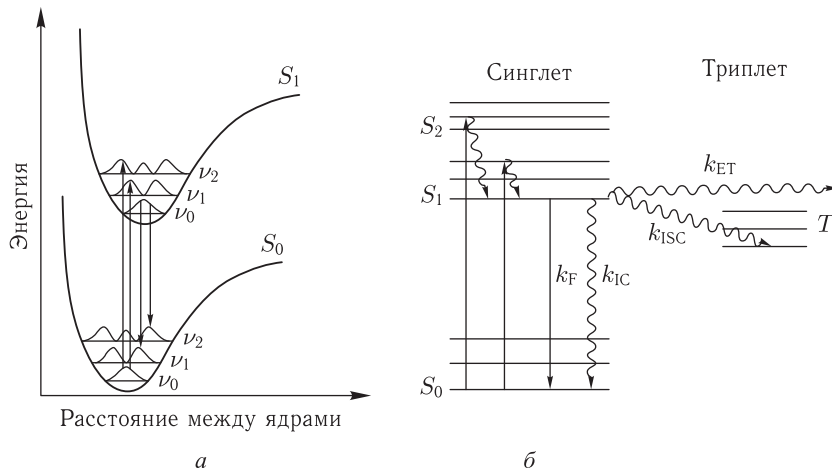


Рис. 1.22. Формирование спектров флуоресценции [251]: *а* — диаграмма потенциалов электронных состояний S_0 , S_1 и колебательных уровней ν_i ; показаны колебательные волновые функции и оптические переходы (возбуждение: $S_0\nu_0 \rightarrow S_1\nu_n$; флуоресценция: $S_1\nu_0 \rightarrow S_0\nu_n$); *б* — диаграмма Яблонского энергетических уровней молекулы и скоростей переходов; прямые линии — радиационные переходы, волнистые линии — безызлучательные переходы

Если не рассматривать зависимость энергии электронных состояний от координат ядер, то различные состояния молекулы можно проиллюстрировать с помощью *диаграммы Яблонского*, как показано на рис. 1.22, *б*. Возбуждение обычно происходит из основного синглетного состояния S_0 на различные вибронные уровни возбужденных синглетных электронных состояний S_n , откуда быстрые безызлучательные переходы («внутренняя конверсия») за времена порядка фемтосекунд переводят молекулу в наинизшее возбужденное синглетное состояние S_1 . Из состояния S_1 могут осуществляться различные переходы: переход в основное состояние S_0 с излучением флуоресценции (включая его колебательные подуровни) со скоростью k_F , внутренняя конверсия в основное состояние S_0 (скорость k_{IC}), интеркомбинационный переход из синглетного в триплетное состояние T_1 (скорость k_{ISC}) и безызлучательный перенос энергии на соседнюю молекулу (скорость k_{ET}). Все эти скорости складываются:

$$k = k_F + k_{IC} + k_{ISC} + k_{ET} = 1/\tau, \quad (1.44)$$

определяя время жизни τ возбужденного состояния S_1 . Отношение k_F/k соответствует квантовому выходу флуоресценции η_F . Хотя оптическая спектроскопия позволяет напрямую регистрировать только излучательные переходы, тем не менее, из результатов измерения времени жизни флуоресценции можно определить скорости k_{IC} или k_{ET} . Отметим, что радиационный переход $T_1 \rightarrow S_0$ запрещен по спине, и проявляется лишь у небольшого числа отдельных молекул.

Дипольные моменты переходов имеют определенную ориентацию относительно молекулы. При возбуждении линейно поляризованным светом преимущественно возбуждаются те молекулы, у которых дипольные моменты переходов параллельны вектору электрического поля падающего света. Это селективное возбуждение определенным образом ориентированных молекул приводит к частичной поляризации флуоресценции, которая описывается степенью поляризации [249]:

$$P_F = \frac{I_{F\parallel} - I_{F\perp}}{I_{F\parallel} + I_{F\perp}} \quad (1.45)$$

или анизотропией флуоресценции

$$r_F = \frac{I_{F\parallel} - I_{F\perp}}{I_{F\parallel} + 2I_{F\perp}}, \quad (1.46)$$

где $I_{F\parallel}$ и $I_{F\perp}$ — интенсивности компонент флуоресценции, поляризованных параллельно или перпендикулярно электрическому вектору возбуждающего поля соответственно. Обычно P_F и r_F зависят от интервала времени между возбуждением и регистрацией флуоресценции, поскольку за время жизни возбужденных состояний многие молекулы меняют свою ориентацию за счет вращения («вращательная диффузия»). Из измерений анизотропии флуоресценции с временным разрешением можно определить постоянную времени вращательной диффузии, связанную с объемом молекулы V_M и вязкостью окружающей среды η соотношением

$$\tau_r = \frac{\eta V_M}{k_B T}, \quad (1.47)$$

где k_B — постоянная Больцмана, а T — абсолютная температура. Постоянная времени вращательной диффузии около 13 нс соотносится с молекулярным весом белков около 50 000 Да [249], а около 300 пс — протопорфируну с диаметром агрегатов порядка 1,6 нм [251].

При возбуждении биологических объектов ультрафиолетовым светом ($\lambda \leq 370$ нм) можно наблюдать флуоресценцию как белков, так и нуклеиновых кислот — это так называемая автофлуоресценция (АФ) или собственная флуоресценция биологического материала. Квантовый выход флуоресценции всех составляющих нуклеиновых кислот имеет величину около 10^{-4} – 10^{-5} , что соответствует временам жизни возбужденных состояний порядка пикосекунд. Автофлуоресценция белков определяется аминокислотами, фенилаланином, тирозином и триптофаном с максимумами поглощения соответственно на 257 нм, 275 нм и 280 нм и максимумами испускания между 280 нм (фенилаланин) и 350 нм (триптофан) [249–251]. В спектре излучения белков обычно доминирует триптофан. Флуоресценция коллагена и эластина возбуждается между 300 и 400 нм и демонстрирует широкие полосы испускания между 400 и 600 нм с максимумами около 400 нм, 430 нм и 460 нм. В частности, флуоресценция коллагена и эластина может использоваться для распознавания различных типов биотканей [64, 251–253].

Восстановленная форма кофермента никотинамидадениндинуклеотида (НАД·Н) селективно возбуждается в диапазоне длин волн между 330 и 370 нм. Кофермент НАД·Н сконцентрирован, в основном, в митохондриях, где он окисляется внутри дыхательной цепи, локализованной во внутренней митохондриальной мембране,

и поэтому его флуоресценция является индикатором ишемических или опухолевых тканей [251, 253]. Было показано, что флуоресценция свободного или связанного с белком НАД·Н чувствительна к концентрации кислорода. Флавиномононуклеотид (ФМН) и флавинадениндинуклеотид (ФАД) с максимумами возбуждения около 380 нм и 450 нм также дают вклад в собственную флуоресценцию клетки [251].

Молекулы порфиринов, например протопорфирин, копропорфирин, уропорфирин или гематопорфирин имеют отношение к биосинтезу гемоглобина, миоглобина и цитохромов. Аномалии синтеза гема, возникающие в случаях порфирии и некоторых других гемолитических заболеваний, могут вызывать значительное повышение уровня порфирина в биотканях. Многие бактерии, например *Propionibacterium acnes*, или бактерии зубного налета, такие как *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* и *Prevotella nigrescens*, накапливают значительные количества протопорфирина [254, 255]. Поэтому автофлуоресценция оказывается перспективным методом диагностики и мониторинга кожного акне (угревой сыпи), поражений ротовой полости и зубов.

В настоящее время для исследования анатомии и физиологии клеток можно применять разнообразные экзогенные флуоресцирующие красители [251, 256–259]. На человеке такие красители, как флуоресцеин и индоцианин зеленый, применяются для флуоресцентной ангиографии и определения объема крови. Недавно описаны новые флуоресцентные контрастные агенты для оптической визуализации опухолей *in vivo* на основе платформ векторной доставки красителя к опухолевым клеткам, такие как рецептор-нацеленные конъюгаты краситель–пептид [257] и белки, флуоресцирующие в зеленой области [258]. Исследованы флуоресцентные свойства таких красителей, как альбуминовый синий 633 и 670 в плазме и цельной крови [256]. В работе [259] исследованы экзогенные специфические флуоресцентные маркеры для количественного трехмерного определения локализации опухолей *in vivo*.

Спектры флуоресценции часто содержат подробную информацию о флуоресцирующих молекулах, их конформации, сайтах связывания и взаимодействиях в клетках и тканях. Интенсивность флуоресценции можно измерять либо как функцию длины волны испускаемого света, либо как функцию длины волны возбуждения. Спектр испускания флуоресценции $I_F(\lambda)$ специфичен для каждого флуорофора и обычно используется во флуоресцентной диагностике.

1.6.2. Многофотонная флуоресценция. Новое направление в лазерной спектроскопии и визуализации биологических объектов связано с многофотонной (двух- и трехфотонной) флуоресцентной сканирующей микроскопией, которая позволяет отображать функциональные состояния объекта или, в сочетании с автокорреляционным анализом сигнала флуоресценции, определять внутриклеточную подвижность в малых объемах [15, 20, 260–269]. Метод многофотонной флуориметрии использует как баллистические, так и рассеянные фотоны на длине волны излучения, приходящие точно из фокальной области возбуждающего пучка (см. рис. 1.23, б) [269]. Уникальными преимуществами многофотонной микроскопии является возможность исследования трехмерных распределений хромофоров, обычно возбуждаемых ультрафиолетовым излучением в сравнительно объемных образцах, а также возможность использования широкоапертурных фотоприемников. Например, для двухфотонной микроскопии излучение хромофоров (на длине волны 350 нм) возбуждается лазерным излучением, длина волны которого (700 нм) попадает в область высокой прозрачности биоткани. Возбуждающее излучение может достигать глубоко лежащих слоев и меньше повреждает биоткань. Излучение флуоресценции в этом случае лежит в видимом диапазоне (> 400 нм) и сравнительно легко выходит из биоткани и достигает приемника, который регистрирует только нужный сигнал от фокального

объема без какого-либо постороннего фона. При этом для повышения отношения сигнал/шум сигнал из фокального объема можно собирать по многим направлениям. Пример, приведенный на рис. 1.23, б, соответствует ситуации, характерной при исследовании биотканей, когда ИК-излучение лазера на длине волны 960 нм, хорошо проникающее в ткань, преобразуется в фокальной области лазерного пучка во вторую гармонику 480 нм, которая уже возбуждает излучение флуоресценции соответствующего хромофора в локальной области фокального пятна лазера.

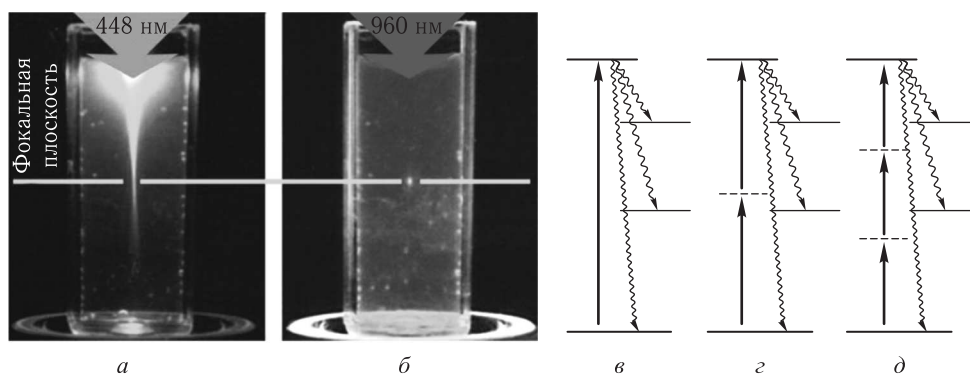


Рис. 1.23. Многофотонная флуоресценция: сравнение однофотонной флуоресценции (а) (яркий конус свечения с перетяжкой примерно в центре кюветы) при возбуждении излучением с длиной волны 488 нм с двухфотонной (б) (светящаяся точка в центре кюветы, отмеченная белой стрелкой) при возбуждении ИК-излучением с длиной волны 960 нм [269]. Схема переходов показывает процессы поглощения и флуоресценции для молекулы: однофотонное поглощение (в), двухфотонное поглощение (г), трехфотонное поглощение (д). Сплошными и штриховыми горизонтальными линиями изображены, соответственно, реальные и виртуальные молекулярные энергетические состояния; сплошные вертикальные стрелки — поглощение фотона, волнистые стрелки — флуоресценция

Скорость двухфотонного возбуждения пропорциональна среднему квадрату плотности фотонов. Эта квадратичная зависимость вытекает из требования, чтобы флуорофор одновременно поглощал два фотона в каждом акте возбуждения. Процесс многофотонного поглощения показаны на рис. 1.23, в, г, д. Чтобы убедиться в многофотонном характере возбуждения, нужно измерить интенсивность флуоресценции как функцию интенсивности возбуждающего света. Двухфотонный процесс возбуждения характеризуется угловым коэффициентом 2 на графике, по осям которого отложены логарифмы измеренных интенсивностей, трехфотонное возбуждение характеризуется наклоном 3 и т. д.

Скорость двухфотонного возбуждения можно выразить аналитически [264]:

$$n_{2f} \approx \frac{P_0^2 \sigma_f}{\tau_p f_p^2} \left[\frac{\pi (NA)^2}{hc\lambda} \right]^2, \quad (1.48)$$

где τ_p — длительность импульса, f_p — частота повторения импульсов, P_0 — средняя падающая мощность, σ_f — сечение поглощения фотона, h — постоянная Планка, c — скорость света, NA — числовая апертура фокусирующей линзы, а λ — длина волны. Эта скорость выражается как число фотонов, поглощенных флуорофором за импульс, и является функцией длительности импульса, частоты повторения импульсов, сечения поглощения фотона и числовой апертуры объектива микроскопа,

фокусирующего свет. Вывод этого уравнения предполагает пренебрежимо малое насыщение флуорофора и справедливость параксиального приближения.

Лазерный свет в микроскопе с многофотонным возбуждением фокусируется объективом микроскопа в фокальный объем. Только в этом объеме интенсивность сфокусированного излучения достаточна для существенного возбуждения. Низкая плотность потока фотонов вне фокального объема приводит к пренебрежимо малому сигналу флуоресценции. Способность микроскопа с многофотонным возбуждением оптически выделять тонкие слои обусловлена нелинейной зависимостью процесса возбуждения от интенсивности и сильной фокусирующей способностью объектива микроскопа. Большинство образцов сравнительно прозрачно в ближней инфракрасной области. Фокусировка объективом микроскопа приводит к многофотонному возбуждению поглощающих в ультрафиолетовом диапазоне флуорофоров в малом фокальном объеме. Сканирование фокального пятна в трех измерениях позволяет получить трехмерные изображения объекта в виде соответствующего распределения сигнала флуоресценции при многофотонном возбуждении. Таким образом, в микроскопе с многофотонным возбуждением неразрушающее оптическое секционирование (аналогичное гистологическим срезам) происходит в процессе возбуждения.

Итак, исследования биотканей и клеток с помощью двухфотонной микроскопии характеризуются следующими типичными параметрами лазерных систем: длина волны от 700 до 960 нм, длительность импульса порядка 150 фс, частота повторения импульсов 76–80 МГц, средняя мощность менее 10 мВт. Такие параметры могут быть обеспечены при использовании лазера на красителе с синхронизацией мод и накачкой Nd:YAG-лазером или титан-сапфирового лазера с накачкой аргоновым лазером. Твердотельные лазеры с диодной накачкой также перспективны для задач двухфотонной микроскопии [260]. Практически такие же параметры лазеров требуются для трехфотонной флуоресцентной микроскопии, которая обладает теми же преимуществами, что и двухфотонная, но гарантирует несколько более высокое пространственное разрешение и обеспечивает возможность возбуждать хромофоры с более короткими длинами волн поглощения [262].

1.7. Действие лазерного излучения на биоткань

1.7.1. Виды фотовоздействий. Взаимодействие света с живой материей определяется как параметрами источника света (интенсивность, длина волны, длительность и частота повторения импульсов и т. д.), так и параметрами биообъекта (степенью его однородности и пигментации, тепловыми и упругими свойствами и т. д.) [1–4, 42, 83–85]. Для выявления степени и характера воздействия излучения на биообъект необходимо учитывать не только значения коэффициентов поглощения и рассеяния соответствующей ткани, но и влияние систем кровеносных и лимфатических сосудов, обуславливающих теплоотвод, и колебательных процессов, связанных с жизнедеятельностью, например влияние циркадных (биологических) ритмов [270].

Взаимодействие света с молекулами биообъекта приводит к их возбуждению (см. рис. 1.2) и последующему (через некоторое время) переходу в основное состояние за счет безызлучательных переходов с выделением тепла. Увеличение температуры приводит к разрыву водородных связей и других ван-дер-ваальсовых связей, к нарушению конформации биомолекул и, следовательно, жизненных функций биообъекта. Происходит коагуляция белковых образований. Дальнейшее повышение температуры при росте мощности излучения приводит сначала к испарению жидких сред (в первую очередь тканевой воды), а затем обугливанию органических компонентов живой материи и выгоранию карбонизированного каркаса.

Локальное повышение температуры за счет воздействия импульсного излучения большой энергии вызывает кипение перегретой жидкости в ограниченном объеме, образование высокого давления (порядка 10^7 Па) и разрушение ткани. Это так называемый безожоговый абляционный механизм разрушения ткани [61, 271, 272]. Возможны и другие механизмы разрушения [2, 7, 42–46, 61, 62, 85]: лавинная ионизация в поле короткого или сверхкороткого лазерного импульса — оптический пробой; ударные акустические (механические) волны, возникающие в тканях при их термическом расширении и образовании пара и плазмы; электрострикция в световом поле.

На рис. 1.24 и 1.25 схематически показаны области существования различных типов взаимодействия лазерного излучения с биообъектами, которые определяются тремя связанными параметрами: плотностью мощности (интенсивностью) I (Вт/см²), плотностью энергии W (Дж/см²) и длительностью воздействия τ_i (с) [62]. Линейные некогерентные эффекты существуют в широкой области значений длительности и интенсивности излучения, при этом плотность энергии для $\tau_i = 10^3$ с не превышает 1 Дж/см². Многофотонные процессы происходят лишь в области значительных интенсивностей и сравнительно малых длительностей импульсов при плотности энергии 10^{-3} – 10^3 Дж/см². Линейные и нелинейные когерентные эффекты возможны лишь при сверхмалых длительностях импульсов, соизмеримых с временами релаксации биомолекул, $\tau \leq 10^{-13}$ с. Нелинейные явления возникают при $I \geq 10^9$ Вт/см², а требуемые энергии сравнительно невелики: не превышают 0,1 Дж/см² при $I \leq 10^{12}$ Вт/см². Представленные диаграммы показывают, какие типы фотовоздействий следует ожидать для выбранного режима работы лазера.

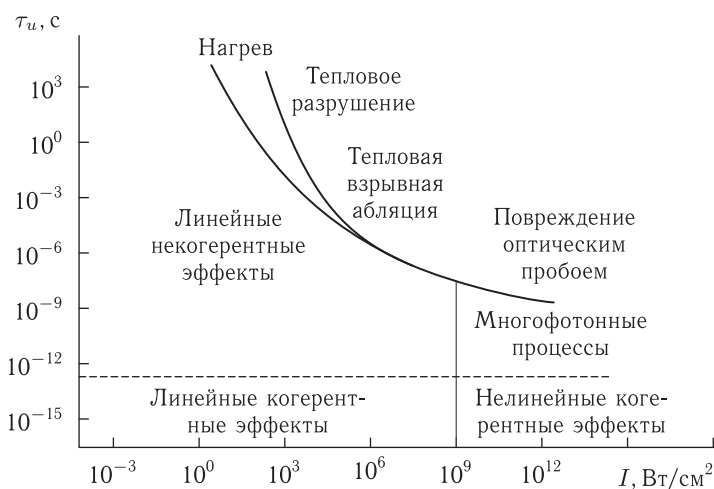


Рис. 1.24. Области доминирующего типа взаимодействия лазерного излучения с биообъектами (схема В. С. Летохова [62])

Регулирование длительности лазерного импульса позволяет осуществить любой из видов воздействия на биоткань. Длительность импульса определяет размеры области теплового воздействия излучения, которые зависят от скорости тепловой диффузии биоткани. Для типичной биоткани лазерные импульсы длительностью $\tau_i = 1$ мкс дают размеры области теплового воздействия $d_T \approx 1$ мкм (т. е. практически не выходят за область, занимаемую сфокусированным лазерным пучком, диаметр которой 10–50 мкм), а при $\tau_i = 10$ мс $d_T = 100$ мкм [46]. Фототепловое разрушение биоткани

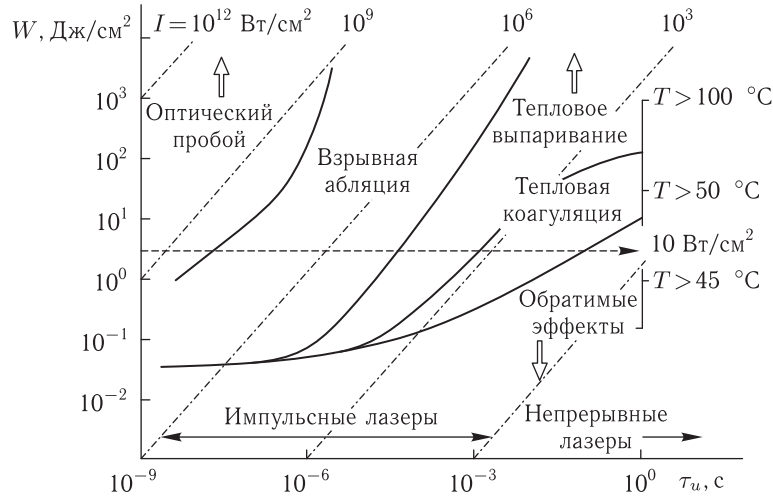


Рис. 1.25. Области доминирующего типа взаимодействия лазерного излучения с биообъектами (схема Д. Слайни [62]) (пунктирная линия соответствует дозе облучения около 3 Дж/см²)

происходит при $\tau_{\text{и}} \approx 10^{-6} - 10^2$ с и $I = 1 - 10^6$ Вт/см², взрывная абляция — при $\tau_{\text{и}} = 10^{-8} - 10^{-6}$ с и $I = 10^7 - 10^9$ Вт/см², а повреждение оптическим пробоем — при $\tau_{\text{и}} = 10^{-11} - 10^{-7}$ с и $I = 10^9 - 10^{12}$ Вт/см² (см. рис. 1.24, 1.25) [43–46, 62].

Очевидно, что характер фотовоздействия высокоинтенсивного лазерного излучения на биоткань определяется ее составом и коэффициентом поглощения на длинах волн облучения. Существенные различия в коэффициентах поглощения мягких и твердых тканей для высокоинтенсивных лазеров, излучающих в ИК- и УФ-диапазоне длин волн, следуют из данных табл. 1.9 [273].

1.7.2. Тепловые эффекты. При поглощении лазерного излучения в биоткани генерируется тепло. Это тепло индуцирует целый ряд эффектов, которые соответствуют различным уровням вкладываемой мощности и приводят либо к некоторому нагреву ткани в пределах физиологических температур, либо к обратимым или необратимым изменениям ее состояния.

Генерируемое тепло, описываемое как источник тепла S в точке \mathbf{r} , пропорционально интенсивности светового потока $\varphi(\mathbf{r})$ (мВт/см²) и коэффициенту поглощения $\mu_a(\mathbf{r})$ в этой точке [2, 3, 14, 75, 148, 275, 276]:

$$S(\mathbf{r}) = \mu_a(\mathbf{r})\varphi(\mathbf{r}). \quad (1.49)$$

Биотепловое уравнение записывается исходя из энергетического баланса в системе, и оно описывает временные изменения температуры биоткани в заданной точке пространства \mathbf{r} :

$$\rho c \frac{\partial T(\mathbf{r}, t)}{\partial t} = \nabla[k_m \nabla T(\mathbf{r}, t)] + S(\mathbf{r}) + \rho c w (T_a - T_v), \quad (1.50)$$

где ρ — плотность ткани (г/см³); c — удельная теплоемкость ткани (мДж/(г·°C)); $T(\mathbf{r}, t)$ — температура ткани (°C) в момент времени t ; k_m — коэффициент теплопроводности ткани (мВт/(см·°C)); $S(\mathbf{r})$ — член, описывающий источник тепла (мВт/см³), определяемый скоростью выделения тепла в точке \mathbf{r} ; w — скорость перфузии крови в ткани (г/(см³·с)); T_a — входящая артериальная температура (°C), а T_v — выходящая венозная температура (°C); все в точке \mathbf{r} ткани.

Таблица 1.9. Состав и коэффициенты поглощения, см^{-1} , некоторых биотканей [194, 197, 273]

| Тип лазера, длина волны | Мягкие ткани ($80 \pm 10\% \text{H}_2\text{O}$) [273] | Кость [273] | | | Зуб (эмаль) | | | Зуб (дентин) [197] | | |
|--------------------------|---|-----------------------------|-------------------------|---|-------------------------|---------------------|--|--------------------------|----------------------|--|
| | | 13–20% H_2O | 20–27% белки (коллаген) | 50–60% минералы $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$ | 4% H_2O | 1% белки (коллаген) | 95% минералы $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$ | 10% H_2O | 18% белки (коллаген) | 72% минералы $\text{Ca}_5\text{OH}(\text{PO}_4)_3$ |
| CO_2 , 10,6 мкм | 700 | 820 | 220 | 3475 | 3340 [273]; 800 [194] | | | 800 [194] | | |
| CO_2 , 9,6 мкм | 580 | 580 | 560 | 5490 | 5240 [273]; 8000 [194] | | | 6500 [194] | | |
| Er:YAG, 2,94 мкм | 9700 | 11850 | 1330 | 650 | 1105 [273]; 800 [194] | | | 2200 [194] | | |
| KrF, 248 мкм | 100–600 | 0,018 | 900 | 120 | — | | | — | | |
| | | 320–350 | | | — | | | — | | |

В этом уравнении не учтены такие явления, как конвекция, излучение, выпаривание, метаболические тепловые эффекты, поскольку во многих практических случаях они пренебрежимо малы. Член, описывающий источник, предполагается неизменным во временном интервале, когда происходит нагрев. Первый член справа от знака равенства описывает проводимость тепла (обычно из точки \mathbf{r}), а член источника учитывает генерацию тепла за счет поглощения фотонов. Обычно, при воздействии лазерного излучения на ткань, перенос тепла за счет перфузии крови (последний член в уравнении) пренебрежимо мал.

Для решения этого уравнения должны быть учтены начальные и граничные условия, соответствующие решаемой задаче. Начальным условием является температура ткани в момент времени $t = 0$, а граничные условия зависят от структуры ткани и геометрии лазерного нагрева. Методы решения *биотеплового уравнения* можно найти в работах [2, 3, 75, 148, 275–278].

Биологическая ткань повреждается при действии на нее высоких температур в течение некоторого времени [2, 3, 75, 275–277]. Функция повреждения выражается в терминах интеграла Аррениуса:

$$\Omega(\tau) = \ln \frac{C(0)}{C(\tau)} = A \int_0^{\tau} e^{-\frac{E_a}{RT(t)}} dt, \quad (1.51)$$

где τ — полное время нагревания (с); $C(0)$ — изначальная концентрация неповрежденной ткани; $C(\tau)$ — остаточная концентрация неповрежденной ткани после периода времени τ ; A — эмпирическая константа; E_a — определяемый эмпирически порог энергии активации (Дж/моль); R — универсальная газовая постоянная (8,32 Дж/моль · К); а T — абсолютная температура (К).

В случае использования лазерного излучения для неинвазивной диагностики или фототерапии необходимо удерживать температуру ниже порога повреждения ткани, ниже так называемой критической температуры T_{crit} . Эта температура определяется как температура, при которой скорость накопления повреждений, $d\Omega/dt$, равна единице [276]:

$$T_{\text{crit}} = \frac{E_a}{R \ln(A)}. \quad (1.52)$$

Константы A и E_a могут быть рассчитаны на основе экспериментальных данных при воздействии на ткань некоторой постоянной температуры [275]. Например, для кожи свиньи $A = 3,1 \cdot 10^{98}$, а $E_a = 6,28 \cdot 10^5$ Дж/моль, что дает $T_{\text{crit}} = 59,7$ °С.

При воздействии непрерывных лазеров, из-за постоянного нарастания разности температур между облучаемой и окружающей тканью, возрастает перенос тепла из области нагрева в соседние участки ткани. В этом случае при больших уровнях энергии излучения могут быть повреждены значительные объемы ткани, а при малых — ожидаются потери тепла в нагреваемых областях. При импульсном нагреве потери тепла обычно существенно меньше за счет того, что поглощение света является очень быстрым процессом, а тепло распространяется существенно медленнее, поэтому оказывается возможным более прецизионное и управляемое повреждение ткани.

При повышении температуры выше критической, T_{crit} , возможны следующие виды необратимых повреждений ткани: коагуляция (денатурация клеточных и тканевых белков), является основой для лазерного сваривания ткани; выпаривание (дегидратация ткани и образование пузырьков пара (вакуолизация), $T \geq 100$ °С), является основой для механической деструкции ткани; и пиролиз (при температурах $T \approx 350$ – 450 °С). Комбинация выпаривания, вакуолизации и пиролиза при-

водит к тепловой абляции ткани — основы для лазерного хирургического удаления ткани.

Итак, вызванные лазерным излучением тепловые эффекты в биотканях соответствуют следующим диапазонам температур, °С, [61]:

| | |
|--|------------|
| Отсутствие необратимых изменений | 37–43 °С |
| Разделение слоев ткани (отек) | 45–48 °С |
| Сваривание ткани, денатурация белков | 45–60 °С |
| Коагуляция, некроз, обезвоживание | 60–100 °С |
| Испарение тканевой воды | 100 °С |
| Пиролиз, выгорание | 100–300 °С |
| Карбонизация твердых компонентов ткани | > 200 °С |
| Испарение твердых компонентов ткани | > 300 °С |

Для коротких лазерных импульсов все эти процессы развиваются взрывным образом. Во время тепловой абляции возникает сильное давление в ткани, что ведет к образованию ударных волн и наряду с тепловой абляцией имеет место механическое повреждение ткани. Эти два тесно связанных явления определяют как фототермический и фотомеханический механизмы абляции ткани. Пример взрывного абляционного разрушения ткани в процессе воздействия лазерного импульса показан на рис. 1.26 [274].

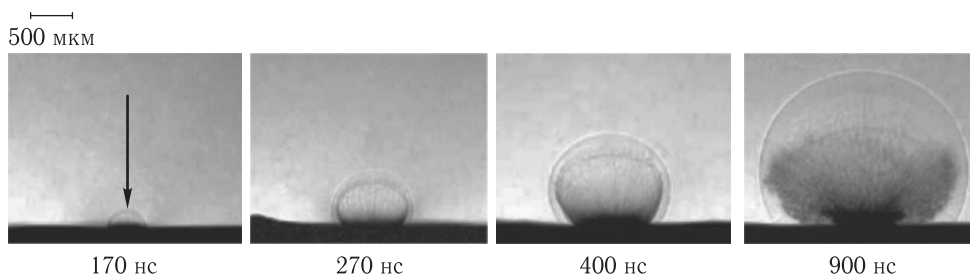


Рис. 1.26. Ранние фазы абляции ткани печени под действием излучения Er:YAG-лазера при плотности энергии $5,4 \text{ Дж/см}^2$ и размере пучка $0,5 \text{ мм}$; стрелка показывает направление лазерного пучка [274]

Многие годы мощное оптическое излучение ламповых источников, лазеров, а теперь и мощных светодиодов, используется для лечения различных патологий в офтальмологии, дерматологии, урологии, отоларингологии и других разделах медицины. Применяется также электромагнитное излучение других диапазонов длин волн, в частности терагерцового или микроволнового. Например, в дерматологии лазеры обеспечивают большое разнообразие косметических и дерматологических операций, связанных с удалением пигментных пятен, поверхностных вен, морщин, нежелательных волос, татуировок и пр. Для выполнения таких процедур необходимо нагреть с помощью соответствующего излучения естественные (эндогенные) или специально введенные в ткань (экзогенные) поглотители. Эндогенные поглотители включают воду, меланин, гемоглобин, белки, липиды и прочие компоненты биотканей; экзогенные — различные красители, цветные туши, карбоновые частицы, в последние годы наночастицы — от карбоновых (фуллерены) до плазмонных золотых.

В том случае, если биологическая мишень и поглотитель занимают одну и ту же область в ткани, то процессы фотодеструкции хорошо описываются в рамках теории селективного фототермолиза (СФТ) [279]. Эта теория позволяет количественно

рассчитать оптимальный режим теплового повреждения ткани-мишени, при котором окружающие ткани остаются интактными.

Теория СФТ базируется на трех общих принципах:

1. *Длина волны излучения должна быть выбрана исходя из обеспечения максимального контраста поглощения излучения мишенью по сравнению с окружающей тканью или конкурирующими мишенями.* Например, при воздействии на волосяные фолликулы (при удалении волос или лечении акне) хромофором-мишенью является меланин в волосяном стержне и матриксе или краситель, внедренный в сальную железу [281, 282]. Конкурирующими хромофорами являются гемоглобин крови, вода и липиды, а также меланин эпидермиса. В первом приближении оптимальная длина волны может быть выбрана в соответствии со спектрами основных хромофоров биотканей, представленных на рис. 1.6–1.8. Дополнительным фактором селекции длины волны является глубина проникновения света и глубина залегания биологической мишени. Например, такая мишень, как матрикс волосяной луковицы, расположен на глубине 2–5 мм в подкожной жировой клетчатке, а стволовые клетки — на глубине около 1 мм.

2. *Длительность импульса излучения должна быть выбрана исходя из обеспечения максимального контраста нагрева мишени по сравнению с окружающей тканью.* Для выполнения этого условия длительность импульса излучения t должна быть меньше времени тепловой релаксации (TRT) для всей мишени. TRT — это время остывания мишени до температуры в e ($= 2,7$) раз меньшей той, что достигается при ее быстром адиабатическом нагреве:

$$\text{TRT} \approx \frac{d_1^2}{F a_T}, \quad (1.53)$$

где d_1 — размер мишени в мм или см, a_T — коэффициент термодиффузии (температуропроводности) биоткани ($a_T \approx 0,1 \text{ мм}^2\text{с}^{-1} = 0,001 \text{ см}^2\text{с}^{-1}$ для дермы), а F — геометрический фактор ($F = 8, 16$, или 24 , соответственно для планарной, цилиндрической или сферической форм мишени). Действительно, если выполнено условие, что $t \ll \text{TRT}$, генерируемое за счет поглощения внутри мишени тепло не уходит за пределы этой структуры и можно обеспечить локализованное тепловое действие на мишень с коагуляцией или другим видом ее повреждения. Такой подход гарантирует как селективность воздействия, так и минимальный вклад оптической энергии.

3. *Плотность энергии импульса должна быть достаточной для коагуляции или абляции мишени.*

Для описания более сложных и практически важных случаев, когда биологическая мишень и поглотитель (тепловой источник) пространственно разделены, была предложена модифицированная теория СФТ [280], которая учитывает теплообмен между пространственно-разделенными источником и мишенью. При этом для исключения фазовых превращений ткани и таких деструктивных процессов, как ее обесцвечивание, плавление, кипение и образование пузырьков, затрудняющих управляемый нагрев, вводится ограничение на амплитуду и длительность импульсов излучения. Итак, для предотвращения нежелательных тепловых эффектов температура источника тепла (поглотителя) не должна превышать определенной величины, $T_{1 \text{ max}}$, называемой температурой потерь поглощения источником тепла. Такая температура для большинства эндогенных хромофоров (например, меланина, гемоглобина и воды) превышает 100°C . Одновременно, для обеспечения необратимого повреждения всей ткани мишени, температура должна превышать некоторую *температуру повреждения*, T_2 (см. соотношение (1.52), $T_2 = T_{\text{crit}}$), в пределах всей области мишени. Для коллагена кожи человека, T_2 порядка $65\text{--}75^\circ\text{C}$, а для клеток T_2 — около 60°C при условии, что время экспозиции составляет несколько десятков миллисекунд.

Для обеспечения такого температурного режима лазерные импульсы должны быть достаточно длинными, чтобы вложить необходимую для нагрева энергию. Необходимо также выбором длины волны обеспечить более или менее равномерную генерацию тепла в пигментированных областях в течение импульса излучения с одновременным максимально возможным поглощением, что достижимо при условии $1 < \mu_a d_1 < 3$, где d_1 — размер пигментированной области. Необходимо ввести такой параметр, как *время теплового поражения* (TDT) мишени, которое соответствует промежутку времени, в течение которого происходит необратимое повреждение ткани мишени без повреждения соседних участков ткани. Очевидно, что оптимальная длительность импульса излучения, t_0 , должна быть короче или равна TDT.

Рисунок 1.27 иллюстрирует обобщенную структуру мишени, которая повреждается за счет выделения и переноса тепла от поглотителя (источника тепла). В качестве конкретного примера моделирования передачи тепла от поглотителя к мишени на рис. 1.28 представлены расчеты для сильно пигментированного цилиндра диаметром d_1 с окружающей его областью воздействия диаметром d_2 . Такая простая модель довольно хорошо воспроизводит модель теплового разрушения волосяного фолликула или кровеносного сосуда. Моделирование проведено для двух видов нагрева: путем использования прямоугольного импульса излучения (рис. 1.29, а) или импульса, который дает температурный импульс с плоской вершиной (рис. 1.29, в). В случае прямоугольного импульса излучения температура источника тепла нарастает в процессе импульса излучения и достигает значения T_1 в конце импульса (рис. 1.29, б). В случае температурного импульса с плоской вершиной температура источника тепла постоянна в течение всего импульса излучения, что требует создания импульса лазерного излучения специальной формы (рис. 1.29, в). Для обоих видов нагрева, температура источника тепла ниже температуры $T_{1\max}$, при которой меняется (уменьшается) коэффициент поглощения поглотителя.

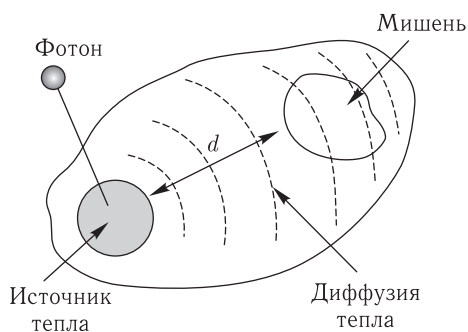


Рис. 1.27. Общая структура биологической мишени, которая повреждается (денатурируется) за счет диффузии тепла от источника тепла; источником тепла может быть эндогенный или экзогенный хромофор (пигмент), имеющий высокий коэффициент поглощения для воздействующего лазерного излучения; сама мишень в данном случае имеет малый коэффициент поглощения; расстояние между источником тепла и мишенью равно d [148]

Последовательность тепловых профилей в течение процесса лазерного нагрева представлена на рис. 1.28. Входные параметры для моделирования: $d_1 = 70$ мкм, $d_2 = 210$ мкм, температура $T_1 = 100$ °С (температура кипения воды). *Температура повреждения* $T_2 = 65$ °С, что соответствует средней температуре денатурации белков в диапазоне длительностей импульсов порядка 10–1000 мс. Предполагалось, что излучение поглощается только источником тепла, а все компоненты ткани имеют одинаковые тепловые свойства. Диффузия тепла происходит одновременно с повыше-

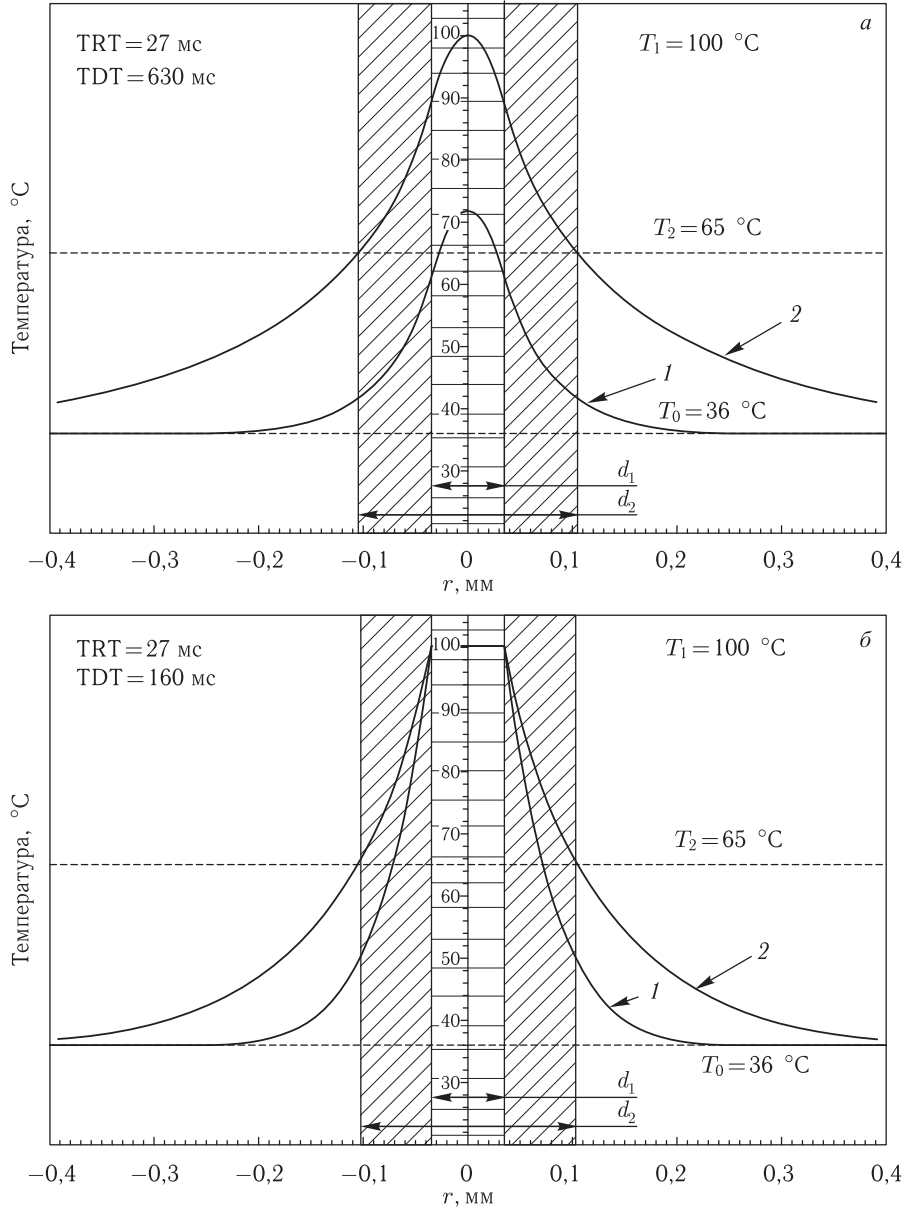


Рис. 1.28. Температурное распределение в ткани, содержащей цилиндрический поглотитель с диаметром 0,07 мм и окружающего его биологическую мишень диаметром 0,21 мм [280]: распределение температуры для прямоугольного импульса излучения для двух моментов времени, нижняя кривая для $t = TRT = 27,5$ мс, а верхняя — для $t = TDT = 1,6$ с (а); распределение температуры при возбуждении температурного импульса с плоской вершиной для двух моментов времени, нижняя кривая для $t = TRT = 27,5$ мс, а верхняя — для $t = TDT = 0,36$ с (б). Максимальная температура поглотителя $T_1 = 100$ °C; температура, при которой наступают повреждения ткани $T_2 = 65$ °C; начальная температура $T_0 = 37$ °C. При расчетах пренебрегали поглощением света в среде вокруг источника тепла (поглотителя)

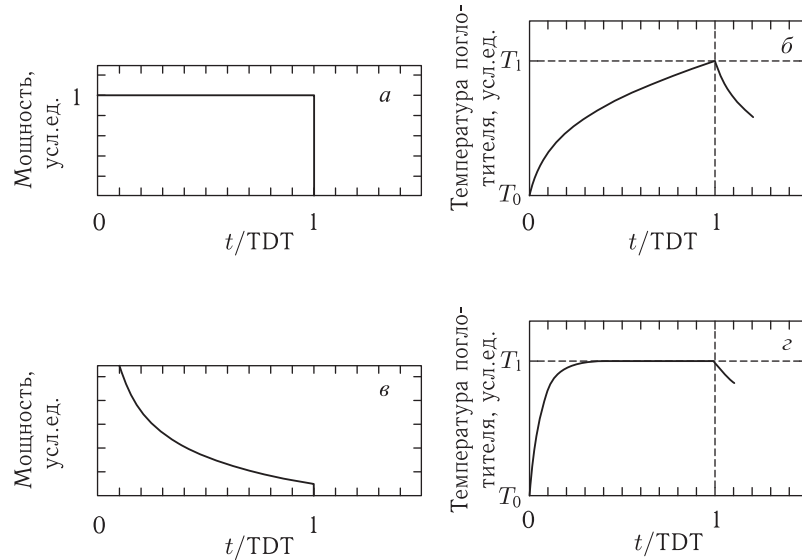


Рис. 1.29. Временные зависимости мощности лазерного излучения (EMR) и температуры источника тепла (поглотителя) [280]. Показаны два основных случая: прямоугольный лазерный импульс (*a*) и соответствующий температурный импульс источника тепла (*б*); а также импульс излучения, который возбуждает температурный импульс с плоской вершиной (*в*) и сам температурный импульс с плоской вершиной (*г*)

нием температуры источника тепла за счет поглощения лазерного излучения. Этот процесс хорошо описывается в рамках уравнения теплопроводности.

Кривые 1 на обоих рис. 1.28, *a* и рис. 1.28, *б* представляют собой температурные профили в момент времени, равном времени тепловой релаксации для всей мишени целиком, $TRT = 27$ мс. Видно, что в этот момент времени температура на границе мишени еще существенно меньше повреждающей температуры. Соответственно, кривые 2 представляют момент времени, когда температура на границе мишени достигает значения повреждающей температуры T_2 . К этому моменту вся ткань мишени повреждена, однако окружающая ткань остается еще интактной. Это и есть время теплового повреждения TDT, которое для прямоугольного лазерного импульса равно 0,63 с, а для специального температурного импульса с плоской вершиной — 0,16 с.

На основе приведенного примера можно сделать два следующих важных вывода: 1) отношение TDT/TRT , соответственно, порядка 23 и 6 для прямоугольного лазерного импульса и для специальной формы импульса, индуцирующего температурный импульс с плоской вершиной, т. е. в обоих случаях длительность лазерного импульса $t = TDT$ существенно больше, чем время тепловой релаксации мишени целиком, TRT ; 2) в момент времени $t = TDT$ нагреваемая область существенно больше, чем повреждаемая мишень.

В этом состоят существенные отличия данной теории от классического определения селективного фототермолиза, что является следствием пространственного разделения областей поглощения и воздействия, при котором именно контролируемая диффузия тепла обеспечивает повреждение ткани. Конечно, диффузионный фронт не является крутым, поэтому часть тепла распространяется вне очага поражения, однако повреждение все еще достаточно селективно.

Отметим, что при определенных условиях взаимодействие лазерного пучка с биотканью может быть эффективным за счет мгновенного выпаривания жидкости в объеме, занятом сфокусированным лазерным пучком, в случае сильного поглощения света в жидкости, значительной энергии импульсов света ($E_{\text{и}}$) и высокой частоте их повторения (f) [46]. Глубина (h) незаполняемой биожидкостью полости, образованной за счет выпаривания, определяется соотношением

$$h \approx A \left(\frac{E_{\text{и}}}{f} \right)^{2/3}, \quad (1.54)$$

где A — константа.

Причина образования полости и постоянство во все время действия лазерного излучения (серия импульсов) ее объема заключается в таком подборе параметров излучения, когда каждый последующий импульс испаряет всю жидкость, попавшую в образованную полость за время между импульсами $1/f$. Поскольку большинство биотканей на 70–80 % состоят из воды, то все высокоинтенсивные лазеры, излучающие на длинах волн вблизи сильных полос поглощения воды, например эрбиевый ($\lambda = 2,94$ мкм), гольмиевый ($\lambda = 2,1$ мкм), СО-лазер ($\lambda = 5$ мкм) и СО₂-лазер ($\lambda = 10,6$ мкм), эффективно и локально испаряют ткань за счет поглощения воды. Например, излучение СО₂-лазера ($\lambda = 10,6$ мкм) при энергии импульсов $E_{\text{и}} = 30$ мДж и $f = 500$ Гц проникает в ткань (за счет ее последовательного испарения) на глубину $h = 2$ мм, в то время как низкоинтенсивное излучение этого лазера проникает в глубь ткани всего в пределах нескольких клеточных слоев. Для гольмиевого лазера с $\lambda = 2,1$ мкм, используя эффект выпаривания, удается осуществить абляцию биоткани, закрытую слоем жидкости (кровь, физиологический раствор) толщиной до 3 мм. Аналогичные явления наблюдаются и для лазеров, работающих в УФ-области спектра, где биожидкости и ткани имеют значительное поглощение.

С другой стороны, селективный нагрев биоткани позволяет осуществлять мониторинг фотовоздействия с помощью тепловой визуализации, которая основана на восприятии ИК-излучения, испускаемого всеми объектами при любой температуре выше абсолютного нуля [278]. Такое излучение обусловлено молекулярными переходами из состояний с более высокой энергией в состояния с более низкой энергией, и для конденсированных сред распределение его энергии по длине волны описывается кривой Планка. При нормальной температуре человеческого тела пик кривой Планка попадает в средний ИК-диапазон длин волн между 9 и 10 мкм.

Функция Планка экспоненциально нелинейная по температуре, из нее следует, что низкотемпературные объекты излучают на порядки меньше энергии, чем высокотемпературные. Тело человека принадлежит к низкотемпературным объектам, поэтому точное измерение его ИК-излучения — непростая задача. Более того, обычно тело человека и его окружение излучают сравнимые количества энергии, что приводит к дополнительным трудностям при измерениях. Отношение сигнал–шум обычно невелико, и для детектирования сигнала требуется специальное оборудование для коррекции фона, методы синхронизации при обработке измерений и тщательный анализ полученных данных. За последние 10 лет технология матричных ИК-приемников, техника обработки изображений и снижения шумов были существенно усовершенствованы. Обзор инфракрасных камер, подходящих для получения тепловых изображений в медицине, приведен в работе [278]. В настоящее время точность экспериментального определения изменений температуры достигла 10^{-3} К, что с лихвой удовлетворяет задаче мониторинга лазерных тепловых воздействий на биоткань.

Инфракрасный термограф IRISYS 4010 на основе болометрического матричного приемника был использован для неинвазивного мониторинга температуры поверхности кожи лабораторных животных при исследовании оптимальных режимов лазер-

ного разрушения опухолей [283–285]. Термограф позволял получать изображения тепловых полей на поверхности объектов в широком диапазоне температур от -10 до $+250$ °С, с разрешением порядка $0,15$ °С. Система достаточно быстра (8 кадров в секунду), что позволяет проводить исследования *in vivo*. Поскольку диапазон длин волн термографа (8–14 мкм) лежит далеко от используемого лазерного излучения (808 нм), то рассеянное лазерное излучение не влияло на тепловизионные измерения.

Этот термограф был использован для исследований *in vivo* температурных полей, возникающих при взаимодействии лазерного излучения с биотканями при их сенсбилизации плазмонными наночастицами, эффективно поглощающими на длине волны лазерного излучения [283–285]. Суспензии частиц инъецировались в ткань, тем самым искусственно создавалась мишень для воздействия лазерного пучка. На рис. 1.30 хорошо видно, что нагрев происходит быстрее и до более высоких температур при сенсбилизации ткани наночастицами. Скорость нагрева — один из ключевых моментов при лечении раковых опухолей, важно и само значение температуры, которое должно лежать в диапазоне 46 – 50 °С (для запуска механизмов саморазрушения опухоли) или несколько выше для прямой деструкции ткани. В описываемых экспериментах при наличии наночастиц в ткани нагрев происходил до температуры 46 °С за 15 – 20 с, в то время как без наночастиц при тех же параметрах лазерного излучения аналогичный нагрев ткани был почти в десять раз более медленным, 3 – 4 мин.

Интересно, что в присутствии наночастиц обе кинетические кривые нагрева ткани излучением непрерывного (выходная мощность 2 Вт) и квазинепрерывного (длительность импульса 1 мс, скважность $0,25$, пиковая мощность 8 Вт) лазеров имеют локальный максимум в момент времени 60 с (рис. 1.30). Это может быть связано с компенсаторной реакцией живого организма на температурное возмущение, которая имеет характеристическое время порядка 100 с. Важно отметить, что квазинепрерывный нагрев одномоментными импульсами более управляем на больших временных масштабах, а на малом интервале времени кинетика при непрерывном и импульсном нагревах одинаковая. В этом смысле нагрев одномоментными импульсами в квазинепрерывном режиме более предпочтителен, поскольку имеет сравнимую с непрерывным лазером быструю кинетику нагрева на коротких временах, и насыщение роста температуры на больших промежутках времени.

На рис. 1.31 (цветная вклейка) представлены термограммы поверхности кожи лабораторных крыс при действии лазерного излучения на ткани с внедренными частицами под кожу и в мышечную ткань, полученные *in vivo*. Приведены также соответствующие гистологии материала биопсий, взятых со здоровых и облученных участков ткани через 24 часа после лазерного воздействия. На контрольных образцах не видны какие-либо патологические изменения (рис. 1.31, а и 1.31, е). В то же время в областях воздействия лазерного излучения как для кожи (рис. 1.31, в), так и для мышечной ткани (рис. 1.31, з), видны существенные изменения: частичное разрушение эпидермиса, образование пузырьков, заполненных серозной жидкостью,

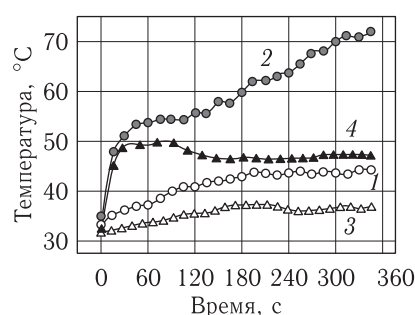


Рис. 1.30. Измеренные *in vivo* временные зависимости температуры кожи крысы при лазерном нагреве с помощью излучения непрерывного (●, ○) и квазинепрерывного импульсного (▲, △) диодных лазеров (808 нм), 1, 3 — без наночастиц, 2, 4 — с внедренными золотыми наночастицами (кварц/золото, $140/20$ нм), подкожная инъекция суспензии наночастиц [283]

сильный отек дермы с дезориентацией коллагеновых волокон; отек мышечной ткани, гиперемия и инфильтрация лейкоцитов.

ИК-термограммы показывают, что через 30 с лазерного воздействия достигается максимальная температура в центре лазерного пучка на поверхности кожи на уровне 65,1 °С (рис. 1.31, б). Для внутримышечного введения наночастиц поверхностная температура была всего 51,3 °С (рис. 1.31, д); очевидно, что внутренняя температура в области скопления наночастиц превышала порог повреждения ткани, что хорошо видно на рис. 1.31, е.

Представленные на рис. 1.32 (цветная вклейка) фотографии наглядно иллюстрируют приложение обсуждаемой фототермической технологии для удаления раковых опухолей на примере плоскоклеточного рака кожи собаки. Для селективной и усиленной деструкции раковых клеток золотые наноболочки инжестировались непосредственно в опухоль, и далее опухоль облучалась излучением одномиллисекундного импульсного диодного лазера (808 нм), работающего в квазинепрерывном режиме. Обычно для удаления подобных опухолей необходимо обеспечить среднюю плотность мощности 1–3 Вт/см² с полной энергетической дозой 100–200 Дж/см² [285].

Следуя работе [286], кратко проанализируем на физиологическом уровне тепловые эффекты в нормальной и опухолевой тканях. При росте температуры вблизи 40 °С увеличивается скорость кровотока как в опухоли, так и здоровой ткани. Температура, равная 41,5 °С, является токсичной для опухолевых клеток, а температура выше 42,5 °С может привести к повреждению опухолевой ткани. Влияние температуры резко увеличивается при достижении 43 °С; скорость гибели клеток удваивается на каждый 1 °С роста температуры выше 43 °С. Было установлено, что опухолевая ткань более чувствительна к изменению температуры, чем здоровая. При этом существенным является более высокая кислотность (низкие значения рН) опухолевой ткани за счет ее пониженной оксигенации.

В последние годы уделяется большое внимание нагреву клеток как специфическому иммуномодулятору: температура тела в диапазоне 39–40 °С (температура лихорадочного состояния) может модулировать активность иммунокомпетентных клеток, включая клетки, содержащие антигены, Т-клетки и клетки-киллеры. Несколько более высокая температура в диапазоне 41–43 °С (температура теплового шока), может увеличить иммуногенность опухолевых клеток. Цитотоксическая температура соответствует температурам выше 43 °С, когда может возникать антигенный источник, индуцирующий антиопухолевый иммунный отклик.

Как мы уже убедились, лазерная фототерапия с использованием естественных поглотителей-источников тепла (например, меланина в меланоме) или экзогенных сенсibilizаторов, таких как сильно поглощающие свет наночастицы золота, может обеспечить высокие уровни повышения температуры локально в опухоли без сильного нагрева окружающей здоровой ткани. Это приводит к непосредственному разрушению раковых клеток и выделению большого количества опухолевого антигена, который способствует формированию антиопухолевого иммунитета.

Впервые в работе [287] было предложено для селективного нагрева опухоли лазерными излучением использовать краситель индоцианин зеленый, который имеет уникально высокий коэффициент поглощения на длине волны, практически совпадающей с длиной волны мощных диодных лазеров (800–808 нм), излучение которых глубоко проникает в любые биологические ткани. Именно эта пара — индоцианин зеленый и диодный лазер (805 нм) успешно использовались для теплового разрушения привитых опухолей крыс как *in vitro*, так и *in vivo* [286, 287].

Антигены, индуцируемые теплом, включают антигены, ассоциированные с опухолью, белки теплового шока и большое количество собственных антигенов. Клетки, вырабатывающие антигены, такие как дендритные иммунно-компетентные клетки,

могут захватить эти антигены и мигрировать в лимфатические узлы. Они передают антигены Т-клеткам, которые уже индуцируют иммунный ответ, который может быть эффективным в борьбе с раковыми клетками.

Конечно, из-за сильного угнетения иммунной системы раковых больных, может оказаться, что биологически активных остатков от разрушенных при лазерном воздействии раковых клеток недостаточно для возбуждения требуемого антиопухолевого ответа. В этом случае возможно использование дополнительной местной иммунологически активной интервенции уже химических или биологических препаратов [286]. Таким образом, технология лазерной антираковой термотерапии может включать в себя не только селективный нагрев клеток опухоли, сенсibilизированных красителем или металлическими наночастицами, с ее последующим разрушением, но и добавление препаратов, вызывающих соответствующий иммунный ответ.

Важным компонентом такой технологии является и адресная доставка красителей или наночастиц к клеткам-мишеням (раковым клеткам, например). Красители могут помещаться в полимерные микро- или наноконтейнеры [288], а к поверхности этих контейнеров или металлических наночастиц можно присоединять специфические биомолекулы, распознающие клетки-мишени [289]. Это так называемая функционализация наночастиц, которая для металлических частиц осуществляется путем физической адсорбции на поверхности частиц олигонуклеотидов, антител, углеводов и прочих [289]. Такие наноструктуры называются биоконъюгатами. Итак, молекула-зонд конъюгата используется для адресного связывания с клеткой-мишенью, а металлическая сердцевина — как оптический маркер клетки и/или поглотитель лазерного излучения.

Другие примеры применения лазерного излучения для фотодеструкции патологических тканей можно найти в ряде монографий [2, 7, 14, 17, 25, 30, 36, 39, 41, 75, 85, 205, 290–292].

1.7.3. Фотодинамическое и фотохимическое воздействие. Большинство фотохимических реакций происходит под действием света коротких длин волн ($\lambda < 320$ нм) (см. рис. 1.2). Многим биосистемам свойственны реакции фотодиссоциации (расщепление молекулы на радикалы и ионы) и фотоприсоединения (связывание двух мономерных молекул). Различают фотодимеризацию — присоединение такой же молекулы, находящейся в невозбужденном состоянии; фотогидратацию — присоединение молекулы воды; фотоокисдирование — присоединение молекулы кислорода [4]. Если под действием света возбужденная молекула отдает свой электрон невозбужденной молекуле, то это реакция фотоокисления, а если возбужденная молекула получает электрон — фотовосстановления. Указанные реакции приводят к структурным изменениям биообъекта, включающим и процессы фоторазрушения.

Управление биохимическими процессами с помощью света лежит в основе лазерной терапии. Использование лазерного света принципиально при многофотонном возбуждении, для осуществления которого необходима очень высокая плотность фотонов, практически недостижимая для обычных источников света [53]. Нужно, чтобы скорость возбуждения $W_{\text{воз}}$, пропорциональная плотности фотонов, была выше скорости релаксации возбуждаемого уровня, $1/\tau_{S,T}$. Первые две схемы на рис. 1.33 являются основными для линейной однофотонной фотобиологии; возбужденная молекула либо принимает участие в химической реакции (рис. 1.33, а), либо передает свое возбуждение другой молекуле, участвующей в химических превращениях (рис. 1.33, б).

Третья схема (рис. 1.33, в) является основной для нелинейной многофотонной фотобиологии и реализуется при таких интенсивностях лазерного излучения, когда молекула может поглотить более чем один фотон [293, 294].

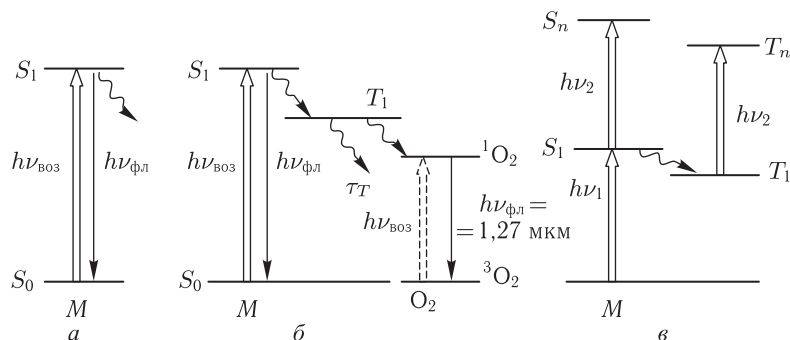


Рис. 1.33. Типы фотохимической модификации биомолекул: *а* — однофотонное возбуждение, сопровождающееся флуоресценцией и фотохимической реакцией; *б* — однофотонное возбуждение молекул сенсбилизатора, сопровождающееся флуоресценцией и передачей возбуждения на кислород с последующей модификацией биологической молекулы при ее взаимодействии с синглетным кислородом; *в* — двухфотонное возбуждение высоколежащих синглетных и триплетных уровней и последующая фотомодификация или перенос возбуждения другим молекулам [53]

Однофотонные фотобиохимические процессы лежат в основе терапии желтухи новорожденных (избыточной концентрации билирубина), фототерапии или фотохимиотерапии различных заболеваний кожи [43–46, 83, 86, 205, 295–298] и фотодинамической терапии (ФДТ) опухолей и других заболеваний с использованием гематопорфирина, фталоцианина и других фотосенсибилизаторов [6, 43–46, 54–56, 68, 83, 205, 208, 295, 299–308]. Введенные в организм производные гематопорфирина (ПГП) или фталоцианина имеют тенденцию избирательно накапливаться в опухолевых клетках, что связано с их высокой пролиферативной активностью. Молекулы ПГП хорошо возбуждаются видимым светом (рис. 1.34) и могут через свое триплетное состояние передавать энергию возбуждения присутствующим в тканях молекулам кислорода (рис. 1.33, *б*). В свою очередь, молекулы кислорода возбуждаются в химически активное синглетное состояние ($^1\text{O}_2$) и разрушают клетки. В этом состоит один из механизмов фотодинамической терапии, реализуемый в основном для гидрофобных фотосенсибилизаторов. Другой механизм, характерный для гидрофильных фотосенсибилизаторов, заключается в разрушении сосудистой системы биоткани. Избирательность накопления ПГП в опухолях через 2–3 суток после введения в организм составляет 5 : 1. Наиболее активный компонент из ПГП (фотофрин II) имеет еще большую избирательность — 10 : 1 [309].

ПГП хорошо поглощают свет с длиной волны около 620 нм, который довольно глубоко проникает внутрь биоткани. Активно ведется поиск новых фотосенсибилизаторов, поглощающих в длинноволновой видимой и ближней ИК-областях спектра (металлокомплексы порфиринов, фталоцианины и т. д.) и тем самым способствующих эффективному разрушению глубоколежащих опухолей (рис. 1.34), в том числе и через кожу, а также таких фотосенсибилизаторов, которые эффективно инактивируют в крови лейкоэмические клетки (анионные красители), вирусы, бактерии и простейшие [6, 54, 296, 302, 303, 305, 306, 310].

Например, высокая степень чистоты Zn^{2+} -фталоцианина и значительный коэффициент поглощения на длине волны 680 нм позволяют иметь значительную эффективность фототерапии при вводимых дозах препарата порядка 0,15–0,25 мг на килограмм веса пациента, что в 10 раз меньше аналогичных доз при использовании фотофрина II [6]. Важным является и время накопления красителя в патологических

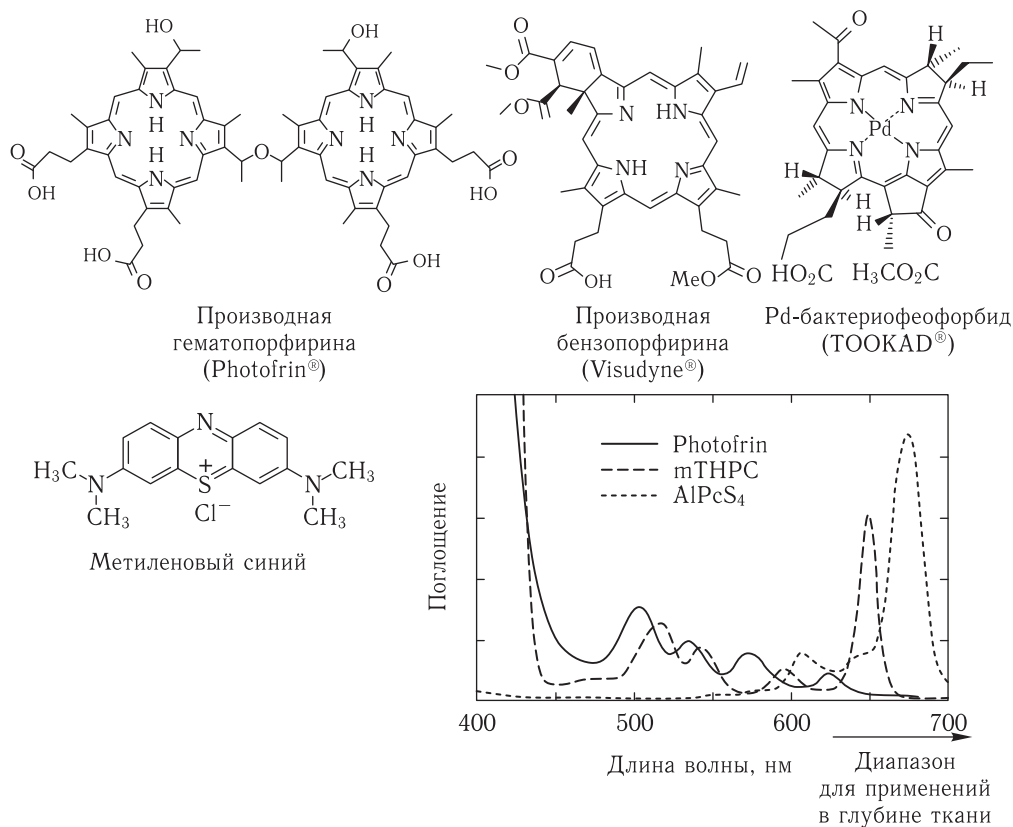


Рис. 1.34. Молекулярные структуры и спектры поглощения некоторых фотосенсибилизаторов для ФДТ [306]: производная гематопорфирина (Photofrin®); производная бензопорфирина (Visudyne®); Pd-бактериофеофорбид (TOOKAD®); метиленовый синий; mTHPC (м-тетрагидроксифенилхлорин); AlPcS₄ — фталоцианин

клетках; например, для фталоцианина (AlS₂Pc) уже через 2–4 ч после введения интенсивность флуоресценции (возбуждение на $\lambda = 650\text{--}670$ нм) патологической ткани (MS-2 фибросаркома) экспериментального животного оказывалась максимальной при дозе $0,5\text{--}1$ мг · кг⁻¹ [6].

В так называемой реакции типа II (рис. 1.33, б) синглетный кислород образуется из растворенных в клетках молекул кислорода, находящихся в основном состоянии (³O₂), при их переводе в возбужденное состояние благодаря обмену энергии с триплетным состоянием (T₁) молекул фотосенсибилизатора. Само триплетное состояние фотосенсибилизатора формируется при внутримолекулярном переходе из состояния (S₁), которое возбуждается за счет поглощения фотонов света молекулами фотосенсибилизатора, находящимися в основном состоянии (S₀). Типичные спектры поглощения молекул фотосенсибилизаторов и их структурные формулы показаны на рис. 1.34. В этом процессе состоянии S₀ молекул фотосенсибилизатора регенерирует, так что цикл может быть повторен. Для данной молекулы процесс может быть повторен много тысяч раз в течение одной процедуры облучения, поэтому, фактически, фотосенсибилизатор служит катализатором конверсии энергии света в энергию возбужденного химически активного состояния кислорода ¹O₂. Затем

уже только молекулы $^1\text{O}_2$ ответственны за каскад химических изменений в биомолекулах-мишенях в клетках или тканях, которые в свою очередь приводят к ряду биологических эффектов. Примерные интервалы времени для существования физических, химических и биологических процессов при ФДТ показаны на рис. 1.35.

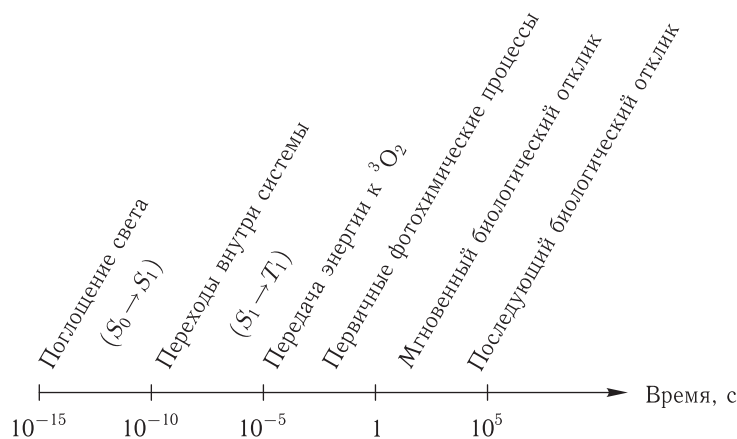


Рис. 1.35. Порядок величин временных интервалов для последовательности событий в фотодинамической терапии: поглощение света, переходы внутри системы, передача энергии кислороду, первичная фотохимия, мгновенный биологический отклик, последующий биологический отклик [306]

Для максимальной эффективности фотодинамического эффекта фотосенсибилизатор должен обеспечивать высокий квантовый выход синглетного кислорода, близкий к 100%. Поскольку переход $T_1 \rightarrow ^3\text{O}_2$ является разрешенным квантово-механическим переходом (нет изменений спина), то, как правило, фотосенсибилизаторы имеют достаточно высокий квантовый выход молекул $^1\text{O}_2$. Энергетический зазор между возбужденным и основным состоянием для молекул кислорода близок к 1 эВ, эта энергия и определяет предельное значение энергии фотона, которая требуется для запуска фотодинамической реакции типа II. На практике эффективная генерация $^1\text{O}_2$ ограничивается немного более высокими значениями энергии, на уровне 1,5 эВ. Это соответствует длинам волн излучения, равным или короче 800 нм. На сегодняшний день наибольшая длина волны, используемая в клинических исследованиях ФДТ с применением фотосенсибилизатора бактериофеофорбида (ТООКАД), равна 763 нм [306].

Для реакции типа I химические изменения биомолекул связаны с их взаимодействием непосредственно с молекулами фотосенсибилизатора в возбужденных синглетном (S_1) или триплетном (T_1) состояниях без участия кислорода. Химические изменения для этой реакции существенно отличаются от тех, что имеют место для реакции типа II, хотя последующие биологические эффекты могут быть подобными. В оптимальном режиме ФДТ, когда используется эффективный фотосенсибилизатор и достаточно растворенного кислорода в ткани, реакция типа II является основной.

Различные возбужденные состояния, представленные на рис. 1.33, могут распадаться либо с излучением света видимого или ближнего ИК, либо без излучения (за счет передачи энергии внутри молекулы, $S_1 \rightarrow T_1$, на кислород $T_1 \rightarrow ^3\text{O}_2$, или столкновений с другими молекулами с выделением тепла, τ_S и τ_T). Переход $S_1 \rightarrow S_0$ соответствует флуоресценции молекул фотосенсибилизатора, что является основой фотодинамической диагностики (ФДД). Чем выше квантовый выход $^1\text{O}_2$, тем ниже

выход флуоресценции, однако квантовый выход на уровне нескольких процентов вполне достаточен для флуоресцентной спектроскопии и визуализации, несколько клинически используемых фотосенсибилизаторов попадают в эту категорию. Это оказывается полезным не только для флуоресцентной диагностики (маркирования границ опухоли на клеточном уровне), но также для определения количества накопленного фотосенсибилизатора в клетках перед проведением ФДТ и дозиметрии лазерного излучения путем мониторинга фотобличинга. Типичное время жизни флуоресценции для фотосенсибилизаторов ФДТ лежит в наносекундном диапазоне.

Излучательный переход молекул кислорода $^1\text{O}_2 \rightarrow ^3\text{O}_2$, т. е. переход синглетного кислорода обратно в основное (триплетное) состояние, соответствует длине волны 1270 нм. Поскольку это запрещенный переход, он имеет слабое излучение, которое может быть зарегистрировано специальными фотоумножителями ИК-диапазона, что является основой метода ФДТ-дозиметрии с использованием люминесценции синглетного кислорода (SOLD — singlet oxygen luminescence dosimetry) [306]. Время жизни $^1\text{O}_2$ в воде около 3 мкс. В биологических средах, таких как клетки или ткань, время жизни может быть на порядок меньше. Из-за сильной реакционной способности $^1\text{O}_2$ при взаимодействии с биомолекулами вероятность распада состояния с излучением люминесценции очень мала ($\sim 10^{-6}$ – 10^{-8}), поэтому метод технически трудно реализовать с достаточной точностью измерений [307, 308].

Таким образом, диффузионная длина, т. е. среднее расстояние, на которое может переместиться молекула $^1\text{O}_2$ перед тем как она вступит в реакцию, очень мало: по некоторым оценкам на уровне 10 нм, что существенно меньше типичных размеров клеток. Следовательно, химическое поражение и последующие биологические эффекты, связанные с $^1\text{O}_2$, существенно зависят от локализации молекул фотосенсибилизатора в момент оптического возбуждения. Это, в частности, подтверждается наблюдаемой корреляцией между локализацией многих фотосенсибилизаторов порфиринового ряда в мембранах митохондрий и апоптозом клеток («программируемая» смерть клеток), который ассоциируется с повреждениями митохондрий [305, 306].

Перспективным является применение 5-аминолевулиновой кислоты (ALA), введение которой продуцирует в организме гидрофобные и гидрофильные порфирины, в большей степени протопорфирин IX. Именно водорастворимые порфирины накапливаются через некоторое время в патологической ткани; например, при дозе ALA 200 мг кг^{-1} через час после введения продуцируемые водорастворимые порфирины обнаруживаются только в опухоли экспериментального животного, их не видно в коже и окружающей мышечной ткани [6]. Последнее принципиально отличает эту технологию от технологии прямого введения ППП, так как значительное накопление ППП в коже и окружающих тканях снижает эффективность фототерапии.

Требуемые для реализации фотодинамической терапии интенсивности света сравнительно невелики (меньше $1 \text{ Вт}/\text{см}^2$, для многих случаев плотность мощности около $150 \text{ мВт}/\text{см}^2$ оказывается достаточной при дозе 10 – $20 \text{ Дж}/\text{см}^2$) и могут быть обеспечены обычными источниками света [6]. Тем не менее, использование лазеров оказывается очень полезным по следующим причинам. Во-первых, лазерное излучение легко доставляется с помощью волоконных световодов в труднодоступные места, включая внутренние органы. Во-вторых, высокая интенсивность лазерного излучения позволяет, по сравнению с тепловыми источниками, существенно снизить время облучения: именно поэтому лазеры дали новый толчок в развитии фотодинамической терапии. И в-третьих, с помощью лазеров необходимую дозу облучения можно обеспечить с помощью одного короткого импульса света, что важно в тех случаях, когда нужно исключить влияние света на последующие химические реакции.

При использовании новых типов фотосенсибилизаторов, таких как, например, фталоцианины, хорошими источниками облучения являются матрицы полупроводниковых лазеров или светодиодов с подходящей длиной волны (650–680 нм).

Для фотохимиотерапии ряда кожных заболеваний, включая псориаз, используют сенсибилизацию кожи фурукумаринами (псорален) и ее облучение УФА-светом в диапазоне длин волн 320–400 нм (так называемая ПУФА-терапия). Молекулярные механизмы фототоксических эффектов при ПУФА-терапии не в полной мере выяснены. Выделяют три основных канала для проявления фотобиологических эффектов — это фотодинамическая инактивация ферментов (реакция идет в присутствии кислорода (см. рис. 1.33), образование бирадикалов псоралена (различные биологические эффекты) и последующее присоединение тимина с образованием циклобутанового аддукта, которое в свою очередь приводит к подавлению синтеза ДНК. Терапевтический эффект при лечении псориаза связывают именно с фотоповреждением молекул ДНК за счет присоединения к ним фурукумаринов, что приводит к уменьшению пролиферативной активности клеток [46, 83, 84, 297, 298]. Согласно данным [83], индукция эритемы и меланиновой пигментации при УФА-облучении, что связывают с реакциями сенсибилизированного окисления, снижает эффективность ПУФА-терапии. Для реализации лазерной ПУФА-терапии хорошо подходят УФА-лазеры: азотный ($\lambda = 337,1$ нм), эксимерный ХеF ($\lambda = 351$ нм), аргоновый ($\lambda = 351$ нм) и гранатовый (третья гармоника, $\lambda = 355$ нм) [297].

Терапевтическое действие низкоинтенсивного лазерного излучения возможно и без экзогенных сенсибилизаторов [86, 304, 311–314]. Детальные исследования процессов стимулированного роста бактерий, синтеза белка в дрожжевых культурах и синтеза нуклеиновых кислот в клетках животных и человека, активности различных ферментов, выполненные Т. Кару, показали, что стимуляция осуществляется в довольно узкой области параметров облучения (доз, длительностей и частот повторения импульсов, длин волн и интенсивностей) [311, 312]. Проведенные исследования служат некоторым обоснованием многочисленных практических методик по низкоинтенсивной терапии посттравматических, воспалительных и дегенеративно-дистрофических заболеваний. Лазерная терапия является эффективным фактором при лечении длительно не заживающих ран, язв, гнойных заболеваний и пр. Длины волн, наиболее часто применяемых в терапии лазеров (He–Ne с $\lambda = 632,8$ нм, He–Cd с $\lambda = 441,6$ нм, GaAs с $\lambda = 830$ нм), довольно хорошо совпадают с некоторыми длинами волн максимумов спектров действия, полученных на клеточном уровне: 404, 620, 680, 760 и 830 нм. Кроме того, в лазерной терапии применяются УФ-лазеры (азотный с $\lambda = 337,1$ нм) и ИК-лазеры (СО₂-лазеры с $\lambda = 10,6$ мкм). Лазерному облучению подвергаются как поверхность раны или язвы, отдельные органы и железы (чрескожно), так и кровь в сосудах (в том числе и чрескожно) [86, 311–317].

В качестве возможных эндогенных фоторецепторов лазерного излучения в диапазоне длин волн 400–1300 нм, ответственных за биологический эффект, рассматриваются содержащиеся в биообъектах молекулы кислорода (см. рис. 1.33, прямое возбуждение — пунктирная стрелка) [308, 315, 316]. Максимумы некоторых полос поглощения молекулярного кислорода лежат на длинах волн вблизи 638, 762, 1060 и 1260 нм и соответствуют дважды запрещенным триплет-синглетным переходам. Однако в конденсированной среде, которой является любая биоткань, вероятность фотовозбуждения запрещенных переходов может быть достаточно высокой из-за ослабления квантового запрета. В литературе обсуждаются также другие механизмы биостимуляции: усиление под действием лазерного излучения кислородотранспортной функции крови за счет изменения сродства гемоглобина к кислороду (облучение на $\lambda = 632,8$ и 890 нм); изменение ультраструктуры ядрышек лимфоцитов крови человека и другие специфические действия на иммунокомпетентные клет-

ки ($\lambda = 632,8$ нм); модификация пространственной структуры макромолекул белков в электрическом поле световой волны (аналог светоиндуцированного перехода Фредерикса в жидких кристаллах); воздействие УФА лазерного излучения на мембранный потенциал эритроцитов ($\lambda = 337,1$ нм); воздействие зелено-желтого лазерного излучения ($\lambda = 510$ и 578 нм) на протекание биохимических процессов в плазме крови и пр.

Биохимический отклик на лазерное воздействие существенно зависит от частоты повторения импульсов. Например, для фибробластов, облучаемых излучением полупроводникового лазера с $\lambda = 904$ нм и длительностью импульсов 150 нс, при дозе облучения 7 мДж/см² оптимальная частота повторения равна 67 Гц [317].

Использование видимого или инфракрасного излучения низкой интенсивности для обезболивания, снятия воспаления и отека, заживления поверхностных ран и повреждений более глубоких тканей и нервов, а также защита от поражения другими видами излучений известно с самого начала изобретения лазеров. Сначала казалось, что это свойство именно лазерного излучения, однако к настоящему времени проблема рассматривается более широко с привлечением эффектов фотобиостимуляции и фотобимодуляции, характерных для некогерентного света, многие из которых были известны и в долазерную эпоху [67, 83, 84, 311–314].

Несмотря на многочисленные сообщения о позитивных результатах в экспериментах *in vitro*, на моделях лабораторных животных и клинических исследованиях, низко-интенсивная лазерная терапия (НИЛТ) остается противоречивой научной дисциплиной. Эта противоречивость проистекает из двух основных причин: во-первых, биохимические механизмы, лежащие в основе позитивных эффектов, не полностью понятны; во-вторых, сложность выбора оптимальной технологии терапии, определяемой длиной волны облучения, энергией, плотностью мощности, структурой импульсов и временем облучения, а также плохо контролируруемыми оптическими, физиологическими и биохимическими параметрами ткани, на которую оказывается воздействие, привели к многочисленным как положительным, так и отрицательным результатам исследований.

В ряде монографий [304, 311–314] детально обсуждаются проблемы и возможные механизмы НИЛТ. Во-первых, это первичные акцепторы света, к которым относят клеточные хромофоры, ответственные за действие видимого и ближнего ИК-света, включая цитохром-*c*-оксидазу с пиками поглощения в видимой и ИК-областях, фотоактивные порфирины и флавины. Митохондрии считаются ответственными за ряд первичных эффектов действия света. При этом, благодаря сложному строению митохондрий эффекты когерентности лазерного излучения, проявляющиеся в виде формирования спекл-структур, могут проявляться за счет неравномерного нагрева компонентов органелл [324]. Кроме того, роль оксида азота как медиатора лазерного воздействия оказывается в центре внимания ряда исследований [313, 318, 321, 322]. Активация дыхательной цепи клеток ведет к увеличению продукции АТФ, модуляции активных форм кислорода и активации факторов транскрипции. Все эти эффекты в свою очередь ведут к усиленной пролиферации клеток и миграции (в частности, фибробластов), модуляции уровней цитокинов, факторов роста и медиаторов воспаления, предотвращению «программируемой» смерти клеток за счет антиапоптозного сигналинга и возрастанию степени оксигенации ткани.

Результаты запуска этих биохимических и клеточных процессов у животных и человека проявляются для всех видов тканей (рис. 1.36, цветная вклейка) в виде многих терапевтических эффектов, включая заживление хронических ран и язв, восстановление повреждений, связанных со спортом и запястным сухожильным синдромом, уменьшение болевых ощущений при артритах и невралгиях и заживление

повреждений после сердечных приступов, инсультов, повреждений нервной ткани и ретиальной токсичности.

Очевидно, что новые достижения молекулярной и клеточной биологии и их самый прогресс позволят в полной мере понять механизмы НИЛТ [304, 306–308, 312–314, 319–323, 325].

1.8. Примеры применения лазеров в биомедицинской диагностике, терапии и хирургии

Методы диагностики можно разделить на два больших класса — *микродиагностика* на уровне атомов и молекул и *макродиагностика* на уровне клеток и органов. Микродиагностика использует все средства линейной и нелинейной атомной и молекулярной лазерной спектроскопии, макродиагностика — методы упругого и квазиупругого рассеяния света, дифрактометрию, интерферометрию и голографию. Рассмотрим сначала некоторые из наиболее типичных методов микродиагностики. Микродиагностика лежит в основе так называемой *молекулярной визуализации* биологических тканей и клеток [95, 96, 135].

Традиционно *спектральный анализ* широко применяется в биологии для анализа следовых концентраций веществ при изучении метаболизма живых организмов и в токсикологии. Однако спектральный анализ на основе нелазерных источников света позволяет в лучшем случае обеспечить детектирование сигнала от 10^{10} атомов или молекул одного сорта исследуемого объекта [53]. С использованием лазеров удается реализовать сверхчувствительные методы, позволяющие детектировать даже отдельные атомы или молекулы. Более того, высокое спектральное разрешение и селективность лазерной спектроскопии дают возможность проводить атомный анализ непосредственно на реальных объектах, не прибегая к их предварительной подготовке (разложению на компоненты и соответствующему химическому анализу) или сводя подготовку к минимуму операций. Примерами являются метод *прямой лазерной резонансной фотоионизации*, успешно примененный к определению следовых концентраций алюминия в крови человека или его сочетание с традиционной масс-спектрометрией, позволившее определить содержание триптофана в воде на уровне 10^{-14} г [53, 293]. Высокая чувствительность и селективность указанного метода дает универсальное средство для определения содержания различных элементов в органах человека и выявления их роли в метаболизме человеческого организма в нормальных и патологических случаях.

Анализ различий спектров поглощения и флуоресценции нормальных и патологических тканей человека всегда применялся в диагностике [309]. Использование лазерного излучения, которое может быть легко введено в человеческий организм с помощью световодов, значительно расширило возможности традиционных методов. Разработаны, например, высокочувствительные методики, основанные на регистрации спектров диффузного отражения стенок аорты и сравнительной мгновенной лазерной флуориметрии биоткани, и лазерная волоконно-оптическая аппаратура для диагностики атеросклеротических бляшек в сосудах человека [326].

Лазерно-флуоресцентная спектроскопия с применением фотосенсибилизаторов патологических тканей, таких как двунариевый флуоресцеин, акридин оранжевый, акрифлавин, тетрациклин, производная гематопорфирина (ПГП), фталоцианин, индоцианин зеленый, толуидиновый синий, метиленовый синий, зеленые флуоресцирующие белки и другие, оказывается очень эффективной при ранней диагностике раковых заболеваний внутренних органов [6, 55, 56, 256–259, 309, 310, 327, 328]. Красители преимущественно накапливаются в опухолевых клетках, облучение кото-

рых светом определенных длин волн вызывает довольно интенсивную флуоресценцию, тем самым определяются области поражения.

К наиболее эффективным визуализаторам злокачественных опухолей относятся двунариевый флуоресцеин, ПГП и фталоцианины [5, 6, 55, 309]. Контраст изображения опухоли в свете флуоресценции на фоне здоровой ткани для флуоресцеина достигает 50 : 1. Несмотря на то что в случае ПГП контраст сравнительно невелик 5 : 1 (или для наиболее эффективного составляющего ПГП — фотофрина II — 10 : 1), его применение имеет существенное преимущество, так как одновременно с визуализацией препарат используется и для деструкции ткани. Двунариевый флуоресцеин хорошо возбуждается светом He–Cd-лазера с $\lambda = 441,6$ нм, а ПГП — светом Kг-лазера с $\lambda = 406,7$ нм. Для повышения контраста при визуализации с помощью фотосенсибилизаторов применяют сравнительную многоволновую флуориметрию [46]. Более длинноволновое возбуждение имеют фталоцианины 610–670 нм, применение которых в сочетании с регистрацией задержанной флуоресценции (2–4 ч) должно позволить визуализировать глубоколежащие опухоли [6]. Перспективным является применение 5-аминолевулиновой кислоты (ALA), которая индуцирует накопление эндогенных фоточувствительных порфиринов, особенно протопорфирина IX, и запускает целый ряд метаболических реакций в живой ткани, модулирующих флуоресценцию порфиринов [6]. Использование ALA наиболее эффективно для распознавания локальных новообразований, некрозов и воспалений.

Разрабатываются эффективные фотосенсибилизаторы на основе металлокомплексов порфиринов, излучающие в ближней ИК-области спектра и обеспечивающие контрастность визуализации опухоли на уровне (10–45) : 1 [310]. Переход в ближнюю ИК-область позволяет исследовать глубоколежащие объемные опухоли благодаря значительной проникающей способности ИК-излучения.

С помощью волоконно-оптических эндоскопов успешно визуализируются опухоли мочевого пузыря, легких, желудка, шейки матки и другие, для чего, например, достаточно за 48 ч до исследования ввести в кровь 2,5–3,0 мг ПГП на килограмм веса пациента.

Спектры флуоресценции других патологических тканей (стенок кровеносных сосудов, пораженных атеросклерозом; кожи человека, больного псориазом, и т. д.) также существенно отличаются от спектров нормальных тканей, что открывает путь для оперативной диагностики заболеваний, в том числе и непосредственно в процессе лазерного хирургического вмешательства, например в сосудистой хирургии (лазерной ангиопластике).

Спектроскопия излучения автофлуоресценции клеток и биотканей, основанная на свечении эндогенных флуорофоров, позволяет осуществлять мониторинг метаболических процессов и визуализировать ряд патологий, например акне, гингивиты, зубной кариес, эритему, содержание меланина и пр. [13, 249–255].

Опико-акустическая спектроскопия имеет свои особые преимущества при исследовании биологических объектов, главное из которых состоит в снижении влияния сильного рассеяния на результаты измерения спектров поглощения, что очень важно для неоднородных по структуре биологических сред [5, 12, 13, 31, 32, 58, 329, 330]. Лазерное возбуждение обеспечивает и здесь высокое спектральное разрешение, локальность и дистанционность анализа, возможность использования волоконной техники. Одно из медицинских приложений метода заключается в локальном возбуждении сфокусированным лазерным пучком ультразвуковых волн и определении неоднородностей объекта по характеру распространения в нем указанных волн. Таким методом диагностируют внутриглазную злокачественную меланому, сердечные инфаркты и другие патологии.

Лазерное излучение может быть сфокусировано в пятно размером, сравнимым с длиной волны, что используется в целом ряде методик, реализующих *микроспектральный анализ* биологических объектов. Можно сфокусировать интенсивный лазерный пучок на поверхности биообъекта и испарить микрообъем веществ порядка 1 мкм^3 , затем провести масс-спектральный анализ пара и получить информацию об атомах и молекулах, содержащихся в микрообъеме. Рассмотренный принцип лежит в основе лазерной микроаналитической масс-спектрометрии и промышленных лазерных масс-анализаторов [294].

Используя низкоинтенсивное перестраиваемое и жестко сфокусированное излучение лазеров, изучают спектры флуоресценции микрообластей биообъекта (не разрушая его), что лежит в основе лазерной *микрофлуориметрии отдельных живых клеток или органелл* [5, 13, 41, 53, 251]. Пространственное разрешение равно $0,3\text{--}1 \text{ мкм}$, а временное — нескольким десяткам пикосекунд. Лазерная микрофлуориметрия используется, например, при спектроскопических исследованиях ПГП в культивируемых клетках почки свиньи и фибробластов человека, полезна при флуоресцентном картировании генов.

Световые импульсы пикосекундной и субпикосекундной длительности нашли самое широкое применение для изучения фотосинтеза, зрения и биохимических реакций (происходящих непосредственно после поглощения фотона) с участием гемоглобина, ДНК и других биологически важных молекул [294]. Важно, что именно такой путь позволяет получить прямую и надежную информацию о первичных фотопроцессах. Ультрабыстрые реакции являются характерными для биологии, причем для одного и того же объекта скорости фотофизических и фотохимических реакций могут занимать очень широкий диапазон, например, для гемоглобина характерные времена установления составляют $10^{-5}\text{--}10^{-15} \text{ с}$. Подобные исследования требуют применения импульсных лазеров и новых методик спектроскопии, включая *спектроскопию комбинационного рассеяния (КР)*, быстродействующие *абсорбционные методы* и *флуоресцентную спектроскопию* во временном масштабе от наносекунд до фемтосекунд.

Двухфотонная флуоресцентная микроскопия имеет целый ряд достоинств по сравнению с конфокальной микроскопией при функциональной визуализации живых биотканей, поскольку регистрируются не только баллистические фотоны, как в конфокальной микроскопии, но и диффузные фотоны, а высокое пространственное разрешение определяется сильной локализацией двухфотонного процесса [15, 18–20, 41, 260–269].

Лазерная спектроскопия КР позволяет изучать структуру белков и их компонентов, определяющих биохимическую активность молекул [5, 63, 107–109, 331–355]. Получены КР-спектры свободных нуклеиновых кислот и нуклеотидов, их комплексов с белками, тяжелыми металлами и другими элементами и соединениями, а также спектры растворов, содержащих природные вирусы и хромосомы. КР-спектроскопия позволяет различать измененные и нормальные лимфоциты; распознавать клетки на различных стадиях неоплазии шейки матки; детектировать глутамат в отдельных синапсах (конечных частях нейронов), подвешенных в оптическом поле (оптическая левитация, или оптическая ловушка, или оптический пинцет [37]); наблюдать трансляцию мРНК в эмбриональных стволовых клетках; детектировать биологические изменения, связанные с жизненным циклом клетки и ее смертью, ассоциацию липидных тел с фагосомами в лейкоцитах, изучать метастатические клетки и механизмы стресса клеток, а также анализировать отдельные клетки крови при диагностике церебрально-спинальной жидкости.

КР-спектроскопия используется также для картирования или получения изображений распределения различных компонентов клеток, таких как белки, ДНК и РНК,

внутриклеточных липидных везикул, митохондрий и хромосом. Для некоторых компонентов получены и трехмерные изображения.

КР-спектроскопия перспективна для применений в различных областях клинических исследований, таких как мониторинг развития катаракты или процесса минерализации костной и зубной ткани, определение глюкозы в крови, неинвазивная диагностика злокачественных новообразований кожи, мониторинг гидратации кожи и действия лекарственных препаратов при местном применении [63, 102, 107–109, 340–352].

Возбуждение КР-спектров излучением видимого диапазона длин волн, в частности излучением Ag^+ -лазера с длинами волн 488 и 514,5 нм, позволило существенно снизить вероятность фотодegradации клеток по сравнению с использованием более коротковолнового излучения [339]. При возбуждении излучением 488 и 514,5 нм никакие морфологические изменения клеток не наблюдаются вплоть до мощности порядка 5 мВт. Переход к более длинным волнам обеспечивает жизнеспособность клеток при исследовании в течение более длительного времени и с более высокими интенсивностями. Например, излучение лазера на длине волны 785 нм мощностью до 115 мВт не приводит к деградации клеточных компонентов, по крайней мере в течение 1 ч исследований.

Для преодоления существенного недостатка КР-спектроскопии, связанного с малой величиной сигнала от большинства биологических молекул, используют *резонансное КР* (РКР) (Resonance Raman scattering (RRS)) или *гигантское КР* (ГКР) (Surface enhanced Raman scattering (SERS)). Метод РКР исследует колебания молекул хромофоров [344], в то время как ГКР основан на взаимодействиях ближнего поля с поверхностью шероховатых поверхностей нанометровой размерности [5, 339]. В обоих случаях необходима тщательная селекция длин волн возбуждения и соответствующая подготовка образца.

РКР обеспечивает высокую степень специфичности и селективности исследования, за счет того что длина волны возбуждения соответствует электронному переходу исследуемой молекулы, поэтому колебательные моды, ассоциированные с возбужденным состоянием, существенно усиливаются вплоть до 10^6 раз. Электронные переходы нуклеиновых кислот и белков без простатических групп лежат ниже 280 нм, белков с простатическими группами попадают в видимый диапазон. Усиление не распространяется на вибрационные колебания в основном электронном состоянии, поэтому РКР-спектр является менее сложным, что важно при интерпретации спектров от больших биологических молекул.

Используя технику оптического пинцета для удержания эритроцита во время снятия спектров, были получены РКР-спектры для окси- и дезоксигемоглобина для отдельного эритроцита *in vivo* при возбуждении лазерными линиями на длинах волн 488, 514,5, 568 и 632 нм (см. [339]). С помощью РКР был локализован и проанализирован малярийный пигмент гемозоин, найдено внутриклеточное распределение НАДФ-Н (НАДФ — никотинамидадениндинуклеотидфосфат) оксидазы субъединицы цитохрома b558 в случаях покоящихся и фагоцитирующих гранулоцитах. КР-сигнал от молекул цитохрома b558 резонансно и селективно усиливался в нейтрофильных гранулоцитах при возбуждении на длине волны 413 нм. Непосредственно в их естественной среде было найдено распределение нитрификаторов и апаттох бактерий (апаттох — это абривиатура: **anaerobic ammonium oxidation** — анаэробное окисление аммиака) при использовании РКР от эндогенных молекул цитохрома *c*. Важно, что спектры снимаются в течение времени, меньшего 1 с.

Гигантское КР (ГКР), реализуемое при лазерном облучении молекул, адсорбированных на поверхности металла с сильной шероховатостью нанометровой размерности и имеющее до 10^{15} раз большее сечение рассеяния, чем обычное КР, является

высококочувствительным методом регистрации тонких конформационных изменений в ДНК и позволяет детектировать единичные молекулы [5, 339].

Спектроскопия ГКР была использована при определении топографии хромофорного центра светочувствительного мембранного белка — бактериородопсина. Спектроскопия ГКР эффективна при исследованиях веществ очень низких концентраций.

Впервые возможность измерения ГКР-спектров от живых клеток без молекулярных зондов была продемонстрирована для клеток HT29, монослои этих клеток инкубировались с золотыми наночастицами [354]. Аналогичным способом исследовались отдельные клетки остеогенной саркомы, исследовались также бактерии на монослоях золотых наночастиц, нанесенных на субстрат из SiO₂, и бактерии, покрытые шероховатой пленкой серебра (см. [339]).

Активная спектроскопия КР (АСКР), требующая для своей реализации двух перестраиваемых лазеров и, следовательно, обладающая высокой селективностью, использовалась для изучения таких сложных молекул, как β-каротин, витамин В₁₂, металлопорфирины, для исследования механизма каталитической активности белка фермента α-химотрипсина [5].

Когерентное анти-стоксово КР (Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)) также принадлежит к нелинейному КР, как и АСКР, и формально описывается в рамках четырехволнового смешения. Основные достоинства CARS по сравнению с обычным КР, кроме возможности усиления сигнала более чем на четыре порядка величины, является прямая генерация сигнала, узкая полоса и полное отсутствие влияния автофлуоресценции, поскольку сигнал генерируется на длинах волн короче, чем длина волны возбуждения. При сопряжении с лазерным сканирующим микроскопом CARS позволяет получать изображения с видеоскоростью. Метод был использован для визуализации липидных везикул в клетках HeLa, мембраны лизированных эритроцитов, роста капелек жира в живых адипоцитах, транспорта органелл в живых клетках и запасаения липидов в *Nematode Caenorhabditis Elegans* при регистрации CARS-сигнала на частоте 2845 см⁻¹ (см. [339]). Было показано, что CARS-визуализация не является деструктивной для исследуемых клеток, если время измерения не превышает 5 мин.

Для исследований на субклеточном уровне интенсивно разрабатываются методы *КР-микроскопии* и соответствующее высококочувствительное спектральное оборудование [5, 63], в частности конфокальные КР-спектрометры для исследования отдельных клеток и хромосом при возбуждении в видимой области спектра [333]. Высокое пространственное разрешение (порядка 0,7 мкм) и высокую чувствительность имеет АСКР-микроспектрометр, который использовался при получении КР-изображений хромобактерий и различных типов бактерий, содержащих каротин [5]. Важно, что при АСКР- и CARS-исследованиях индивидуальные клетки надежно анализируются на фоне других клеток суспензии без необходимости их предварительного разделения. Стимулированное КР является основой другого метода нелинейной микроскопии для визуализации клеток и тканей без применения экзогенных зондов [355]. Этот метод в будущем может существенно дополнить КР- и CARS-микроскопию.

Значительные перспективы в микродиагностике биообъектов имеет *абсорбционная фурье-спектроскопия*, обеспечивающая широкий диапазон длин волн (УФ, видимый и ИК), быстрое сканирование спектра (до 50 сканирований в секунду), высокое разрешение (лучше 0,005 нм). Особое значение для биологии имеет *фурье-спектроскопия КР* при возбуждении в ИК-области спектра, главным достоинством которой является исключение сопутствующей флуоресценции [343]. Хорошей альтернативой, с точки зрения снижения уровня лазерной мощности и более быстрого получения изображений биотканей, является КР-спектроскопия с использованием современных ПЗС-камер (CCD) [345].

В основе биомедицинской *макродиагностики* лежит использование высокой монохроматичности и когерентности лазерного излучения, которые обеспечивают высокоточные измерения положения, скорости, малых перемещений и формы различных компонентов биологических объектов [5, 53]. Заметим, что большинство перечисленных ниже примеров не может быть реализовано с помощью тепловых источников света. Зачастую методы микро- и макродиагностики используются совместно для получения более ценной и объективной информации.

Одним из первых эффективных применений лазеров в биомедицине была *пролетная цитометрия*. Лазеры в этом методе используются для ускорения и повышения надежности процесса распознавания отдельных клеток млекопитающих за счет точных измерений их оптических свойств — поглощения, упругого рассеяния, состояния поляризации и флуоресценции. Суспензия клеток в виде очень тонкого и быстро движущегося ламинарного потока облучается лазерным излучением. Когда клетка нужного типа пересекает лазерный пучок, она создает соответствующий отклик в системе регистрации поглощения света, рассеяния или флуоресценции. В результате запускается другая система, которая выводит каплю, содержащую клетку, из общего потока. Одноволновые и многоволновые цитометры на основе аргонового, криптонового и гелий-неонового лазеров выпускаются промышленно и широко используются в исследованиях на культуре животных клеток и в диагностике заболеваний крови [37, 159, 356, 357].

Перспективна так называемая лазерная многопараметрическая цитометрия, при которой для дифференциации клеток (например, клеток крови) используют различные сочетания измеренных параметров упруго рассеянного или поглощенного света и флуоресценции, позволяющие одновременно учитывать геометрические (размеры, форму) и оптические характеристики клеток [357–361].

В последние годы интенсивно развивается цитометрия *in vivo* непосредственно в сосудах животного или человека [159, 356, 361–381]. Визуализация клеток крови или лимфы осуществляется с помощью быстродействующих цифровых видеокамер высокого разрешения (макродиагностика, информация о скорости, параметрах движения, форме и структуре отдельных клеток потока) и одновременно с помощью оптотермического (ОТ) или оптоакустического (ОА) эффектов при поглощении лазерного излучения различными компонентами клетки. По виду ОТ- или ОА-отклика клеточных структур различают нормальные и патологические клетки, а также микробы, вирусы, наночастицы и метастазирующие клетки, циркулирующие в кровеносных или лимфатических сосудах и узлах.

Лазерные технологии с успехом применяются в так называемой слайдовой цитометрии, которая использует малые количества биоптата при компьютерном количественном анализе изображений тонких срезов ткани [159, 356]. Слайдовая цитометрия использует множество различных цитометрических методов, основанных на различных технологических платформах, которые объединены тем, что клетки располагаются на слайде и проводится объективный количественный клеточный анализ. Инновации в технологии окраски образцов, детектировании отраженного света и флуоресценции, а также в изготовлении новых типов слайдов в виде линеек или матриц ячеек, каждая из которых предназначена для размещения малого количества ткани или отдельных клеток и может быть функционализирована, дают существенное повышение диагностической ценности метода. Использование квантовых точек, новых типов красителей, введение мультиспектральной визуализации, метода флуоресценции при резонансной передаче энергии (ФРПЭ) (fluorescence resonance energy transfer (FRET)) и многих других лазерных технологий существенно расширили возможности метода.

Интенсивно разрабатываются методы *лазерной томографии* биотканей, основанные на измерениях их пропускания (отражения) или флуоресценции под действием непрерывного, импульсного или модулированного по интенсивности лазерного излучения с различными длинами волн [1, 3, 12, 30–32, 41, 162]. Визуализация оптически неоднородных сильно рассеивающих и объемных биотканей требует использования эффективных методов регистрации рассеянного или переизлученного света, а также быстродействующих алгоритмов для получения томограмм в реальном масштабе времени.

Упругое рассеяние света (нефелометрия) является одним из эффективных методов макродиагностики и давно применяется в различных областях биологии и медицины. Применение лазеров, обладающих малой угловой расходимостью, высокой спектральной плотностью, легко управляемой поляризацией излучения, позволило существенно упростить измерения и повысить их надежность, тем самым расширив область применения метода в иммунологии, вирусологии и гематологии. В частности, лазерная нефелометрия используется для определения степени деформируемости эритроцитов при приложенных к ним сдвиговых напряжениях, функции распределения эритроцитов по размерам, оптических и геометрических параметров лимфоцитов, моноцитов, нейтрофильных и эозинофильных гранулоцитов в образцах белых кровяных клеток; для контроля протекания реакции антиген–антитело, содержания белков в крови и моче; для обнаружения бактерий в жидких средах; для изучения процессов споризации и прорастания бактерий [5, 12, 13, 24, 66, 81, 357, 360, 361, 382, 383]. Перспективно применение лазерной нефелометрии для контроля оптимальных условий программного размораживания органов, биологических тканей, клеток крови, костного мозга, микроорганизмов, сперматозоидов и т. д. [81, 359].

Спектроскопия упругого рассеяния, основанная на измерениях спектров отражения от верхних эпителиальных слоев биоткани, находит применение в ранней диагностике рака, поскольку дает информацию о морфологических изменениях на клеточном и субклеточном уровне, позволяя не прибегать к биопсии и введению специфических красителей [336, 384].

Поляризационная нефелометрия, основанная на анализе полной матрицы рассеяния биообъекта, перспективна для изучения макроструктуры различных биообъектов (формы и размеров отдельных частиц, характеристик распределения по размерам, оптических постоянных, статистических характеристик пространственного расположения частиц, наличия анизотропии и прочее) [5, 57, 165–170]. Знание макроструктуры биообъектов, в частности биотканей, дает возможность ранней диагностики некоторых заболеваний, связанных с изменениями макроструктуры (например, катаракты и глаукомы).

Другое не менее эффективное применение лазеров — *лазерная спектроскопия квазиупругого рассеяния* биообъектов [5, 82, 115, 176–178, 383, 385]. Она основана на регистрации обусловленных движением частиц временных изменений параметров рассеянного излучения, которые проявляются в автокорреляционной функции и соответственно в спектре флуктуаций интенсивности рассеянного поля. В зависимости от характера движения частиц происходит либо уширение спектра (движение типа равновесной диффузии, случайных миграций и пр.), либо смещение (направленное движение). Последнее называют доплеровским смещением. Обычно для биологических систем имеет место и уширение, и сдвиг. Уширение и сдвиг настолько малы по сравнению с оптической частотой ($\Delta\nu_D/\nu \approx 10^{-7}–10^{-14}$), что практически в спектроскопии квазиупругого рассеяния допускается использование только лазеров, да еще с низким уровнем амплитудных и частотных флуктуаций.

Для случая обратного рассеяния [5] $\Delta\nu_D = (2nv/\lambda) \cos \varphi$, где n — относительный показатель преломления рассеивающих частиц; v — скорость их движения; φ —

угол между направлениями лазерного пучка и движения рассеивателей. Например, для средней скорости кровотока $v = 1$ см/с и $\lambda = 633$ нм с учетом того, что для эритроцитов в плазме крови $n = 1,05$, частотный сдвиг $\Delta\nu_D$ составляет всего 32 кГц.

Различают гомодинные, основанные на регистрации самобиений различных спектральных компонентов рассеянного света, и гетеродинные, использующие опорные лазерные пучки, схемы лазерных спектрометров квазиупругого рассеяния. Последние чувствительны не только к движениям типа равновесной диффузии, но и к направленному движению рассеивателей (лазерные доплеровские анемометры). Измеряются спектр или автокорреляционная функция фототока приемника рассеянного излучения. Вид измерений определяет тип спектрометра, например фотон-корреляционный. Для обработки сигналов широко используют персональные компьютеры, реализующие быстрые цифровые методы спектрального и корреляционного анализа.

С помощью лазерных спектрометров квазиупругого рассеяния исследуют параметры трансляционной и вращательной диффузии макромолекул, надмолекулярных и клеточных структур, вирусов, фагов, контроль коэффициента трансляционной диффузии и гидродинамического радиуса которых позволяет судить о характере процесса денатурации, степени агрегации, кинетике модификации и полимеризации, характере конформационных изменений, протекании иммунологических реакций и других показателях [5, 82]. Исследуются, например, процессы агрегации иммуноглобулина, кинетика полимеризации тубулина и самосборки микротрубочек *in vitro*, переход фибриногена в фибрин и агрегация фибрина. Разрабатываются методы диагностики катаракты, использующие специфику квазиупругого рассеяния на конгломератах высокомолекулярных белков, определяющих нарушение структуры и, соответственно, помутнение хрусталика. Так, для глаз человека найдено, что основные рассеиватели представляют собой монодисперсную фракцию частиц с размерами 0,5 мкм и полидисперсную — с размерами в диапазоне от 1 до 6 мкм [12, 19, 31, 176, 386]. Сочетание спектрометра с микроскопом позволяет регистрировать кинетику агрегации гемоглобина внутри эритроцитов крови больных серповидной анемией, движение протоплазмы внутри живых клеток, размерами порядка 10 мкм.

Измерение скорости направленного движения биообъектов с помощью лазерных доплеровских измерителей скорости (ЛДИС) является одним из эффективных способов диагностики в биологии и медицине [5, 383, 385]. В настоящее время достаточно хорошо развит метод так называемого электрофоретического светорассеяния, основанный на измерении подвижности заряженных светорассеивающих частиц в электрическом поле [5, 82]. Метод применяется для анализа состава форменных элементов и белков плазмы крови, популяций вирусов и бактерий; агрегации и полимеризации белковых молекул; самосборки актиновых филаментов из глобулярных мономеров; анализа иммунологических реакций, проводимых при диагностике злокачественных опухолей, иммунодефицитного состояния, рассеянного склероза, ревматоидного артрита и др.

ЛДИС используют для изучения гемодинамики, что очень важно в медицинской диагностике. Измеряется средняя скорость кровотока, распределение скоростей по сечению сосуда, интенсивность турбулентных пульсаций и пр. С высокой точностью определяются параметры движения крови в тонких (менее 100 мкм) сосудах с прозрачными стенками, например сосудах сетчатки глаза. Для более крупных сосудов с непрозрачными стенками используют волоконно-оптические катетеры.

Перспективны для клинических исследований разнообразные лазерные измерители микроциркуляции крови в микрососудах приповерхностного слоя органов, основанные на бесконтактных измерениях рассеянного излучения движущимися в слое ткани эритроцитами [5, 12, 19, 31, 41, 103, 176, 387–391]. Разработаны и применяются в клинической практике фотон-корреляционные волоконно-оптические измерители

микроциркуляции крови: приборы, сочетающие измерение кровотока с оптической плетизмографией, компактные доплеровские системы на основе полупроводниковых лазеров.

Спектроскопия квазиупругого рассеяния является признанным средством при анализе подвижности живых клеток в суспензиях (например, сперматозоидов животных и человека, бактерий, снабженных жгутиками — жгутиками и др.), перспективна при изучении внутриклеточной подвижности: стационарных движений светорассеивающих частиц, составляющих протоплазму клеток (ядер, митохондрий и т. д.) [5, 82, 392]. При исследованиях небольших клеток требуются уже лазерные доплеровские микроскопы, которые интенсивно разрабатываются в последние годы [5, 169, 383, 392].

Голография и интерферометрия являются мощными средствами диагностики вообще и биомедицинской в частности [5, 53, 175, 176, 388, 393–399]. Голографические методы позволяют получать трехмерные изображения биообъектов (например, изображение целого глаза или его отдельных частей), измерять размеры внутренних структур глаза с высоким разрешением, проводить локализацию внутренних инородных тел, опухолей, отеков, отслоек и др. Сочетание голографической регистрации изображений глазного дна с флуоресцентной ангиографией дает голографические изображения кровеносных сосудов диаметром до 10 мкм с контрастом 25 : 1. Разработаны голографические распознающие устройства, способные обеспечить параллельную обработку больших массивов экспериментальных данных, в том числе и при анализе больших популяций микроорганизмов или клеток.

Принципиально возможна реализация голографической топографии, заключающейся в картировании контуров биообъектов. Деформации биообъектов могут быть проанализированы в реальном масштабе времени с помощью голографической интерферометрии, что может оказать влияние на развитие многих разделов медицины: ортопедии, маммографии, офтальмологии, урологии и отологии. Большие потенциальные возможности имеют классическая интерферометрия при использовании лазерных источников (создание ретинометров — устройств для определения ретиальной остроты зрения, измерителей толщины роговицы и пр. [5]), метод оптики спеклов (для определения структуры и шероховатости некоторых биотканей [114, 175, 176, 181, 182, 400, 401]), а также исследования динамических спекл-структур (при определении рефракции, хроматической аберрации, астигматизма и точки наилучшей аккомодации глаза [402], контроле динамики локального кровотока и лимфотока в сосудах [12, 13, 19, 31, 41, 175, 176, 391, 400, 403–406]) или пространственного распределения скорости кровотока в ткани [12, 13, 19, 31, 41, 391].

Разработаны лазерные биовиброметры, использующие принципы гомодинной и гетеродинной интерферометрии, включая спекл-интерферометрию; они применяются в биомедицинских исследованиях при изучении микровибраций органов внутреннего уха, регистрации пульсовых волн, случайных вращений глазного яблока, тремора мышечной ткани и пр. [175, 176, 407, 408].

Для неинвазивного мониторинга направленного или случайного движения крови в объемных биотканях интенсивно развивается метод *диффузионно-волновой спектроскопии* (ДВС), который отличается от метода квазиупругого рассеяния тем, что он применим к исследованию сред с многократным рассеянием, дает информацию о движении частиц на существенно меньших масштабах и позволяет оценивать рассеивающие свойства ткани [12, 13, 19, 31, 175–180, 409].

В основе *лазерной терапии* лежит управление биохимическими процессами с помощью света. Однофотонные фотобиохимические процессы лежат в основе терапии желтухи новорожденных, фототерапии или фотохимиотерапии различных заболеваний кожи [43–46, 83, 86, 205, 295–298] и фотодинамической терапии

(ФДТ) злокачественных опухолей и воспалительных заболеваний, а также подавления роста бактерий с использованием гематопорфирина, металлокомплексов порфиринов, фталоцианина, анионных красителей и других фотосенсибилизаторов [6, 41, 43–46, 54–56, 68, 83, 205, 208, 295, 299–308, 310]. В лазерной ФДТ широко применяется 5-аминолевулиновая кислота (ALA), которая при введении в организм индуцирует в нем генерацию в основном протопорфирина IX, который уже является эффективным фотосенсибилизатором. Этот метод имеет целый ряд преимуществ и интенсивно разрабатывается.

При наличии фотосенсибилизатора, накопленного в опухоли или других патологических фокусах, излучение лазера, который используется при терапии, возбуждает флуоресценцию молекул фотосенсибилизатора, которая служит для диагностики патологий и маркирования границ поражений, определения количества накопленного фотосенсибилизатора в ткани и дозиметрии лазерного излучения.

Для фотохимиотерапии ряда кожных заболеваний, включая псориаз, используют ПУФА-терапию, основанную на сенсibilизации кожи фурокумаринами (псорален) и облучении УФА-светом в диапазоне длин волн 320–400 нм [46, 83, 84, 297, 298]. Так называемая *низкоинтенсивная лазерная терапия* (НИЛТ) позволяет для ряда заболеваний получить терапевтический эффект и без введения экзогенных фотосенсибилизаторов [86, 304, 311–314]. Такая биостимуляция осуществляется в довольно узкой области длин волн, интенсивностей и доз облучения, а также длительностей и частот повторения импульсов [311, 312]. В литературе описаны многочисленные практические методики НИЛТ для лечения посттравматических, воспалительных и дегенеративно-дистрофических заболеваний. Также интенсивно обсуждаются проблемы и возможные механизмы НИЛТ [304, 311–314], включая молекулы — первичные акцепторы света, такие как цитохром-*c*-оксидаза, порфирины и флавины; митохондрии как органеллы, ответственные за ряд первичных эффектов действия света [324]; оксид азота как медиатор лазерного воздействия [313, 318, 321, 322].

Одним из действенных методов лазерной терапии является *лазерная селективная гипертермия*, которая перспективна для использования в терапии раковых опухолей. Длина волны и мощность излучения лазера определяются размерами опухоли и спектром поглощения патологической ткани. Во многих случаях условия облучения аналогичны таковым при фотодинамической терапии. В последнее время в качестве медиаторов селективного лазерного нагрева раковых опухолей используются красители, например индоцианин зеленый (полоса поглощения 790–800 нм) [286, 287], или золотые наночастицы, в частности наноболочки, имеющие плазмонный резонанс в ИК-области спектра близи излучения диодного лазера 805–808 нм, где биоткань максимально прозрачна [283–285].

Более сильный локальный нагрев ткани под действием лазерного излучения приводит к ее коагуляции, что также используется для разрушения раковых опухолей — это так называемая *лазерная межтканевая термотерапия* (LITT) [2]. Такая терапия является минимально-инвазивной и может быть рассмотрена как один из видов лазерной хирургии. Для обеспечения минимального влияния высоких температур на окружающие ткани и предотвращения карбонизации и выпаривания коагулируемой ткани используют специальные волоконно-оптические аппликаторы с охлаждением и разнообразные средства визуализации области лазерного воздействия (магнито-резонансную томографию или ультразвуковую визуализацию). Основные области применений такой терапии — это опухоли мозга, печени, простаты, гинекологические заболевания, сосудистая система и пр. [2]. Как правило, используются достаточно мощные лазеры ближней ИК-области спектра — неодимовые (1,06 мкм и 1,3 мкм) и полупроводниковые (0,8–0,9 мкм). К этой технологии очень близко примыкает лазерная технология по удалению «портвейновых пятен» (болезнь М. Горбачева), для

удаления которых используют лазеры, работающие в зелено-желтой области спектра [62, 69–71].

Наблюдается значительный интерес к косметическим применениям лазерных импульсных тепловых технологий абляционного (CO_2 -лазер, 10,6 мкм, или эрбиевый лазер, 2,79–2,94 мкм) и неабляционного (неодимовый лазер, 1,06 и 1,3 мкм) характера [36, 39, 148, 280, 410, 411]. Имеются определенные успехи при удалении волос и разглаживании морщин на лице. Главная идея, реализуемая при разглаживании морщин, заключается в выборе такой длины волны лазерного излучения и дозы облучения, когда селективно поражается папиллярная дерма и активизируются фибробласты за счет продолжительного процесса заживления раны, при этом в момент лазерного воздействия эпидермис должен быть защищен от перегрева, например за счет предварительного охлаждения поверхности кожи. При удалении волос возникают аналогичные проблемы, и режим лазерного облучения и охлаждения подбирается таким образом, чтобы эффективно воздействовать на волосные фолликулы. Чаще всего используется излучение рубинового лазера ($\lambda = 694$ нм), хотя применяются и другие типы высокоэнергетических и более экономичных лазеров.

Современные представления о фотопилиации включают как тепловое, так и механическое действие света на волосной фолликул, в результате, которого происходит либо задержка роста волоса или полное прекращение его роста. В первом случае достаточно разрушить клетки матрикса волосного фолликула в фазе роста (анаген) в цикле развития волоса или коагулировать папиллярные кровеносные сосуды, которые питают волос, или разрушить часть внешнего эпителиального влагалища корня волоса. Во втором случае, для полного прекращения роста волос, необходимо разрушить стволовые клетки, которые расположены в области расширения фолликула на границе внешнего эпителиального влагалища корня волоса и соединительной ткани, или разрушить волосной фолликул целиком на уровне дермы.

Фотосклеротерапия обеспечивает тепловое или механическое разрушение сосудистых структур при поглощении света кровью, находящейся в этих сосудах. Гемоглобин крови имеет значительное селективное поглощение в широком диапазоне длин волн, являясь одним из основных поглотителей в биотканях. При такой терапии закрытие сосуда происходит за счет денатурации сосудистой оболочки, вызываемой передачей тепла от нагреваемой лазерным излучением крови, что хорошо описывается в рамках расширенной теории селективного фототермолиза [148].

Следует отметить, что все виды лазерной термотерапии требуют тщательной дозиметрии лазерного излучения, надежных данных по оптическим и теплофизическим параметрам биотканей и применения средств управления этими параметрами (селективное просветление ткани, охлаждение и пр.).

Часто терапевтический эффект низкоинтенсивного лазерного света связывают с его когерентностью или высокой степенью поляризации. Однако при используемых малых интенсивностях скорость возбуждения молекул $W_{\text{воз}}$ оказывается в 10^{10} раз меньше, чем скорость релаксации возбужденных молекул в конденсированной среде (скорость потери когерентности), которая при нормальной температуре лежит в диапазоне 10^{11} – 10^{13} с⁻¹. Таким образом, при взаимодействии с тканью полностью теряется временная когерентность лазерного излучения. Действительно, терапевтический эффект наблюдается и с нелазерными источниками света при облучении на ряде длин волн в диапазоне 400–850 нм, но лазеры в соответствии с перечисленными выше причинами оказываются более удобным инструментом. Тем не менее, остается невыясненным влияние спекл-структуры лазерных полей внутри биоткани на биостимулирующее действие лазерного излучения, что является проявлением когерентности света и принципиально отличает лазерное излучение от теплового. Учет поляризационных эффектов важен при облучении анизотропных биотканей.

Многофотонное возбуждение биомолекул можно обеспечить с помощью сверхкороткого лазерного импульса не очень большой энергии, но большой пиковой мощности. При этом для двухступенчатого возбуждения триплетных уровней достаточно импульсов наносекундной длительности, а для более короткоживущих синглетных уровней необходимы длительности в пикосекундном диапазоне. Использование двухквантового возбуждения высоколежащих электронных состояний биомолекул в растворах приводит к диссоциации и образованию радикалов молекул растворителя, т.е. вызывает такие же биохимические реакции, которые обычно наблюдаются в растворах при облучении ионизирующей радиацией. Принципиальное отличие двухквантового фотолиза от γ -радиолиза состоит в том, что молекулы растворителя в первом случае диссоциируют только вблизи молекул-хромофоров, которые поглощают лазерное излучение, а не во всем облучаемом объеме, как при γ -радиолизе [53]. Данный эффект может найти применение в лазерной терапии раковых опухолей, поскольку он обеспечивает образование радикалов воды, которые поражают раковые клетки, но не влияют на окружающие здоровые клетки, что обусловлено свойствами молекул сенсibilизатора.

Двухквантовые фотохимические реакции наблюдаются в биологических системах разного уровня организации (вирусы, дрожжи и клетки) и должны найти применение в геномной инженерии. При исследованиях *in vivo* удается увидеть различные типы повреждений молекул нуклеиновых кислот (разрывы и сшивки), что позволяет изучать пространственную структуру и функции сложных биомолекул (белки, нуклеиновые кислоты). С помощью лазеров наносекундной длительности изучают также причины повреждения ДНК, составляющей комплекс с красителем. Считается, что механизм повреждения состоит в образовании в результате двухступенчатой ионизации реакционноспособных радикалов красителя, приводящих к необратимой химической модификации ДНК.

Двухквантовое возбуждение по сравнению с одноквантовым (за счет исключения синглет-триплетной конверсии (см. рис. 1.33, б) позволяет повысить эффективность фотохимической реакции. Переход от низкоинтенсивного возбуждения (меньше 1 Вт/см^2) к высокоинтенсивному (10^9 Вт/см^2) увеличивает квантовую эффективность фотомодификации порфирина в растворе в 100 раз. Подобные эксперименты с производными гематопорфирина при облучении азотным лазером показывают, что главным механизмом, ответственным за разрушение молекул, является двухступенчатое возбуждение, которое дает более сильный цитотоксический эффект, чем одноступенчатое.

Итак, многофотонное возбуждение биомолекул является основой эффективной нелинейной фототерапии, использующей короткие лазерные импульсы, способные производить значительные фотохимические эффекты при таких малых средних мощностях, когда тепловые эффекты отсутствуют.

Преимущества *лазерной хирургии* хорошо известны — бесконтактность, дающая абсолютную стерильность; селективность, позволяющая выбором длины волны облучения разрушать патологические ткани, не затрагивая окружающие здоровые; широкий диапазон интенсивностей и длительностей импульсов света, что дает возможность обеспечивать требуемое воздействие на биообъект: плавление (коагуляция) и выпаривание при сравнительно небольшом разогреве; гидродинамическое разрушение при локальном интенсивном импульсном нагреве (абляция); деструкцию прозрачных и пигментированных тканей короткими и сверхкороткими лазерными импульсами путем термической и многофотонной ионизации вещества (оптический пробой) [2, 7, 42–46, 60–62, 85, 205, 271–273, 412–420]. Области существования указанных процессов взаимодействия лазерного излучения с биотканями показаны на рис. 1.24 и 1.25. В частности, при постоянстве дозы облучения, удерживаемой

на определенном уровне (3 Дж/см^2 , рис. 1.25), оказывается возможным получение всего многообразия режимов фоторазрушения варьированием лишь длительности импульсов.

Отметим бескровность лазерных операций благодаря коагулирующему действию света, а также широкие возможности при микрохирургии тканей и клеток из-за высокой степени фокусировки пучка и порогового характера фоторазрушения.

Наиболее значительные достижения лазерная хирургия имеет в офтальмологии [52, 205, 271, 413–418]. Проводятся операции на стекловидном теле, фотокоагуляция сетчатки при лечении диабетической ретинопатии, приваривание отслаивающейся сетчатки, микрохирургия разрывов сетчатки, пробивка отверстий для обеспечения нормального функционирования Шлеммова канала при лечении глаукомы, фотокоагуляция радужной оболочки, удаление капсулы хрусталика и пр. Успех таких микрохирургических операций зависит от степени локальности лазерного воздействия. Хорошие результаты дает использование коротких и сверхкоротких мощных импульсов, поскольку возникающие в фокальном объеме нелинейные эффекты способствуют локальному образованию плазмы и разрушению ткани при возбуждении акустических ударных волн, окружающие ткани за время действия импульса не успевают сильно нагреться и поэтому не страдают.

Наибольшее распространение в микрохирургии глаза получили Ar-лазеры, используются также Kr-, Rb-лазеры, лазеры на красителях. Перспективными для некоторых офтальмологических операций являются АИГ:Nd-лазеры ($\lambda = 1,06 \text{ мкм}$) с модуляцией добротности и синхронизацией мод. В последние годы многие исследования направлены на реализацию лазерных операций на роговице с помощью УФ-эксимерных лазеров. Вообще эксимерные лазеры являются идеальными скальпелями биологических материалов с очень малым проникновением лазерного света в соседние здоровые ткани и возможностью тонкого послойного контроля за процессом абляции за время действия отдельного лазерного импульса, что связано с малой глубиной проникновения (значительным коэффициентом поглощения, см. табл. 1.1) УФ-излучения для большинства биотканей. В идеале весь УФ-свет должен поглощаться в пределах одного клеточного слоя.

Лазерная УФ-абляция тканей может быть использована при лечении различных кератозов, однако в настоящее время усилия многих исследователей направлены на поиск оптимальных режимов абляции для проведения кератомоделирования с помощью низкоинтенсивного УФ-излучения для исправления нарушений рефракции глаза [413, 414, 416]. Современные рефракционные хирургические технологии, такие как LASIK (laser-assisted *in situ* keratomileusis — местное изменение рефракции роговицы удалением ее слоев с помощью лазера), становятся все более популярными для коррекции нарушений рефракционной способности глаза путем изменения формы поверхности роговицы глаза. Однако около $\sim 5\%$ пациентов имеют послеоперационные осложнения, выражающиеся в нежелательных оптических эффектах за счет рассеяния света на послеоперационных структурах, синдроме сухого глаза и некоторых проблемах с заживлением. Несмотря на большие успехи в исследованиях, широкое внедрение этих технологий пока сдерживается из-за отсутствия отдаленных данных по действию коротковолнового УФ-излучения на окружающие ткани, а также по перестройке структуры роговицы после ее заживления [416].

Имеются сведения об использовании XeCl-эксимерного лазера с $\lambda = 308 \text{ нм}$ для абляционного разрушения костной ткани [419]. Оказалось, что толщина однократно удаляемого слоя ткани составляет 2–3 мкм, что открывает перспективы для проведения тонких операций в ортопедии и стоматологии.

Разработаны новые мощные и надежные полупроводниковые лазеры, а также высокоэффективные АИГ:Nd-лазеры с накачкой от полупроводниковых лазеров и пре-

образованием частоты (см. гл. 6), которые вытесняют дорогостоящие и сложные Аг-, Кг-лазеры и лазеры на красителях, используемые для коагуляции тканей [416].

В хирургии широко используются различные типы CO_2 -лазеров ($\lambda = 10,6$ мкм) [85, 205], в зависимости от вида операций применяют режим послойного испарения ткани (разрез) сфокусированным пучком (объемная плотность мощности в фокусе достигает нескольких сотен киловатт в см^3) или режим коагуляции расфокусированным пучком (объемная плотность составляет несколько сотен ватт в см^3). CO_2 -лазеры используются в хирургии желчных путей и пороков сердца, кожно-пластической хирургии, для операций на желудке и кишечнике, в нейрохирургии, онкологии, урологии и гинекологии, для лечения глубоких ожогов и пр.

Излучение АИГ:Nd-лазера с $\lambda = 1,06$ мкм имеет существенно большую глубину проникновения в ткань по сравнению с излучением CO_2 -лазера, хорошо пропускается волоконными световодами, поэтому используется в основном при операциях, когда требуется коагуляция больших кровеносных сосудов при сильных кровотечениях, разрушениях глуболежащих опухолей, а также при операциях, требующих подачу излучения через эндоскоп [7, 420, 421]. Наиболее широкое применение АИГ:Nd-лазеры нашли в гастроэнтерологии, урологии, гинекологии, нейрохирургии и т. д. При использовании волоконных световодов применяют сапфировые наконечники, допускающие прикосновение к коагулируемой ткани, что существенно облегчает операцию.

Значительные возможности открываются у лазерной хирургии при использовании волоконных световодов, которые способны почти без потерь в видимой и ближней ИК-областях спектра передавать значительные мощности излучения, от нескольких до сотен ватт. Применение волоконно-оптических катетеров позволяет также реализовать лазерную ангиопластику — разрушение атеросклеротических бляшек в сосудах сердца и других крупных сосудах. Для испарения бляшек достаточно, например, в течение нескольких секунд облучать ее светом аргонового лазера мощностью 3–4 Вт, для известковой бляшки время увеличивается до 30–40 с. Показано, что для лазерной ангиопластики пригодны достаточно мощные лазеры, работающие как в непрерывном, так и в импульсном режимах, на длинах волн ИК, видимой и УФ-областей спектра [7, 61, 205, 272]. Лазеры используются в сочетании с различными катетерными системами, у которых на дистальном конце световода находятся разогреваемые лазерным излучением или наконечники, или микролинзы, или кварцевые и сапфировые колпачки [7, 61, 205].

Перспективными для склерозирования крупных сосудов являются диодные или волоконные лазеры, генерирующие излучение с длиной волны 0,94–0,97 мкм [421]. В этом диапазоне рассеяние достаточно мало, поэтому при чрескожной лазерной коагуляции можно обеспечить прогрев достаточно крупных сосудов по всему их сечению. С другой стороны, в этом диапазоне длин волн располагается локальный пик поглощения крови, позволяющий при эндовенозной лазерной коагуляции (ЭВЛК) осуществлять безопасный для окружающей здоровой ткани селективный фототермоллиз. Хроническая венозная недостаточность нижних конечностей — одно из наиболее часто встречаемых в повседневной медицинской практике патологических состояний, характеризующихся прогрессирующим и часто осложненным течением. ЭВЛК относится к малоинвазивным методам лечения, поэтому эндовенозная лазерная облитерация (ЭВЛО) варикозно расширенных вен сопровождается хорошими клиническими и эстетическими результатами и позволяет избежать длительного лечения.

Даже небольшое увеличение коэффициента поглощения патологической биоткани, снижающее порог абляции, может приводить к повышению эффективности процедуры — увеличению селективности воздействия лазерного излучения на патологическую биоткань, росту скорости ее удаления [46]. Например, при абляции

артериальных бляшек излучением лазера на красителях диапазон эффективных длин волн (450–479 нм) определяется накапливающимися в них естественными каротиноидами. В бляшках также селективно накапливается тетрациклин, что ведет к повышению, примерно в 2 раза, эффективности абляции на длине волны 355 нм. Хорошо известный в медицине краситель ПГП, имеющий сильное поглощение в УФ-области спектра при обычных концентрациях, используемых в фотодинамической терапии рака, к сожалению, не дает нужной селективности воздействия УФ-излучения на бляшку. Также как и в случае абляции роговицы, широкое клиническое внедрение методики требует знания отдаленных последствий операции, полной реализации достоинств лазерной операции по сравнению с альтернативными методами.

В качестве перспективных для лазерной хирургии рассматриваются мощные лазеры, работающие на длинах волн вблизи максимума поглощения воды (минимальная глубина проникновения в ткань) — эрбиевые лазеры с длиной волны $\lambda = 2,94$ мкм. Разрабатываются эффективные импульсные лазерные системы на красителях, работающие в видимой области (450–700 нм) для разрушения камней желчного пузыря и почек [46, 69]. В этой области длин волн коэффициент поглощения камней оказывается выше, чем у окружающих тканей. Поглощение импульсов света вызывает акустические возмущения и последующую фрагментацию конкрементов. Имеются сообщения о том, что вызванные лазерным излучением несильные акустические возмущения в опухолях способствуют снижению скорости роста раковых клеток.

Достаточно мощные лазеры видимой и ближней ИК-областей спектра (Ar с $\lambda = 488$ нм, АИГ:Nd с $\lambda = 1,06$ и $1,3$ мкм) применяются для сваривания сосудов и сращивания раневой поверхности мягких тканей [85, 205]. При нагревании лазерным излучением мембрана клеток ткани разрушается, а содержащийся в клетке раствор, изливаясь внутрь ткани, коагулирует под действием света и формирует достаточно прочные структуры за счет образования межмолекулярных связей. Для облегчения и повышения качества лазерных операций созданы эффективные вспомогательные инструменты — компрессионные и растягивающие ткань зажимы, сшивающие аппараты [85]. Добавление красителей в область сваривания, например, индоцианина зеленого, сильно поглощающего излучение диодного лазера с длиной волны 805 нм, позволяет существенно повысить эффективность сваривания. Это так называемая холодная сварка, при которой окружающая ткань практически не нагревается [422]. Золотые наночастицы, внедренные в область сваривания, также позволяют существенно повысить эффективность сварки [423].

Для проведения тонких хирургических операций на роговице, например при трансплантации роговицы, используются фемтосекундные лазеры [422]. Типичный промышленный лазер на стекле с неодимом с длительностью импульсов 600–800 фс и частотой повторения 60 кГц обеспечивает контролируемое и воспроизводимое резание ткани с точностью до 5 мкм, что выгодно отличает лазерную технологию от обычных скальпелей.

Отметим, что во многих случаях в процессе лазерной хирургической операции ткань оказывается покрытой различными жидкостями (кровь, лимфа, растворы для ангиографии и пр.). Жидкости легко устраняются при так называемой открытой хирургии, однако в эндоскопии их наличие приводит к усложнению операции. Например, необходимо обеспечивать постоянное омывание оперируемого органа прозрачной для лазерного излучения жидкостью (водные растворы солей, искусственная кровь). Излучение АИГ:Nd-лазера с $\lambda = 1,06$ мкм хорошо пропускается кровью и в меньшей степени солевым раствором, поэтому он широко используется в эндоскопии для коагуляции биотканей без применения омывающих жидкостей. Излучение аргонового лазера ($\lambda = 488$ нм), напротив, сильно поглощается кровью и хорошо пропускается водными растворами солей. УФ-излучение эксимерных лазеров в значительной

мере поглощается кровью, растворами красителей, используемых для ангиографии, и существенно меньше солевыми растворами ($\lambda = 308$ нм), поэтому для уменьшения требуемой энергии лазерного излучения необходимо использовать солевые растворы для удаления крови из зоны абляции. Однако такая процедура может давать хорошие результаты только в видимой и ближней ИК- и УФ-областях и бесполезна для глубокого УФ ($\lambda < 200$ нм) и дальнего ИК ($\lambda > 3$ мкм). При использовании лазеров, работающих в дальнем ИК (например, СО- и СО₂-лазеры) и глубоком УФ (некоторые типы эксимерных лазеров), хорошие результаты дает импульсное сфокусированное излучение с необходимой энергией пучка и высокой частотой следования импульсов для того, чтобы образовать за счет эффекта кавитации (испарения) свободную от биожидкости стационарную полость на пути лазерного пучка до биоткани [46].

Лазеры в сочетании с волоконно-оптическими эндоскопами начинают применяться в лапароскопических операциях, например при удалении желчного пузыря [7]. Глубина контролируемого рассеяния ткани в таких операциях составляет доли миллиметра, поэтому необходимо использовать лазерное излучение со сравнительно малой глубиной проникновения в ткань. Допустимо также применение контактных волоконно-оптических скальпелей с сапфировыми или другими наконечниками, преобразующими излучение любого типа лазеров в тепло.

Значительные перспективы в биологии имеет лазерная микрохирургия живых клеток [424, 425]. Локальность воздействия может быть доведена до 0,01 мкм. Широкие пределы изменения длины волны лазерного излучения и длительности импульса позволяют реализовать любой из видов фоторазрушения, от теплового до многофотонного фотохимического, что дает новые возможности в микрохирургии хромосом, митотических органелл и цитоплазмы, имеет выход в генную инженерию, поскольку «лазерный скальпель» способен сделать субмикронное отверстие в стенке клетки (оптопорацию), через которое из окружающего раствора желаемый ген может проникнуть внутрь клетки.

Лазерная оптопорация клеток дает возможность осуществлять трансфекцию или инъекцию вещества в клетку. Исторически термин трансфекция означал введение в клетку любой молекулы, обычным образом не проникающей через мембрану клетки [424, 425]. В настоящее время различают трансфекцию как интернализацию и последующие биологические эффекты нуклеиновых кислот, в то время как под термином оптическая инъекция подразумевают введение всех других молекул, обычно не проникающих лекарственных препаратов, флуорофоров, или даже антител. В настоящее время наиболее часто вводят именно нуклеиновые кислоты, такие как ДНК, информационная РНК (иРНК, мРНК) или небольшие олигонуклеотиды (как при исследовании интерференции РНК, иРНК).

Использование лазерного излучения для оптопорации имеет по сравнению с другими методами множество достоинств, к которым относятся чрезвычайная простота обеспечения стерильных условий, сохранение жизнеспособности клеток и возможность интеграции с другими оптическими технологиями, такими как конфокальная микроскопия, оптические ловушки (пинцеты), и микрожидкостными системами.

Различают две категории лазерной оптопорации — прицельную и неприцельную. В случае прицельной — лазерный пучок фокусируется на плазматическую мембрану клетки, в которой генерируется небольшое отверстие или пора и только эта клетка подвергается трансфекции или инъекции, остальные клетки остаются абсолютно не тронутыми. Реакция клетки на такую операцию обычно наблюдается в микроскопе светлого поля. Сама реакция зависит от времени экспозиции, типа лазерного источника, а иногда и от типа химического поглощающего свет агента, добавляемого в среду. Ниже определенного порога эффект отсутствует, сильно выше порога — имеют место морфологические изменения в клетке, включая увеличение гранулированности,

Таблица 1.10. Используемые типы лазеров и экспериментальные данные для оптической инъекции и трансфекции биологических препаратов в клетки животных и человека [424]

| λ, нм | Лазер, диаметр пучка 2w | Тип клеток | Тип операции, биологический препарат |
|-------|---|---|---|
| 337 | N ₂ -лазер, 3 нс, 1 импульс | NG108 | Прицельная, тест на токсичность; через 1 ч после оптической инъекции препарата только 39%, а через 12 ч только 16% клеток сохранялись живыми; > 60% клеток погибало по причине апоптоза |
| 355 | Третья гармоника АИГ:Nd (1064 нм); 2w = 2 мкм; одиночный импульс, 0,91–1,10 мкДж/им | HuH-7 клетки карциномы печени; NIH/3T3 фибробласты и миеломные клетки мыши BALB/C; HT1080-6TG клетки фибросаркомы человека | Прицельная, ДНК, pEGFP-N1 (20 мкг/мл); эффективность трансфекции HuH-7: 9,4% (24 ч), 13% (48 ч), NIH/3T3: 10,1% (24 ч) |
| 355 | Третья гармоника АИГ:Nd (1064 нм), 5 нс, 10 Гц; 2w = 0,5 мкм; доза 1 мДж | Клетки почки крысы в норме | Прицельная, ДНК, эффективность трансфекции 38,8%, скорректированная с учетом удвоения популяции 10,2% |
| 405 | Непрерывный диодный фиолетовый; 2w = 2 мкм; доза 0,3 мВт, 40 мс | Яйцеклетки китайского хомячка (ЯКХ) K1 | Прицельная, ДНК, pEGFP-N3, DsRed-Mito (3 мкг/мл) |
| 488 | Непрерывный аргоновый; 2w = 0,7; 1,0; 4; 5–8 мкм; 1,0–2,0 МВт/см ² ; 1–2,5 с оптимальная доза: 1,0 МДж/см ² | ЯКХ, клетки сердечной мышцы новорожденной крысы | Прицельная, ДНК, GFP (8,3 мкг/мл); эффективность трансфекции 29 ± 10% |
| 532 | Вторая гармоника АИГ:Nd (1064 нм), 5 нс; 2w = 0,3–0,4 мкм; одиночный импульс 10 мкДж | базофильные лейкозные клетки крысы | Неприцельная, флуорофоры, макромолекулы, пептиды (800–40000 Да); эффективность инъекции 30–80% |
| 532 | Вторая гармоника АИГ:Nd (1064 нм) 0,5 нс, 2 кГц; оптимальная доза ~ 60 нДж/мкм ² | HeLa, SU-DLH-4, NTERA-2, MO-2058, PFSK-1, 184-A1, SEM, NIH/3T3, 293T, HepG2, первичные кардиомиоциты крысы, эмбриональные клетки C166 | Прицельная и неприцельная, Ca ²⁺ , Zn ²⁺ , различные красители и макромолекулы, квантовые точки, SiPHK; поры затягивались примерно через 30 с |
| 780 | Титан-сапфировый, 100 фс, 83 МГц; дифракционно-ограниченный пучок; 25–70 мВт в фокусе | ЯКХ | Оптическая инъекция, одиночные 100-нанометровые золотые частицы; перед инъекцией частицы к поверхности клетки доставлялись с помощью оптического пинцета |

Продолжение табл. 1.10

| λ, нм | Лазер, диаметр пучка 2w | Тип клеток | Тип операции, биологический препарат |
|-------|--|---|--|
| 780 | Титан-сапфировый, 200 фс, 76 МГц; 2w = 1 мкм; 20 мВт при растровом сканировании 95 × 95 мкм ² в течение 5 с на глубину ткани в 2 мм | Клетки большеберцовой мышцы мыши <i>in vivo</i> | Неприцельная, ДНК <i>in vivo</i> ; GFP, люцифераза, β-галактозидаза, эритропоэтин хомяка (333 мкг/мл в 30 мкл (всего 10 мкг) внутримышечная инъекция) |
| 790 | Титан-сапфировый, 120 фс, 100 МГц; 2w = 1,8 мкм; 3 экспозиции 40 мс, 70 мВт в центре пучка Бесселя | ЯКХ | Прицельная, ДНК, DsRed-Mito (1,2 мкг/мл); эффективность трансфекции > 20% на расстоянии 100 мкм вдоль оси пучка, пиковая эффективность ~ 47% |
| 790 | Титан-сапфировый, 800 фс, 100 МГц; 2w ~ 5 мкм; 3 экспозиции 80 мс, 110 мВт в фокусе | ЯКХ | Прицельная, ДНК, DsRed-Mito (3 мкг/мл); эффективность трансфекции > 25–57%; облучение через волоконный световод с фокусирующим выходом в виде аксикона |
| 792 | Титан-сапфировый, 12 фс, 75 МГц; 5–7 мВт в фокусе | Стволовые клетки слюнной (hSGSC) и поджелудочной желез человека (hPSC), ЯКХ | Прицельная, ДНК; pEGFP-N1 (0,4 мкг/мл); эффективность трансфекции: hSGCS — 80%, hPSC — 75% и ЯКХ — 90% |
| 793 | Титан-сапфировый с регенеративным усилением, 100 фс, 3,8 кГц; 2w = 1,6 мкм; 5–9 Дж/см ² (низкая), 14–23 Дж/см ² (средняя) и 41–55 Дж/см ² (высокая), 10–10000 импульсов | ЯКХ | Прицельная, исследование витальности |
| 800 | Титан-сапфировый, 120 фс, 80 МГц; 2w = 1 мкм; 50–225 мВт, 10–250 мс, оптимальная доза 1,2 мкДж/см ² | ЯКХ-K1 | Прицельная, ДНК, pEGFP-N2; эффективность трансфекции для оптимальной дозы: 50 ± 10% |
| 800 | Титан-сапфировый, 100 фс, 82 МГц; 2w = 0,8 мкм; серия экспозиций < 100 мс | HL60 | Прицельная, макромолекулы, pEGFP-C1-НМGB1, pEGFP-C1 (50 мкг/мл), пропидиум иодид (1,5 мкМ), желтый люцифер (100–1000 мкМ); эффективность инъекции 70% |
| 800 | Титан-сапфировый, ~ 210 фс, 90 МГц; экспозиция 40 мс; 0,9 нДж/им | GFSHR-17 клетки гранулезоклеточной опухоли / МТН53а молочной железы собаки | Прицельная, ДНК |
| 800 | Титан-сапфировый, > 10 фс, 80 МГц; 2w < 1 мкм; экспозиция < 10 мс | Мадин-Дарби клетки почки собаки | Прицельная, макромолекулы; 0,2–0,5 М сахарозы (диаметр молекулы 1,6 нм); эффективность инъекции 72,3% |

1.8. Примеры применения лазеров в биомедицинской диагностике, терапии и хирургии 83

| λ, нм | Лазер, диаметр пучка 2w | Тип клеток | Тип операции, биологический препарат |
|-------|---|--|---|
| 800 | Титан-сапфировый, 12 фс, 75 МГц; 2w = 2 мкм; экспозиция 100 мс, 20 мВт в фокусе | PC12, первичные астроциты крысы | Прицельная, флуорофор, пропидиум иодид (5 мкМ) |
| 800 | Титан-сапфировый, ~ 200 фс, 82 МГц; 2w = 0,308 мкм | ВАЕС, <i>Spisulsa Solidissima Oocytes</i> | Прицельная, флуорофор |
| 800 | Титан-сапфировый, 170 фс, 90 МГц; экспозиция 17 мс; 49–65 мВт | ЯКХ, SK-Mel 28, NG108-15, T47D клон 11 | Прицельная, ДНК, флуорофоры, включая FITC меченый декстран (500 000 Да, диаметр молекулы 26,6 нм), eGFP-N1 |
| 800 | Титан-сапфировый, фс, 80 МГц; 7 мВт | PtK2 | Неприцельная, флуорофор, пропидиум иодид (5 мкМ) |
| 800 | Титан-сапфировый, фс, 80 МГц; экспозиция 16 мс; 50–100 мВт | ЯКХ | Прицельная, ДНК, pEGFP-N1 (0,4 мкг/мл); эффективность трансфекции 100 % |
| 800 | Титан-сапфировый с регенеративным усилением, 150 фс, 125 Гц; 2w = 1 мкм; 20 импульсов, 10 нДж/им | NIH 3T3 | Прицельная, 200 нм полистироловые сферы |
| 840 | Титан-сапфировый, 100 фс, 80 МГц; 2w — дифракционно-ограниченный; 8–16 областей на плазматической мембране облучались 1–5 мс, 24 мВт в фокусе | Первичные нейроны крысы | Прицельная, мРНК, флуорофоры; люцифер желтый, <i>Elk1-GFP mRNA</i> , <i>Elk1 mRNA</i> , <i>Elk1-ETS mRNA</i> , <i>c-fos mRNA</i> , DS-RED, Venus флуоресцирующий белок, pTRI-Xef (все 10–15 мкг/мл) |
| 1064 | АИГ:Nd с модуляцией добротности, 17 нс, 10 Гц; 3–4 Дж/см ² | MCF-7 | Прицельная, ДНК, флуорофоры: мероцианин 540 (7,5 мкг/мл), pEGFP-N1 (5 мкг/мл) |
| 1064 | АИГ:Nd; 2w = 220 мкм; 150 мДж с 1000, 2000, или 2500 импульсами | Переходно-клеточный рак | Неприцельная, ДНК, pEGFP-N1 (200 мкг/мл); малая эффективность (< 2 %) для всех доз |
| 1554 | Erbium-glass, 170 фс, 20 МГц; 2w = 2 мкм; экспозиция 7 с; 10 ¹² Вт/см ² | HerG2 | Прицельная, ДНК, флуорофоры: пропидиум иодид (1,5 мкг/мл), pEGFP-C1 (20 мкг/мл); эффективность 77,3 %; поры затягивались менее чем через 10 с |
| 2080 | АИГ:Ho, 10 Гц; 2w = 220 мкм; доза 750 импульсов, 2000 мДж | Переходно-клеточный рак | Неприцельная, ДНК, pEGFP-N1 (200 мкг/мл); тепловой механизм, температура клеток увеличивается до 45–55 °С, протокол требует охлаждения при облучении |
| 2080 | АИГ:Ho, 10 Гц; доза 200 импульсов, 2000 мДж | MatLu клетки аденокарциномы простаты крысы | Неприцельная, ДНК, pEGFP-N1 (300 мкг/мл); эффективность 41,3 %; нефокусированный лазерный пучок |

Таблица 1.11. Основные области применения лазеров в биомедицине

| Область и характер применения | Инструментарий |
|--|--|
| Микродиагностика | |
| Лазерная спектроскопия биообъектов (абсорбционно-трансмиссионная и отражательная, калориметрическая (оптико-акустическая (ОА)), комбинационного рассеяния, флуоресцентная и пр.) для определения микроструктуры, содержания микропримесей, изучения механизмов различных патологий на молекулярном, субклеточном и клеточном уровне, и диагностики заболеваний, включая раковые, сосудистые и т. д. | Лазерные спектрометры различных типов, обладающие высокой чувствительностью, значительным спектральным и временным разрешением; спектрофотометры, флуоресцентные спектрометры, КР-спектрометры, фурье-спектрометры, конфокальные микроскопы-спектрометры, ОА-спектрометры и их комбинации, оптические многоканальные анализаторы (ОМА), охлаждаемые ПЗС-камеры; лазерные цитометры; ОА и флуоресцентные зонды и волоконно-оптические катетеры, двух- и трехфотонные флуоресцентные микроскопы, микроскопы на основе генерации второй гармоники и т. д. Используются все типы лазеров от УФ до ИК, в том числе перестраиваемые и импульсные с модуляцией добротности и синхронизацией мод |
| Спектроскопия ближнего ИК-диапазона (NIRS) тканей головного мозга взрослых, новорожденных и плода, мышечных тканей для анализа гемодинамики и метаболических процессов (мозговое кровообращение, объем крови, мозговая гипоксия и ишемия, оксигенация мышечной ткани, построение динамических карт активности мозга и т. д.) при интенсивной терапии и общих хирургических вмешательствах, особенно у новорожденных, используется в нейрофизиологии, спортивной медицине, стоматологии, дерматологии и т. д. | Полупроводниковые и другие лазеры, а также световоды ближнего ИК-диапазона (700–900 нм), многоканальные волоконно-оптические системы, оптические томографы с использованием лазеров непрерывного действия, импульсных и модулированных по интенсивности |
| Лазерный микроанализ биообъектов (компоненты биотканей, крови и пр.) для определения их структуры и содержания микропримесей, микровключений при решении задач токсикологии, транспорта, усвоения питательных веществ и т. д. | Лазерные микроанализаторы, масс-спектрометры на основе рубиновых и гранатовых лазеров с преобразованием частоты |
| Макродиагностика | |
| Исследование различных биообъектов (ансамблей макромолекул, клеток, вирусов, бактерий, тканей, органов) с помощью упругого и квазиупругого рассеяния; мониторинг кровотока и лимфотока; диагностика заболеваний в офтальмологии, дерматологии, гематологии и пр. | Лазерные микроскопы, нефелометры, поляризационные нефелометры, анемометры, доплеровские микроскопы, измерители микроциркуляции крови, фотоплетизмографы, многопараметрические цитометры, волоконно-оптические зонды и пр. Используются в основном He–Ne-лазеры, полупроводниковые и аргоновые лазеры. Применяются также новые типы стабильных высокоэффективных твердотельных лазеров с полупроводниковой накачкой и преобразованием гармоник, например АИГ: Nd-лазеры и волоконные лазеры |

Продолжение табл. 1.11

| Область и характер применения | Инструментарий |
|---|--|
| Оптическая диффузионная функциональная томография патологических тканей | Оптические томографы и маммографы непрерывного действия, с разрешением во времени и с использованием волн фотонной плотности, методов диффузионно-волновой и оптико-акустической спектроскопии. Используются лазеры ближнего ИК-диапазона, многоканальные волоконно-оптические системы на основе полупроводниковых лазеров, гранатовые лазеры, титан-сапфировые лазеры и пр. |
| Интерферометрические и спекл-интерферометрические исследования органов, тканей, кровотока, лимфотока и т. д. | Лазерные интерферометры, в том числе и волоконно-оптические, доплеровские анемометры, полнопольная спекл-интерферометрия, оптические когерентные томографы, ретинометры, измерители толщины и шероховатости биотканей, биовиброметры и пр. Используются в основном He-Ne- и полупроводниковые лазеры, суперлюминесцентные светодиоды, титан-сапфировые лазеры с малой длиной когерентности, лазерные источники качающей частоты, а также высокоскоростные и высокоразрешающие ПЗС- и CMOS-камеры |
| Получение трехмерных изображений биообъектов, картирование их контуров, анализ деформаций и пр. | Лазерные голографические устройства, в том числе голографические интерферометры, динамические системы для измерений в реальном масштабе времени и пр. В основном используются He-Ne-, He-Cd- и Ag-лазеры |
| Терапия | |
| Лазерная фотохимиотерапия, фотодинамическая терапия рака, лечение псориаза, сосудистых и других заболеваний с использованием производных гематопорфирина (ППП), фталоцианинов, хлоринов, пурпуринов и других экзогенных фотосенсибилизаторов патологических тканей, а также активаторов эндогенных фотосенсибилизаторов, таких как 5-аминолевулиновая кислота (ALA) | Лазерные терапевтические установки на основе лазеров на красителях, линеек и матриц полупроводниковых лазеров и светодиодов, аргоновых, эксимерных и азотных лазеров. В последние годы для фотодинамической терапии исключительно используются матрицы полупроводниковых лазеров или светодиодов |
| Лазерная межтканевая термотерапия (ЛИТ) для локальной коагуляции опухолей мозга, микрососудистой системы, ткани печени, простаты и пр. | Мощные лазеры ближнего ИК-диапазона (гранатовый, полупроводниковые), специальные охлаждаемые волоконно-оптические аппликаторы, томографическое сопровождение (МР или УЗИ) |
| Термотерапия поверхностных сосудов, «портвейновых пятен», удаление веснушек, татуировок и пр. | Мощные лазеры, работающие в зелено-желтой области спектра (лазеры на красителях, на парах меди, вторая гармоника гранатового лазера) |
| Термическое омоложение кожного покрова и удаление волос | Мощные лазеры ближнего и среднего ИК-диапазона (CO ₂ -лазеры, полупроводниковые и гранатовые лазеры), охлаждение поверхности кожи |
| Фототерапия новорожденных с избыточным содержанием билирубина в крови | Облучение светом на длинах волн вблизи 452 нм |

Продолжение табл. 1.11

| Область и характер применения | Инструментарий |
|---|--|
| Лазерная биостимуляция с помощью низкоинтенсивного излучения в УФ-, видимой и ИК-областях спектра при лечении трофических язв, артритов, дерматозов, стоматологических, урологических и других заболеваний | Лазерные биостимуляторы с использованием волоконно-оптических средств доставки излучения на основе He-Ne-, He-Cd-, AlGaAs-, N ₂ - и Cu-лазеров, а также других типов лазеров и светодиодов относительно малой интенсивности. Типичные длины волн: 337, 361, 405, 457, 514, 585, 595, 632,8, 635, 650, 660, 670, 684, 720, 780, 808, 820, 830, 904, 1064 и 1450 нм. Основными источниками излучения являются полупроводниковые лазеры и светодиоды |
| Лазеро-пунктурная рефлексотерапия на основе карт биологически активных точек и зон Захарьина-Геда в традиционной рефлексотерапии | Лазерные биостимуляторы для рефлексотерапии на основе He-Ne-, полупроводниковых и других типов лазеров малой интенсивности; УФА азотный лазер (при предварительной фотосенсибилизации кожи в области активных точек) |
| Хирургия | |
| Офтальмология: операции на стекловидном теле; фотокоагуляция сетчатки (ретинопатия, отслоения, разрывы и пр.), пигментного эпителия и сосудистой оболочки; пробивка отверстий при лечении глаукомы; фотокоагуляция и пробивка отверстий в радужной оболочке; лечение меланом и других опухолей; операции на роговице и хрусталике; трансклеральная хирургия; лечение кератозов и катаракты; исправление рефракции глаза и т. д. | Лазерные офтальмологические фотокоагуляторы на основе аргоновых и криптоновых лазеров, а также с использованием излучения гранатового лазера и лазеров на красителях. Эксимерные, эрбиевый, гольмиевый и мощные полупроводниковые лазеры, лазеры с короткой и сверхкороткой длительностью импульсов |
| Общая хирургия: хирургия желчных путей, пороков сердца, пищевода, желудка, кишечника, печени, поджелудочной железы и пр. | Лазерные хирургические скальпели. В основном используются CO ₂ -, СО-, АИГ:Nd- и Ag-лазеры, специальные компрессионные и растягивающие зажимы, сшивающие аппараты. В последние годы используются мощные полупроводниковые лазеры |
| Нейрохирургия и некоторые виды микрохирургии (глотки, гортани, шеи, бронхов и пр.) | Микрохирургические лазерные скальпели на основе CO ₂ - и АИГ:Nd-лазеров, эксимерные лазеры, эрбиевый и гольмиевый лазеры, а также полупроводниковые лазеры |
| Хирургия желудка и пищевода и других внутренних органов, коагуляция язв, остановка кровотечений и пр. | Лазерные эндоскопические скальпели и коагуляторы, в том числе с использованием волоконных световодов с сапфировыми наконечниками. Используются Ag-, Кг-, АИГ:Nd- (вторая гармоника), АИГ:Nd (1,06 мкм и 1,32 мкм), гольмиевый и СО ₂ -лазеры |
| Сердечно-сосудистая хирургия (лазерная ангиопластика) | Волоконно-оптические катетеры с применением аргонового, медного и эксимерных лазеров, излучения второй и третьей гармоник гранатового лазера; нагреваемые лазером металлические наконечники; катетеры с кварцевыми и сапфировыми колпачками, микролинзовыми элементами. Применяются также СО ₂ -лазеры и лазеры на красителях, гольмиевые лазеры с многоволоконными световодами (20–300 волокон в пучке) |

Окончание табл. 1.11

| Область и характер применения | Инструментарий |
|---|---|
| Разрушение камней желчного и мочевого пузыря и почек. Лазерная интрокорпоральная литотрипсия | Мощные импульсные лазеры на красителях с ламповой накачкой, работающие в области $\lambda = 450\text{--}700$ нм, с применением волоконно-оптических катетеров; гранатовые лазеры с модуляцией добротности и волоконно-оптическим катетером с металлическим колпачком; эксимерные лазеры |
| Лапароэндоскопические операции (удаление желчного пузыря, аппендэктомия, герниопластика, стволовая ваготомия, лечение пептической язвы, сальпингэктомия) | Бесконтактные и контактные лазерные волоконно-оптические скальпели на основе Ag-, АИГ:Nd- и CO ₂ -лазеров. Эндоскопы с видеомониторами, специальное лапароэндоскопическое оборудование |
| Урология и гинекология (эрозия, воспаление, полипы, рак шейки матки, аденома предстательной железы, опухоли мочевого пузыря, полипы и папилломы мочеиспускательного канала, свищи пузырные и пузырно-влагалищные и пр.) | Аргоновые, гранатовые и CO ₂ -лазеры. Перспективны гольмиевые и александритовые лазеры |
| Дерматология (удаление новообразований, родинок, бородавок и пр.) | Аргоновые, медные и CO ₂ -лазеры, непрерывные и импульсные лазеры на красителях, АИГ:Nd-лазеры, мощные полупроводниковые лазеры. Используются красители и поглощающие наночастицы в качестве медиаторов селективного нагрева патологической ткани |
| Флебология (некоторые типы ангиом, телеангиэктазия, расширение вен и пр.) | Все типы хирургических лазеров |
| Ортопедия (артропластика, абляция суставных хрящей, волокнистого хряща мениска, сухожилий и пр.) | CO ₂ -, АИГ:Nd-, АИГ:Ег- и АИГ:Но-лазеры, эксимерные лазеры |
| Отоларингология (хирургия носовой и ротовой полостей, уха, горла, трахеи, голосовых связок, удаление полипов, опухолей, лечение стенозов гортани и пр.) | CO ₂ -, АИГ:Nd- и полупроводниковые лазеры, другие типы мощных лазеров, волоконно-оптические эндоскопы |
| Стоматология (упрочнение дентина) | Мощные лазеры ИК-диапазона, гольмиевый, эрбиевый и другие в сочетании с аппликацией фтористых соединений |
| Сваривание тканей, сосудов, нервов | АИГ:Nd-, мощные полупроводниковые и другие типы лазеров в зависимости от толщины свариваемой ткани, используются красители и поглощающие наночастицы в качестве медиаторов селективного нагрева ткани |
| Лабораторные применения | |
| Стерилизация медицинского инструмента | Все типы лазеров с высокой или средней мощностью в зависимости от длины волны (1–600 Вт), низкоинтенсивные лазеры при предварительной сенсibilизации бактерий и спор красителями |
| Бесконтактное перфорирование кожи для забора капиллярной крови | Лазерный перфоратор на основе эрбиевого лазера |

Таблица 1.12. Области медицинских применений волоконных лазеров, активированных Yb (0,97 мкм), Nd (1,06 мкм), Er (1,56 мкм), Yb/Er (0,97/1,56 мкм) и Tm (1,9 мкм); рекомендуемые длины волн и максимальные рабочие мощности [420]

| Область применения | Длина волны, мощность излучения | Примечание |
|--|--|--|
| Оториноларингология | | |
| Лечение ЛОР-патологии в ходе пластических операций (проводимых одновременно на нескольких очагах патологии), включающее наряду с хирургическими воздействиями коррекцию формы хряща (носовой перегородки, крыльев носа и ушной раковины) методом лазерной термопластики хрящевой ткани | 0,97 мкм, 10–20 Вт 1,56 мкм, 2,5–5 Вт 0,97/1,56 мкм, 10/2,5 Вт 1,9 мкм, 3Вт | Излучение на длине волны 0,97 мкм хорошо сочетает режущие и коагулирующие свойства; излучение на длине волны 1,56 мкм обеспечивает оптимальное для проведения термопластики хрящевой ткани соотношение поглощения излучения водой и гемоглобином; двухволновые лазеры (0,97/1,56 мкм) позволяют оптимизировать характер воздействия в зависимости от этапа операции; излучение на длине волны 1,9 мкм обеспечивает эффективное рассеечение и поверхностное удаление биоткани |
| Сосудистые патологии | | |
| Лечение варикозно расширенных вен методом эндовенозной лазерной облитерации (ЭВЛО) | 0,97 мкм, 30 Вт 1,06 мкм, 30 Вт 1,56 мкм, 15 Вт | Излучение на длине волны 1,56 мкм обеспечивает большую эффективность при ЭВЛО; излучение на длинах волн 0,97 и 1,06 мкм является более универсальным, поскольку позволяют наряду с ЭВЛО лечить сосудистые звездочки (телеангиэктазия) методом транскутанного (чрескожного) склерозирования сосудов |
| Лечение телеангиэктазии (сосудистых звездочек), плоских гемангиом | 0,97 мкм, 30 Вт 1,06 мкм, 30 Вт | Чрескожное лазерное склерозирование сосудов |
| Лечение комбинированных гемангиом | 0,97 мкм, 30 Вт | |
| Дерматология | | |
| Лечение различных образований кожи (папилломы, кондиломы, бородавки, невусы, кератозы кожи, гемангиомы, фибромы, липомы, атеромы, контагиозный моллюск, базальноклеточный рак кожи) | 0,97 мкм, 10 Вт | Излучение на длине волны 0,97 мкм хорошо сочетает режущие и коагулирующие свойства |

| Область применения | Длина волны, мощность излучения | Примечание |
|--|-----------------------------------|---|
| Стоматология | | |
| Лечение заболеваний пародонта (эпулис, гипертрофический гингивит, перикоронит), слизистой оболочки рта и губ (длительно незаживающая эрозия слизистой языка и щеки, ограниченный гипер- и паракератоз, эрозивно-язвенная форма плоского лишая, лейкоплакии), доброкачественных новообразований полости рта и губ (фиброма, киста малых слюнных желез, ранула, гемангиома, радикулярная киста, кондилома, папиллома), а также отбеливание зубов, стерилизация корневого канала, коррекция анатомо-топографических особенностей строения мягких тканей полости рта (мелкое преддверие полости рта, короткая уздечка языка, короткая уздечка верхней и нижней губы) | 0,97 мкм, 5–8 Вт 1,9 мкм, 3 Вт | Излучение на длине волны 0,97 мкм хорошо сочетает режущие и коагулирующие свойства; излучение на длине волны 1,9 мкм обеспечивает эффективное рассечение и поверхностное удаление биотканей |
| Проктология | | |
| Лечение геморроя, анальных трещин, парапроктита, параректальных свищей, кист копчика, эпителиальных копчиковых ходов, кондиломатоза и папиломатоза перианальной зоны и прямой кишки | 0,97 мкм, 20 Вт | Излучение на длине волны 0,97 мкм хорошо сочетает режущие и коагулирующие свойства |
| Гинекология | | |
| Ампутация и экстирпация шейки матки, клиновидная резекция яичников, консервативная миомэктомия, эндометриоз, лечение патологий шейки матки (эрозия, лейкоплакия, эритроплакия, рубцовые деформации, эрозированный эктропион), а также папиллом, кондилом и полипов наружных половых органов и влагалища | 0,97 мкм, 6–10 Вт | Излучение на длине волны 0,97 мкм хорошо сочетает режущие и коагулирующие свойства |
| Ортопедия и травматология | | |
| Лечение первично-хронического остеомиелита при небольших очагах воспаления, острого гематогенного остеомиелита и хронического остеомиелита, несрастающихся переломов | 0,97 мкм, 30 Вт | Использование лазерной остеоперфорации |
| Лечение заболеваний суставов | 0,97 мкм, 20–30 Вт | Лазерная артроскопическая хирургия |

Окончание табл. 1.12

| Область применения | Длина волны, мощность излучения | Примечание |
|--|--|--|
| Общая хирургия | | |
| Лапароскопическая лазерная хирургия на органах желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), связанная с резекцией и вскрытием просвета полых органов и формированием различного рода межорганных анастомозов, остановка кровотечений из острых язв и эрозий ЖКТ; эндоскопические лазерные вмешательства на пищеводе, гортани, трахее и бронхах; резекция паренхиматозных органов; кожно-пластические операции, требующие препарирования тканей в условиях полного гемостаза и стерильности, забор кожного лоскута, обработка поверхности, подлежащей закрытию; лечение гнойных ран путем одномоментного удаления омертвевшей ткани и стерилизации раневой поверхности; первичная хирургическая обработка ран; вскрытие гнойных полостей и выпаривание абсцессов | 0,97 мкм, 20–30 Вт 1,56 мкм, 10-15 Вт | |
| Нейрохирургия | | |
| Лечение остеохондроза шейного и поясничного отделов позвоночника, осложненного грыжеобразованием (грыжи дисков медианные и парамедианные, протрузии дисков) и развитием компрессионно-ишемической радикулопатии; нестабильности позвоночных двигательных сегментов (спондилолистез I–II степени); стойкого болевого синдрома шейной, поясничной локализации, резистивного к консервативному лечению в течение более 3 месяцев | 0,97 мкм, 5 Вт 1,56 мкм, 2,5–5 Вт | Отсутствие четких показаний к нейрохирургической дискэктомии; соматические противопоказания к проведению нейрохирургической дискэктомии и общему наркозу |
| Пункционная денервация тройничного нерва | 0,97 мкм, 5 Вт 1,56 мкм, 2,5 Вт | |
| Кардиология | | |
| Трансмиокардиальная лазерная реваскуляризация | 0,97 мкм, 10–20 Вт 1,56 мкм, 10 Вт | |

1.8. Примеры применения лазеров в биомедицинской диагностике, терапии и хирургии 91

пузырчатости и дезинтеграцию мембраны. В идеальном случае терапевтическая доза лежит где-то между этими крайними случаями, где проницаемость клетки является обратимой и клетка восстанавливается к нормальному состоянию в течение секунд или минут после окончания операции. Однако в реальных условиях терапевтическая доза и избыточная доза немного перекрываются, поэтому выживаемость клеток обычно меньше 100%.

Типичные лазерные источники для прицельной оптической инъекции или трансфекции включают 800-нанометровые фемтосекундные импульсные титан-сапфировые лазеры и лазерные источники непрерывного излучения на 405 и 488 нм. Наносекундные импульсные Nd:YAG-лазеры с длиной волны 1064 нм также используются для целевой трансфекции, хотя более часто они применяются при нецелевой оптической трансфекции. Основные параметры лазеров и экспериментальные данные для оптической инъекции и трансфекции биологических препаратов в клетки животных и человека представлены в табл. 1.10 [424].

Основные области применений лазеров в фотомедицине, а также инструменты и приборы, реализующие лазерные методы диагностики, терапии и хирургии, представлены в табл. 1.11. Области медицинских применений мощных волоконных лазеров, активированных Yb (0,97 мкм), Nd (1,06 мкм), Er (1,56 мкм), Yb/Er (0,97/1,56 мкм) и Tm (1,9 мкм) представлены в табл. 1.12 [420].

1.9. Проблемы и перспективы

Настоящая книга касается только некоторых проблем взаимодействия света с биологическими тканями, связанных в основном с рассеянием и поглощением света случайными и квазиупорядоченными структурами, а также переизлучением света компонентами биотканей. Рассмотренные в этой и последующих главах эффекты и результаты исследований показывают необходимость углубленного изучения оптики биотканей с разнообразной структурной организацией. К настоящему времени качественная (а иногда и количественная) картина распространения света в биотканях может быть описана достаточно полно, что позволяет реализовывать ту или иную стратегию оптической диагностики, терапевтического или хирургического воздействия. Однако в ряде случаев количественные оценки дозы облучения или диагностического параметра оказываются затруднительными из-за отсутствия надежных данных для оптических параметров биотканей или их изменения в процессе взаимодействия света с объектом.

Традиционные спектрофотометрические, угловые и поляризационные методы измерений оказываются полезными для изучения биотканей. Дальнейшее развитие этих методов в направлении биомедицинских приложений требует построения более совершенных моделей тканей, учитывающих пространственное распределение поглотителей и рассеивателей, их полидисперсность, оптическую активность и двулучепреломление материала рассеивателей и базового вещества.

Необходимо развивать методы решения обратных задач с учетом реальной геометрии образца и лазерного пучка, справедливые для произвольного отношения коэффициентов рассеяния и поглощения. Во многих случаях хорошие результаты дает инверсный метод Монте-Карло [12, 13, 30–32, 66, 426–429]; для быстрых расчетов, требующихся при реализации практических медицинских методик диагностики и дозиметрии, могут быть полезны методы, базирующиеся на приближенных решениях уравнений теории переноса излучения.

В настоящее время ведутся интенсивные исследования диффузных волн фотонной плотности, лежащих в основе модуляционных фазовых методов исследования оптических характеристик биотканей [1, 3, 12, 13, 30–32, 162, 163], однако проблема

требует дальнейшей разработки в плане создания надежных алгоритмов восстановления 3-мерных изображений биотканей и построения оптических томографов.

Метод матрицы рассеяния хорошо известен в оптике и в последнее время используется многими авторами для исследований биотканей и клеточных суспензий. Обычно анализируется матрица интенсивности (матрица Мюллера), между тем, применение двухчастотных лазеров, таких как зеемановский лазер, или оптического когерентного томографа (ОКТ) позволяет измерять элементы амплитудной матрицы (матрицы Джонса), что открывает путь для упрощения решения обратной задачи для многих биологических структур [27, 32, 76, 123].

Дозиметрия лазерного излучения — очень важное направление исследований в фотобиологии, необходимое для практической реализации многих методов фототерапии. К настоящему времени многими авторами разработаны основные дозиметрические принципы [2, 3, 12, 13, 30–32, 62, 210, 211]. Тем не менее, необходимо развивать 3-мерные дозиметрические модели, учитывающие индивидуальные особенности биотканей, технологию фототерапии и оптические характеристики терапевтических устройств.

Когерентно-оптические методы исследования биотканей, основанные на эффектах дифракции, интерференции, фазовой, конфокальной и голографической микроскопии, представляют значительный интерес для развития фотомедицины [1, 3, 5, 10, 12–41, 103–106, 111–125, 146, 397, 430–446]. Для лазерной диагностики неоднородных тканей перспективными являются методы спекл-оптики и спекл-интерферометрии [5, 9–13, 19, 27, 31, 41, 101, 104, 105, 121, 128, 175, 176, 400–407]. Много полезной информации о когерентных методах исследования и их приложениях в оптике клеток и биотканей можно найти в обзорах [172, 392]. В частности, в [392] рассмотрены физические основы клеточного движения и лазерная доплеровская анемометрия как основной метод бесконтактного мониторинга клеточного и внутриклеточного движения, что очень важно при исследованиях биотканей *in vivo*.

Затрагиваемые в настоящей книге вопросы поляризационных свойств биотканей имеют прямое отношение к поляризационной физиологической оптике, основные идеи которой изложены в обзоре [447].

РАСПРОСТРАНЕНИЕ СВЕТА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ

2.1. Распространение непрерывного излучения

Основные закономерности распространения света в биологических тканях могут быть описаны на основе представлений о переносе излучения в случайно-неоднородных средах. Известны два подхода к такому описанию — это теория переноса излучения, характеризующая эволюцию распространяющегося в среде потока энергии излучения, и теория многократного рассеяния, описывающая волновые свойства рассеянных световых полей (см. [120, 245]). В отличие от теории многократного рассеяния, теория переноса излучения не позволяет описать эффекты интерференции волн при рассеянии когерентного излучения; однако между двумя подходами существует фундаментальная взаимосвязь, определяемая соотношением между угловым спектром потока излучения, получаемым в рамках теории переноса, и пространственной корреляционной функцией флуктуаций рассеянного поля, получаемой в теории многократного рассеяния.

Подобная взаимосвязь позволяет ввести такую универсальную характеристику для описания распространения света в случайно-неоднородной среде, как плотность распределения оптических путей составляющих рассеянного поля $\rho(\mathbf{s})$. Универсальность заключается в возможности получения параметров рассеянного поля как интегральных преобразований $\rho(\mathbf{s})$ с соответствующим образом выбранными ядрами, в то время как функция $\rho(\mathbf{s})$ может быть получена в рамках теории переноса излучения.

Итак, достаточно строгое математическое описание процесса распространения непрерывного излучения (немодулированного по интенсивности света) в рассеивающей среде может быть сделано с помощью стационарной теории переноса излучения (ТПИ). Теория переноса справедлива для ансамбля достаточно удаленных друг от друга рассеивателей и с успехом применяется при решении ряда практических задач из оптики биотканей. Основное стационарное уравнение ТПИ для монохроматического света имеет вид [1, 3, 12, 13, 18, 27, 30–32, 245, 448]

$$\frac{\partial I(\mathbf{r}, \mathbf{s})}{\partial \mathbf{s}} = -\mu_t I(\mathbf{r}, \mathbf{s}) + \frac{\mu_s}{4\pi} \int_{4\pi} I(\mathbf{r}, \mathbf{s}') p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') d\Omega', \quad (2.1)$$

где $I(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ — лучевая интенсивность в точке \mathbf{r} в направлении \mathbf{s} , Вт · м⁻² · ср⁻¹; $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$ — фазовая функция рассеяния; $d\Omega'$ — единичный телесный угол в направлении \mathbf{s}' ; $\mu_s/\mu_t \equiv \Lambda$ — альbedo единичного рассеивателя. Предполагается, что внутри среды отсутствуют источники излучения. При наличии источника в среде в правую часть необходимо добавить член, характеризующий функцию источника $S(\mathbf{r}, \mathbf{s})$.

Если процесс переноса излучения исследуется в области $G \subset R^3$, а ∂G — граница области, то граничные условия на ∂G могут быть записаны в общем виде [449]:

$$I(\mathbf{r}, \mathbf{s})|_{(\mathbf{sn}) < 0} = S(\mathbf{r}, \mathbf{s}) + \widehat{R}I(\mathbf{r}, \mathbf{s})|_{(\mathbf{sn}) > 0}, \quad (2.2)$$

где $\mathbf{r} \in \partial G$; \mathbf{n} — внешняя нормаль к ∂G ; $S(\mathbf{r}, \mathbf{s})$ — лучевая интенсивность падающего света, \hat{R} — оператор отражения.

При наличии в области G отражающих или преломляющих свет поверхностей условия, аналогичные (2.2), должны быть заданы на каждой из них.

Практический интерес, как правило, представляет не сама функция $I(\mathbf{r}, \mathbf{s})$, а интегралы от нее по некоторым областям фазового пространства (\mathbf{r}, \mathbf{s}) . Например, при оптическом зондировании биотканей измеряемой величиной часто является функция распределения выходящего излучения на поверхности среды:

$$\Phi(\mathbf{r}) = \int_{(\mathbf{sn}) > 0} I(\mathbf{r}, \mathbf{s})(\mathbf{sn}) d\Omega, \quad (2.3)$$

где $\mathbf{r} \in \partial G$.

В задачах дозиметрии оптического излучения в биотканях такой величиной является полная освещенность в точке:

$$U(\mathbf{r}) = \int_{4\pi} I(\mathbf{r}, \mathbf{s}) d\Omega. \quad (2.4)$$

Фазовая функция $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}')$ описывает рассеивающие свойства среды и представляет собой функцию плотности вероятности для рассеяния в направлении \mathbf{s}' фотона, движущегося в направлении \mathbf{s} , т. е. характеризует элементарный акт рассеяния. Если рассеяние симметрично относительно направления падающей волны, тогда фазовая функция зависит только от угла ϑ между направлениями \mathbf{s} и \mathbf{s}' , т. е. $p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') = p(\vartheta)$.

Предположение о случайном распределении рассеивателей в среде, что означает отсутствие в структуре биоткани пространственной корреляции, ведет к следующей нормировке:

$$\int_0^\pi p(\vartheta) 2\pi \sin \vartheta d\vartheta = 1.$$

Во многих практических случаях фазовая функция хорошо аппроксимируется с помощью постулированной функции Хеньи–Гринштейна [1, 3, 12, 13, 30–32, 171]:

$$p(\vartheta) = \frac{1}{4\pi} \cdot \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \vartheta)^{3/2}}, \quad (2.5)$$

ϑ — угол рассеяния; g — средний косинус угла рассеяния (параметр анизотропии рассеяния) (см. (1.11)). Значение g изменяется в пределах от 0 до 1: $g = 0$ соответствует случаю изотропного (рэлеевского) рассеяния, $g = 1$ — полному рассеянию вперед (рассеянию Ми на крупных частицах [171]).

Интегродифференциальное уравнение (2.1) является сложным для анализа распространения света в рассеивающих средах, поэтому часто оно упрощается путем представления решения в виде сферических гармоник. Такое упрощение приводит к системе из $(N + 1)^2$ связанных дифференциальных уравнений в частных производных, известной как P_N -приближение. Эта система уравнений может быть сведена к одному дифференциальному уравнению $(N + 1)$ -го порядка. Например, для $N = 1$ необходимы четыре связанных дифференциальных уравнения, которые сводятся к единственному уравнению диффузионного типа [1, 3, 12, 13, 30–32, 450–456]. Для изотропной среды оно соответствует случаю, когда направленной составляющей

лучевой интенсивности в уравнении (2.1) можно пренебречь по сравнению с изотропной составляющей, и имеет следующий вид:

$$(\nabla^2 - \mu_d^2)U(\mathbf{r}) = -Q(\mathbf{r}), \quad (2.6)$$

где

$$\mu_d = \{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)\}^{0,5} \quad (2.7)$$

— диффузионный коэффициент (или эффективный коэффициент ослабления);

$$Q(\mathbf{r}) = D^{-1} \cdot S_d(\mathbf{r}),$$

$S_d(\mathbf{r})$ — функция источника диффузного излучения, т. е. число фотонов, инжектируемых в единицу объема;

$$D = c[3(\mu_a + \mu'_s)]^{-1} \quad (2.8)$$

— коэффициент диффузии фотонов;

$$\mu'_s = (1 - g)\mu_s \quad (2.9)$$

— приведенный (или транспортный) коэффициент рассеяния; c — скорость света в среде.

Средняя транспортная длина пробега фотона определяется выражением

$$l_{tr} = (\mu_a + \mu'_s)^{-1}, \quad (2.10)$$

где $\mu_{tr} = (\mu_a + \mu'_s)$ — транспортный коэффициент.

Отметим важное обстоятельство, что средняя транспортная длина пробега фотона в среде с анизотропным однократным рассеянием существенно выше длины свободного пробега в среде с изотропным однократным рассеянием: $l_{tr} \gg l_{ph}$, $l_{ph} = \mu_t^{-1}$ (см. (1.1)). Транспортная длина l_{tr} означает такую длину, на которой фотон полностью теряет свое первоначальное направление.

Диффузионная теория оказывается хорошим приближением в случае малых значений фактора анизотропии однократного рассеяния ($g \leq 0,1$) и больших альбедо ($\Lambda \rightarrow 1$). Для большинства биотканей $g \approx 0,6-0,9$, а для крови даже может достигать 0,995 [12, 13, 31], что существенно ограничивает применимость диффузионного приближения. Считается, что при оптических толщинах объекта, $\tau = \int_0^s \mu_t ds = 10-20$, диффузионное приближение можно использовать при $g < 0,9$. Диффузионное приближение оказывается также неприменимым вблизи поверхности объекта на входе светового пучка, где преобладает однократное или малократное рассеяние. В этом случае условие применимости диффузионного приближения к описанию распределения интенсивности рассеянного излучения в случайно-неоднородной (рассеивающей) среде может быть сформулировано как $r_{sd} \gg l^* = (\mu'_s)^{-1}$, где r_{sd} — расстояние между источником и приемником. Параметр l^* , близкий по своему значению транспортной длине l_{tr} , для $\mu_s \gg \mu_a$, играет важную роль в описании переноса излучения в случайно-неоднородных средах, определяя характерное расстояние распространения света в среде, на котором направленный поток излучения преобразуется в диффузный. Другим условием применимости диффузионного приближения является малое поглощение рассеивающей среды, что выражается условием $\mu'_s \gg \mu_a$.

При нарушении данных условий (например, в случае детектирования рассеянного излучения вблизи источников или излучения, прошедшего через тонкий рассеивающий слой с анизотропным рассеянием, $g \leq 1$) диффузионное приближение приводит к существенным расхождениям с экспериментальными данными или с результатами

моделирования по методу Монте-Карло (имеет место «кризис диффузионного приближения» [120, 454]).

Несмотря на эти ограничения, диффузионное приближение применимо к решению ряда задач при описании распространения света в биологических тканях, в том числе в диффузионной оптической томографии (ДОТ), что позволяет использовать аппарат решения краевых задач диффузии. Решение уравнения диффузии (2.6) для сред с ограниченной геометрией требует задания граничных условий и функции источника, исходя из следующих ограничений [120].

1. При зондировании среды направленным пучком излучения источник диффузной составляющей локализован не на поверхности среды, а на некоторой глубине $z_0 \sim l^* = (\mu'_s)^{-1}$, поскольку преобразование направленной составляющей в диффузную осуществляется на глубине порядка l^* . Таким образом, в простейшем случае изотропного точечного источника $I_0\delta(\mathbf{r})$, погруженного в безграничную рассеивающую среду, функция источника должна быть введена не в форме $I_0\delta(z)\varphi(x, y)$ (ось z перпендикулярна границе среды), а в форме $I_0\delta(z - z_0)\varphi(x, y)$. Возможно также использование не локализованного, а экспоненциально распределенного по глубине источника, что соответствует преобразованию в поверхностном слое направленной составляющей в диффузную.

2. Граничное условие для классической диффузионной задачи записывается в форме $U(\mathbf{r})|_{\mathbf{r}=\partial G} = 0$ (где ∂G — поверхность, ограничивающая область пространства, где происходит диффузия). Применительно к описанию диффузии излучения это условие должно быть модифицировано для учета влияния отражения света на границе. Например, при диффузии света в полубесконечной среде, что представляет интерес с точки зрения диагностических приложений, когда осуществляется детектирование обратно рассеянного излучения, такая модификация приводит к граничному условию в форме $U(\mathbf{r})|_{z=-z_p} = 0$ (где z_p — длина экстраполяции). То есть интенсивность диффузной составляющей обращается в 0 не на геометрической границе, а на некоторой плоскости, параллельной границе и находящейся от нее на расстоянии z_p . Отношение z_p/l^* зависит от отражательной способности границы.

Решение задачи о диффузии излучения в ограниченных областях пространства может быть получено с помощью стандартной техники решения краевых задач; например, для областей в форме полупространства или слоя используется метод источников [504].

Важным является вопрос о влиянии поглощения на транспортные свойства рассеивающей среды. В диффузионной теории коэффициент диффузии излучения вводится в форме (2.8). Вместе с тем было показано (см. [31, 120]), что лучшее соответствие между экспериментом и диффузионной теорией достигается в случае, если D принимается равным $D = c/3(1 - g)\mu_s$, т. е. не зависящим от коэффициента поглощения среды. Это позволяет проанализировать статистику оптических путей в случае поглощающей среды путем вычисления плотности вероятности $\rho(s)$ для непоглощающей среды с заданными значениями μ_s и g , а затем учесть поглощение путем введения бугеровского множителя $\exp(-\mu_a s)$ в выражении для $\rho(s)$.

Сделаем краткий обзор других решений транспортного уравнения. Если на оптически тонкую ($\tau < 1$) поглощающую (альбедо $\Lambda \ll 0,5$) биоткань падает плоская волна, интенсивность рассеянного поля оказывается много меньше интенсивности проходящей (когерентной) волны, которая описывается простым соотношением (1.1) или аналогичным [450]:

$$I_T(s) = I_T(0) \exp(-\tau). \quad (2.11)$$

Это так называемое решение первого порядка. Если пучок узкий (например, лазерный), то такое приближение применимо и для более плотных (более рассеи-

вающих) тканей ($\tau > 1$, $\Lambda < 0,9$). Однако для некоторых тканей в области длин волн терапевтического/диагностического окна $\Lambda \approx 1$, что делает неприменимым приближение первого порядка даже при $\tau \ll 1$.

Более строгое решение уравнения переноса можно получить методом дискретных ординат (многопоточковая теория), когда уравнение переноса (2.1) преобразуется в матричное дифференциальное уравнение для освещенности по многим дискретным направлениям (углам) [245]. При увеличении числа углов решение приближается к точному. Возможно также раскладывать освещенность в ряд по сферическим гармоникам с разделением транспортного уравнения на компоненты для сферических гармоник. При достаточном числе сферических гармоник такой путь также ведет к точному решению. Например, при исследовании биотканей в [457] использовалось до 150 сферических гармоник; полученные уравнения решались методом конечных разностей [458]. Однако при желании получить достаточно точное решение эти методы требуют объемных вычислений, они также плохо «работают» для δ -образных фазовых функций рассеяния [450].

В оптике биотканей широкое применение нашли более простые методы решения уравнения переноса, такие как двухпоточковая модель Кубелки–Мунка, трех-, четырех- и семипоточковые модели. Это эквивалентно представлению многих потоков по методу дискретных ординат только двумя (одномерная задача) или шестью (трехмерная задача) диффузными потоками. Такое представление естественно и весьма плодотворно при лазерном зондировании биоткани. Так, например, четырехпоточковая модель [245, 426] представляет собой два диффузных потока, распространяющихся навстречу друг другу (модель Кубелки–Мунка), и два коллимированных лазерных пучка — один падающий, а другой отраженный от задней границы образца. Очевидно, что в модели направление диффузных потоков выбирается совпадающим с соответствующими направлениями лазерных пучков. Семипоточковая модель — это простейшее трехмерное представление рассеянного излучения и падающего лазерного пучка в полубесконечной среде [89]. Конечно, простота и возможность очень быстрых расчетов дозы облучения или быстрого определения оптических параметров биоткани (решение обратной задачи рассеяния) даются ценой снижения точности.

Требуемая на практике надежная послойная дозиметрия лазерного излучения внутри биоткани, проблемы оптической диффузионной томографии и спектроскопии биообъектов определяют необходимость развития методов решения задач теории переноса излучения для сред с произвольной конфигурацией и любыми граничными условиями. Для решения таких задач перспективен метод Монте-Карло, широко применяемый для численного решения уравнения ТПИ [459, 460] в различных областях знаний (астрофизике, оптике атмосферы и океана и др.). В последние годы успешно развиваются приложения метода Монте-Карло в оптике биотканей [1–3, 12, 13, 27, 30–32, 74, 426–429, 461–476]. Метод Монте-Карло базируется на численном моделировании транспорта фотонов в рассеивающей среде. Случайное блуждание фотонов внутри образца биоткани прослеживается от точки влета в образец до его поглощения или выхода из образца.

Распределение интенсивности внутри биоткани является функцией коэффициента поглощения μ_a , коэффициента рассеяния μ_s , параметра анизотропии g , а также размеров лазерного пучка. Это приводит к значительным трудностям в количественной дозиметрии излучения при лазерной терапии. Исследования распределения света внутри биоткани со сложной многослойной структурой с целью упрощения анализа могут быть проведены в рамках одномерной теории, которая справедлива, когда размеры лазерного пучка значительно больше глубины проникновения света в ткань, что реализуется для многих видов фототерапии. Типичными примерами многослойной биоткани являются кожа, стенки мочевого пузыря, матки, кровеносных сосудов.

Применение метода Монте-Карло базируется на использовании макроскопических оптических свойств среды, которые предполагаются однородными в пределах небольших объемов ткани. Моделирование не учитывает детали распространения энергии излучения внутри отдельной ячейки. Известные алгоритмы позволяют учесть несколько слоев биоткани с различными оптическими свойствами, конечный размер падающего пучка, отражение света от границ раздела слоев.

При высокой точности и универсальности главным недостатком метода Монте-Карло являются большие затраты машинного времени. Хотя развитие аппаратных и программных средств вычислительной техники уменьшает роль фактора времени, разработка новых средств лазерной диагностики и терапии требует создания эффективных, сравнительно простых и надежных алгоритмов метода Монте-Карло. Например, новый метод конденсированного Монте-Карло позволяет получить решение для любого значения альбедо ($\Lambda = \mu_s/\mu_t$) на основе моделирования для одного конкретного значения альбедо, что существенно ускоряет расчеты [427]. Разработаны также весьма экономные гибридные модели, сочетающие точность метода Монте-Карло и быстрдействие диффузионных теорий или аппроксимирующих аналитических выражений [465, 466, 468].

Рассмотрим в качестве примера более подробно оптику кожи человека [70, 71, 90, 426, 464, 471, 474–483]. Для расчета распределений света $\Phi(\mathbf{r})$ и $U(\mathbf{r})$ (см. (2.3) и (2.4)) методом Монте-Карло рассмотрим кожу как плоскую многослойную рассеивающую и поглощающую свет среду (рис. 2.1), на поверхность которой падает лазерный пучок. При этом предполагается, что пространственно-угловое распределение падающего излучения может быть представлено в виде

$$S(\mathbf{r}, \mathbf{s}) = A(\mathbf{s})E(\mathbf{r}), \quad (2.12)$$

где $A(\mathbf{s})$ описывает угловое распределение источника единичной мощности. Каждый i -й слой характеризуется следующим набором параметров: μ_{ai} , μ_{si} , $p_i(\vartheta)$, толщиной d_i и показателем преломления среды-наполнителя n_i .

В силу симметрии задачи по отношению к сдвигу плоскости, параллельной поверхности раздела между слоями, а также благодаря радиальной симметрии падающего пучка света, функции $U(\rho, z)$, $\Phi_T(\rho)$, $\Phi_R(\rho)$, определяющие соответственно распределение полной освещенности в среде и поверхностное распределение прошедшего и отраженного излучения, могут быть вычислены путем интегрирования [426, 464]:

$$U(\rho, z) = \int_0^\infty G(\rho', z)K(\rho, \rho', \varphi) \cdot \rho' d\rho', \quad (2.13)$$

$$\Phi_{T,R}(\rho) = \int_0^\infty G_{T,R}(\rho')K(\rho, \rho', \varphi)\rho' d\rho', \quad (2.14)$$

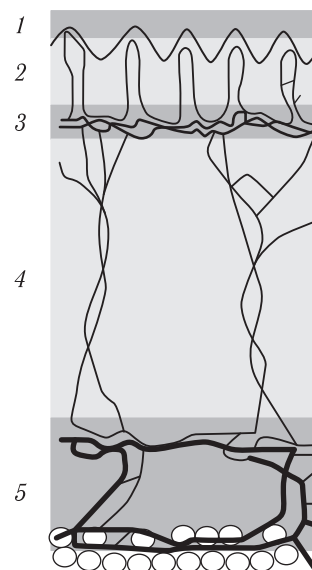


Рис. 2.1. Модель кожи: 1 — эпидермис; 2 — папиллярная дерма; 3 — верхнее сплетение микрососудов; 4 — ретикулярная дерма; 5 — глубокое сосудистое сплетение [426]

где

$$K(\rho, \rho', \varphi) = \int_0^{2\pi} E[(\rho'^2 + \rho^2 - 2\rho\rho' \cos \varphi)^{1/2}] d\varphi,$$

ρ, z, φ — цилиндрические координаты; φ — азимутальный угол в плоскости (x, y) ; G, G_T и G_R — функции Грина отклика среды на «точечное» внешнее воздействие, которые определяют соответственно распределение полной освещенности в среде и поверхностное распределение прошедшего и отраженного света.

Непосредственное статистическое моделирование движения фотонов осуществляется следующим образом. Вся область с отличной от нуля освещенностью разбивается на ячейки (i, j) , каждый фотон характеризуется тремя координатами и двумя углами, определяющими направление его движения. При инициализации фотон помещается в начало координат, ему придается начальный вес W_0 , а его случайное направление определяется в соответствии с функцией $A(\mathbf{s})$ по формуле

$$a = \int_{x_{\min}}^{x_{\text{rnd}}} p(x) dx, \quad (2.15)$$

где a — случайное число, равномерно распределенное в интервале $[0, 1]$; $p(x)$ — функция плотности вероятности случайной величины x ; x_{\min} — минимальное значение x , x_{rnd} — выбираемое значение x . Значения всех других случайных величин, необходимых для моделирования, также генерируются с помощью формулы (2.15) [459, 460].

После определения направления движения фотона вычисляется длина пробега фотона на данном шаге моделирования, которая учитывает процесс отражения или преломления на границе слоев (по формулам Френеля). Далее часть веса фотона, пропорциональная $(1 - \Lambda) = \mu_a/\mu_t$, записывается в ячейку Q_{ij} , характеризующую распределение поглощенной энергии в среде. Значения индексов i, j вычисляются по текущим координатам фотона. Затем генерируется новое значение угла рассеяния фотона, и процедура повторяется. Когда вес фотона уменьшается до заданного малого значения, выполняется процедура «рулетки». Если на очередном шаге моделирования фотон попадает за пределы среды, то часть его веса, пропорциональная коэффициенту пропускания соответствующей границы, записывается в ячейку массива Q_{Ti} (пропускание) или Q_{Ri} (отражение). Значение индекса i определяется текущей координатой ρ .

После того как описанная процедура выполнена для достаточно большого числа фотонов N_p (обычно 10^5 – 10^7 в зависимости от решаемой задачи и сложности геометрии объекта), функции Грина отклика среды вычисляются по формулам:

$$G_{ij} = \frac{Q_{ij}}{N_p V_{ij} \mu_{a_{ij}} W_0}, \quad (2.16)$$

$$G_{li} = \frac{Q_{li}}{N_p S_i W_0}, \quad l = R, T, \quad (2.17)$$

где V_{ij} — объем ячейки (i, j) ; $\mu_{a_{ij}}$ — коэффициент поглощения слоя, которому принадлежит ячейка (i, j) ; S_i — площадь кольца, соответствующего расстоянию ρ .

Окончательно по заданному профилю падающего пучка мощности P и радиуса r_0 , который может быть гауссовым

$$E_g(\rho) = \frac{2P}{\pi r_0^2} \exp\left[-2\left(\frac{\rho}{r_0}\right)^2\right], \quad (2.18)$$

или прямоугольным

$$E_{\text{т}}(\rho) = \begin{cases} 0, & \rho > r_0, \\ P/(\pi r_0^2), & \rho \leq r_0 \end{cases} \quad (2.19)$$

с помощью формул (2.13), (2.14) вычисляются распределение освещенности внутри среды и распределение прошедшего и отраженного излучения.

В качестве примера использования алгоритма на рис. 2.2, 2.3 представлены результаты численного моделирования распределения интенсивности для пучков гауссова профиля в коже (см. рис. 2.1 и табл. 2.1) [426, 464, 481–483]. Рис. 2.2 показывает распределение полной освещенности для трех длин волн (337, 577 и 633 нм), рис. 2.3 иллюстрирует зависимость освещенности в точке максимума U_m и размеров области максимальной освещенности D_m (определяемой по уровню $1/e^2$) от радиуса падающего пучка для длины волны 633 нм. Видно, что максимум освещенности формируется на некоторой глубине внутри ткани, а полная освещенность в точке максимума U_m может значительно превышать освещенность U_0 в центре падающего на поверхность среды пучка. Это обстоятельство неоднократно отмечалось исследователями (см., например, [1, 3]), причем отношение U_m/U_0 сильно зависит от оптических параметров среды, радиуса падающего пучка и свойств границы [210, 211].

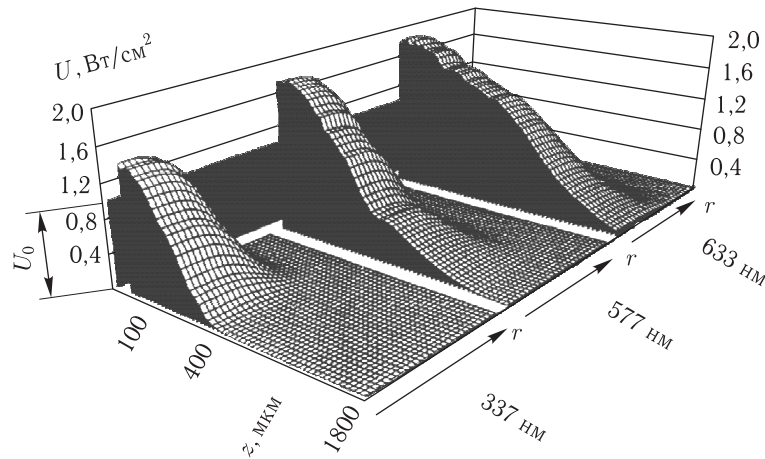


Рис. 2.2. Теоретические распределения интенсивности U в коже при ее облучении лазерными пучками разных длин волн (интенсивности в центре ($U_0 = 1$ Вт/см²) и радиусы гауссовых пучков ($r_0 = 1$ мм) на поверхности кожи одинаковы для всех лазеров), полученные методом Монте-Карло

Ослабление широкого пучка с падающей интенсивностью I_0 в условиях многократного рассеяния может быть приближенно описано с помощью простого соотношения, близкого по форме к (1.1):

$$I(z) = I_0 q \cdot \exp(-\mu_d z), \quad (2.20)$$

где q учитывает не только отражение света на границе раздела воздух–поверхность биоткани, тип используемого детектора (изотропного или анизотропного), но также и дополнительное увеличение освещенности верхних слоев биоткани за счет обратного рассеяния. Это приближенное соотношение справедливо лишь внутри биоткани, вдали от ее поверхности, на глубинах $z > l_d = \mu_d^{-1}$. Типичные значения параметра q

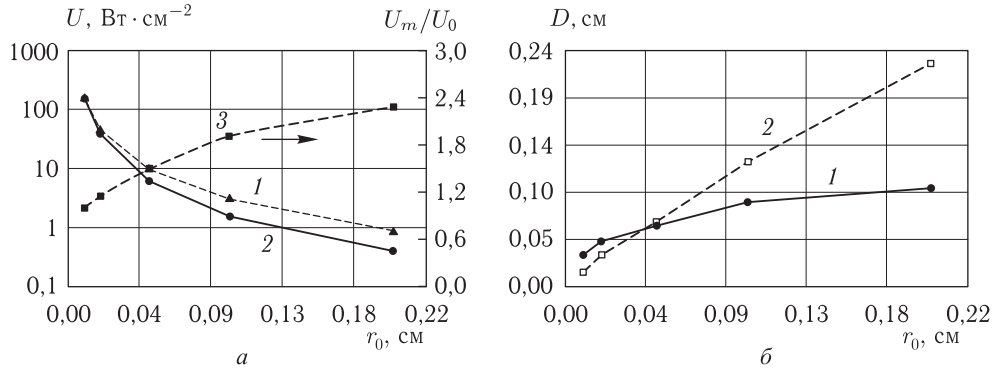


Рис. 2.3. Зависимости параметров области максимальной освещенности от радиуса падающего пучка. Пучок с гауссовым профилем, длина волны 633 нм, мощность 25 мВт: a — полная освещенность падающего пучка, 1 — в центре U_0 , 2 — в максимуме U_m , 3 — U_m/U_0 ; b — размер области максимальной освещенности (по уровню $1/e^2$), 1 — вдоль оси пучка, 2 — перпендикулярно оси пучка [426]

Таблица 2.1. Оптические параметры кожи: числитель $\lambda = 633$ нм, знаменатель $\lambda = 337$ нм [426]

| № | Слой | μ_a , см ⁻¹ | μ_s , см ⁻¹ | g | n | d , мкм |
|----|--|----------------------------|----------------------------|---------------------|-----|-----------|
| 1. | Эпидермис | $\frac{4,3}{32}$ | $\frac{107}{165}$ | $\frac{0,79}{0,72}$ | 1,5 | 100 |
| 2. | Дерма | $\frac{2,7}{23}$ | $\frac{187}{227}$ | $\frac{0,82}{0,72}$ | 1,4 | 200 |
| 3. | Дерма с поверхностным сплетением сосудов | $\frac{3,3}{40}$ | $\frac{192}{246}$ | $\frac{0,82}{0,72}$ | 1,4 | 200 |
| 4. | Дерма | $\frac{2,7}{23}$ | $\frac{187}{227}$ | $\frac{0,82}{0,72}$ | 1,4 | 900 |
| 5. | Дерма с глубинным сплетением сосудов | $\frac{3,4}{46}$ | $\frac{194}{253}$ | $\frac{0,82}{0,72}$ | 1,4 | 600 |

для биотканей лежат в диапазоне 1–5 и в значительной степени зависят от диаметра лазерного пучка (1–20 мм) [210, 211]. Глубина проникновения света в биоткань может быть оценена из соотношения

$$l_e = l_d(\ln q + 1). \quad (2.21)$$

Увеличение радиуса падающего пучка приводит также к росту размеров освещаемой области внутри ткани, причем для излучения с длиной волны 633 нм скорость увеличения поперечных размеров области выше, чем вдоль лазерного пучка (рис. 2.3, б).

С практической точки зрения подобные расчеты необходимы для корректного определения дозы облучения при фотохимической, фотодинамической или фототермической терапии онкологических и ряда других заболеваний, а также при коагуляции лазерным излучением поверхностных сосудов [2, 3, 12–14, 17, 18, 25–28, 30–32, 41–46, 55, 62, 65, 66, 75, 90, 161, 205, 208, 479–487].

2.2. Распространение коротких импульсов

Используя нестационарную теорию переноса излучения, можно проанализировать временной отклик рассеивающих тканей. Такой анализ оказывается важным для обоснования неинвазивных оптических медицинских технологий, которые используют измерение отражения или пропускания биоткани с разрешением во времени, высокочастотные амплитудно-фазовые измерения, а также когерентные методы, основанные на баллистических (прямошедших) или отраженных фотонах [1, 3, 12, 13, 18, 27, 30–32, 64, 75, 77, 78, 162, 488–507].

В общем виде нестационарное уравнение ТПИ может быть записано в виде [488]

$$\begin{aligned} \frac{\partial}{\partial S} I(\mathbf{r}, \mathbf{s}, t) + t_2 \frac{\partial}{\partial t} I(\mathbf{r}, \mathbf{s}, t) = \\ = -\mu_t I(\mathbf{r}, \mathbf{s}, t) + \frac{\mu_s}{4\pi} \int_{-\infty}^t \left[\int_{4\pi} I(\mathbf{r}, \mathbf{s}', t') f(t, t') dt' \right] p(\mathbf{s}, \mathbf{s}') d\Omega'. \end{aligned} \quad (2.22)$$

В дополнение к стационарному уравнению (2.1) здесь введены следующие обозначения: t — время; $t_2 = 1/(\mu_t c)$ — среднее время между взаимодействиями; c — скорость света в среде; $f(t, t')$ описывает временную деформацию δ -образного импульса после единичного акта рассеяния.

Представим $f(t, t')$ в виде экспоненциально затухающей функции:

$$f(t, t') = \frac{1}{t_1} \exp\left(-\frac{t-t'}{t_1}\right), \quad (2.23)$$

где t_1 может быть функцией \mathbf{r} ; t_1 — это первый момент функции распределения $f(t, t')$ и означает длительность индивидуального акта рассеяния, при $t_1 \rightarrow 0$ $f(t, t') \rightarrow \delta(t-t')$.

Лучевая интенсивность $I(\mathbf{r}, \mathbf{s}, t)$ в (2.22) содержит два компонента: ослабленное падающее излучение и рассеянное. Уравнение (2.22) удовлетворяет граничным условиям (2.2) при $(\mathbf{r}, \mathbf{s}) \rightarrow (\mathbf{r}, \mathbf{s}, t)$.

При зондировании плоскопараллельного слоя рассеивающей среды ультракоротким лазерным импульсом прошедший импульс состоит из баллистического (когерентного) компонента, группы фотонов с зигзагообразными траекториями и значительного по интенсивности диффузного компонента (рис. 2.4). Интенсивность баллистического компонента (состоящего из фотонов, движущихся вдоль лазерного пучка по прямой линии) определяется как нерассеянными фотонами, так и фотонами рассеянными вперед. Этот компонент ослабевает экспоненциально с ростом толщины образца (см. (1.1)) [508], такое ослабление накладывает серьезные ограничения на практическое использование баллистических фотонов в медицинской диагностике.

Группа фотонов с зигзагообразными траекториями состоит из фотонов, испытавших всего несколько столкновений, они движутся по траекториям, лишь слегка отклоняющимся от направления падающего пучка, и формируют первопришедшую часть диффузного компонента. Эти фотоны несут информацию как об оптических свойствах случайной среды, так и о параметрах некоторого чужеродного объекта, расположенного на их пути.

Диффузный компонент существенно уширен, имеет значительную интенсивность, так как состоит из основной массы падающих фотонов, которые испытали многократные акты рассеяния, следовательно имеют различные направления движения и различные длины путей. Диффузный компонент также несет информацию об оптических свойствах рассеивающей среды, а его деформация определяет наличие локальных неоднородностей в среде. При значительной светосиле разрешающая спо-

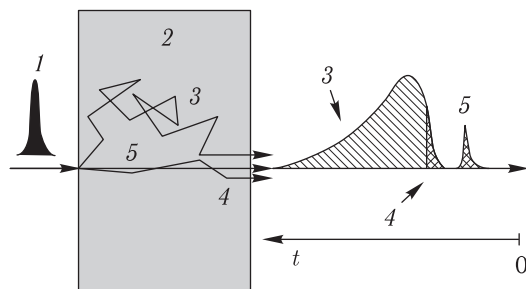


Рис. 2.4. Схематическое представление распространения сверхкороткого лазерного импульса в случайной среде [489]: 1 — падающий импульс, 2 — случайная среда, 3 — диффузный компонент, 4 — группа фотонов с зигзагообразными траекториями, 5 — баллистические фотоны

способность такого метода существенно ниже, чем у метода прямо прошедших фотонов. Возможны две схемы зондирования объекта — в режиме на просвет и в режиме обратного рассеяния (рис. 2.5).

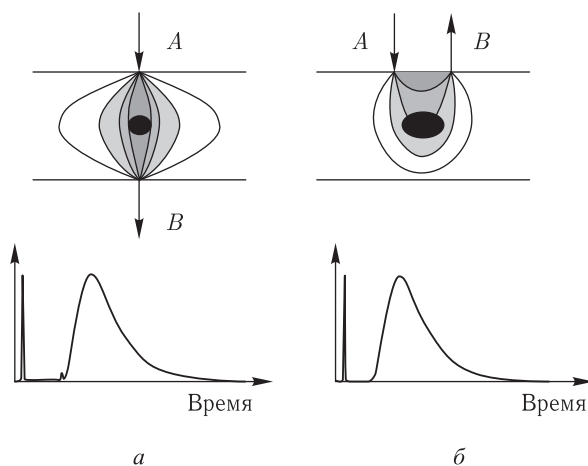


Рис. 2.5. Типичные схемы для исследования биотканей с разрешением во времени [489]: а — режим просвечивания; б — режим обратного рассеяния. А — зондирующий пучок, В — регистрируемое излучение. Затемненный участок в центре рассеивающего слоя — локальная неоднородность (опухоль). Показаны распределения фотонов в среде

Прямое зондирование позволяет использовать оба метода, основанных на регистрации прямопрошедших и диффузно-рассеянных фотонов, и при использовании лазеров ближнего ИК-диапазона может быть применено для исследования сравнительно объемных тканей, таких как, например, молочная железа или мозг головы. Метод обратного рассеяния имеет более широкий спектр применений, так как не требует просвечивания объекта. Он широко используется при измерениях *in vivo* оптических параметров биотканей и модельных рассеивающих сред — фантомов биотканей.

В диффузионном приближении (справедливом при $\mu_a \ll \mu'_s$) при условии, что ткань однородна и полубесконечна, размеры источника и приемника излучения на поверхности ткани малы по сравнению с расстоянием r_{sd} между ними, а импульс мо-

жет быть рассмотрен как одиночный, распространение света описывается временным диффузионным уравнением [491, 492]:

$$\left(\nabla^2 - c\mu_a D^{-1} - D^{-1} \frac{\partial}{\partial t}\right) \cdot U(\mathbf{r}, t) = -Q(\mathbf{r}, t), \quad (2.24)$$

которое является обобщением стационарного уравнения (2.6) с функцией источника $S_d(\mathbf{r}, t)$ и $Q(\mathbf{r}, t) = D^{-1} \cdot S_d(\mathbf{r}, t)$. Отметим, что в отсутствии потерь фотонов ($\mu_a = 0$) диффузионное уравнение эквивалентно уравнению для теплопроводности [504]. Решение уравнения (2.24) дает следующее соотношение для числа обратно рассеянных фотонов на поверхности в единицу времени и с единицы площади $R(r_{sd}, t)$ [491, 492]:

$$R(r_{sd}, t) = \frac{z_0}{(4\pi D)^{3/2}} t^{-5/2} \exp\left(-\frac{r_{sd}^2 + z_0^2}{2Dt}\right) \exp(-\mu_a ct), \quad (2.25)$$

где $z_0 = (\mu'_s)^{-1}$.

На практике μ_a и μ'_s оцениваются путем сравнения (2.25) с формой импульса, измеренного методом счета фотонов с разрешением во времени. Результаты экспериментальных исследований оптических параметров многих биотканей и модельных сред импульсным методом можно найти в [1, 3, 12, 13, 18, 27, 30–32, 43–45, 64, 206, 207, 491–495, 505–512]. Важным достоинством импульсного метода по сравнению с описанным выше методом непрерывного излучения является то, что он более просто обеспечивает измерения *in vivo*, так как μ_a и μ'_s разделяются в процессе одного измерения в режиме обратного рассеяния. Отметим, что продолжаются поиски более адекватного описания импульсного отклика биотканей [496, 497, 509–528]. Много работ посвящено проблеме переноса изображения в биоткани и оценкам разрешающей способности оптических томографических схем, использующих в том числе и первошедшие фотоны ультракоротких импульсов [1, 3, 12, 13, 18, 27, 30–32, 120, 121, 162, 489, 490, 498–503, 510, 511].

При использовании ультракоротких лазерных импульсов в обратном рассеянии в пределах узкого телесного угла формируется локальный пик интенсивности, возникающий за счет интерференции света, рассеянного различными частями импульса в обратном направлении [172, 173]. В строго обратном направлении интенсивность рассеянного света обычно примерно в два раза выше интенсивности диффузного компонента. Профиль углового распределения так называемого когерентного пика зависит от средней транспортной длины l_{tr} (2.10) и коэффициента поглощения μ_a . Ширина углового распределения пика прямо связана с l_{tr} [173]:

$$\Delta\vartheta \approx \frac{\lambda}{2\pi l_{tr}}. \quad (2.26)$$

Для многих мягких и твердых биотканей, таких как жировая и мышечная сердечная ткань, нормальный и катарактальный хрусталики, ткань молочной железы, раковая ткань легких, ткань зубов, когерентный пик в обратном рассеянии наблюдается при длительности зондирующего лазерного импульса короче 20 пс [173].

2.3. Диффузионные волны фотонной плотности

Для исследований миграции фотонов в рассеивающей среде эффективным оказался модуляционный метод (frequency-domain), основанный на регистрации динамического отклика интенсивности рассеянного света при модуляции интенсивности падающего лазерного пучка в широком диапазоне частот модуляции (0,1–10 ГГц) [1, 3, 10–13, 30–32, 91–98, 120, 121, 127, 129–133, 135–137, 143, 144, 163, 502, 504, 509–511, 529–563]. Параметрами, измеряемыми в модуляционном методе, являются

глубина модуляции интенсивности рассеянного света m_s и соответствующий сдвиг фаз относительно фазы модуляции падающего света $\Delta\Phi$. По сравнению с описанными выше временными измерениями такой метод более прост и надежен, с точки зрения интерпретации результатов, имеет большую помехозащищенность и использует измерительную аппаратуру, разработанную для целей оптической связи и исследования дисперсии волоконных световодов [558]. Известные измерительные схемы используют принципы гетеродинамирования оптических и преобразованных сигналов [1, 3, 10–13, 30–32, 91–98, 120, 121, 162, 163, 504, 509–511, 530–553]. Значительные успехи в исследовании биотканей и ансамблей биологически важных молекул модуляционным методом послужили основой для создания и промышленного выпуска спектрометров нового типа. Существуют также модели компактных и сравнительно недорогих приборов — модуляционных спектрофотометров — для неинвазивного количественного определения насыщения гемоглобина крови кислородом, для фазовой локализации поглощающих или сильно рассеивающих неоднородностей внутри биоткани [1, 162, 551].

Теоретическое развитие метода привело к установлению нового типа волн — волн фотонной плотности, которые являются сильно затухающими волнами огибающей плотности фотонов. Микроскопически отдельные фотоны совершают случайные блуждания в рассеивающей среде, но коллективно они формируют волну фотонной плотности на частоте модуляции ω , которая распространяется от источника излучения. Диффузионные волны такого типа хорошо известны в других областях физики; например, тепловые волны возбуждаются при поглощении модулированного лазерного излучения различными средами, в том числе и биологическими [5, 58]. Волны фотонной плотности обладают типичными для волн свойствами: они преломляются, дифрагируют, интерферируют, обладают дисперсией и затухают [1, 3, 12, 13, 30–32, 162, 163, 537–540, 543–545].

В сильно рассеивающих средах с малым поглощением, вдали от стенок, источника и приемника излучения распространение света может быть рассмотрено как затухающий диффузионный процесс, который описывается временным диффузионным уравнением для плотности фотонов (2.24). При использовании точечного источника света с гармонической модуляцией интенсивности, расположенного в точке $r = 0$,

$$I(0, t) = I_0[1 + m_I \exp(j\omega t)]. \quad (2.27)$$

Решение диффузионного уравнения (2.24) для однородной бесконечной среды может быть представлено в виде [162]

$$U(\mathbf{r}, t) = U_{dc}(\mathbf{r}) + U_{ac}(\mathbf{r}, \omega) \exp(j\omega t), \quad (2.28)$$

где

$$U_{dc} = (I_0/4\pi D\mathbf{r}) \exp\left(-\frac{\mathbf{r}}{l_d}\right), \quad (2.29)$$

$$U_{ac}(\mathbf{r}, \omega) = \tilde{U}_{ac}(\mathbf{r}, \omega) \exp\{-ik_r(\omega)\mathbf{r}\}, \quad (2.30)$$

$$\tilde{U}_{ac}(\mathbf{r}, \omega) = m_I \frac{I_0}{4\pi D\mathbf{r}} \exp\{-ik_i(\omega)\mathbf{r}\}, \quad (2.31)$$

$\omega = 2\pi\nu$ — частота модуляции; $l_d = \mu_d^{-1}$ — диффузионная глубина проникновения (см. (2.7)); $k_r(\omega)$ и $k_i(\omega)$ — действительная и мнимая части волнового вектора:

$$k = k_r - ik_i = -i\left(\frac{\mu_a c + i\omega}{D}\right)^{0.5}, \quad (2.32)$$

волн фотонной плотности,

$$k_{r,i} = l_d^{-1} \left(\frac{[1 + (\omega\tau_a)^2]^{0.5} \pm 1}{2} \right)^{0.5}, \quad (2.33)$$

$$\tau_a^{-1} = \mu_a c. \quad (2.34)$$

Переменная составляющая полученного решения представляет собой уходящую сферическую волну с центром в точке $\mathbf{r} = 0$, осциллирующую на частоте модуляции ν и имеющую сдвиг фазы по отношению к значению фазы в точке $\mathbf{r} = 0$:

$$\Delta\Phi = k_r(\omega)\mathbf{r}. \quad (2.35)$$

Постоянная и переменная составляющие плотности фотонов ослабляются с расстоянием как $\exp(-\mathbf{r}/l_d)$ и $\exp\{-k_i(\omega)\mathbf{r}\}$ соответственно. Длина волны Λ_Φ диффузионной волны фотонной плотности определяется соотношением

$$\Lambda_\Phi = \frac{2\pi}{k_r} = \frac{2\pi}{\omega} \{2cD\mu_a(1 + [1 + (\omega\tau_a)^2]^{0.5})\}^{0.5}, \quad (2.36)$$

а ее фазовая скорость

$$V_\Phi = \Lambda_\Phi \nu. \quad (2.37)$$

Отсюда следует, что волны фотонной плотности обладают дисперсией и, как уже отмечалось выше, им присущи и другие волновые свойства, такие как затухание, преломление, дифракция и интерференция.

Имея в виду медицинские применения, в частности оптическую маммографию, нетрудно оценить, что при $\omega/2\pi = 500$ МГц $\mu'_s = 15$ см⁻¹, $\mu_a = 0,035$ см⁻¹ и $c = (3 \cdot 10^{10}/1,33)$ см/с, длина волны $\Lambda_\Phi \cong 5,0$ см, а фазовая скорость $V_\Phi \cong 1,77 \cdot 10^9$ см/с.

Для сред с малым поглощением, когда $\omega\tau_a \gg 1$

$$\Lambda_\Phi^2 = 8\pi^2 \frac{D}{\omega}, \quad V_\Phi^2 = 2D\omega, \quad (2.38)$$

$$m_U(\mathbf{r}, \omega) \equiv \frac{\tilde{U}_{ac}(\mathbf{r}, \omega)}{U_{dc}(\mathbf{r})} = m_I \exp\left(\mathbf{r}\sqrt{\frac{D}{c\mu_a}}\right) \exp\left(-\mathbf{r}\sqrt{\frac{\omega}{2D}}\right), \quad (2.39)$$

$$\Delta\Phi(\mathbf{r}, \omega) = r\left(\frac{\omega}{2D}\right)^{0.5}. \quad (2.40)$$

Измерения величины $m_U(\mathbf{r}, \omega)$ и $\Delta\Phi(\mathbf{r}, \omega)$ позволяют определять коэффициент диффузии D , следовательно раздельно находить транспортный коэффициент рассеяния μ'_s (см. (2.8)), коэффициент поглощения μ_a и распределение этих параметров в пространстве.

Очевидно, что обе представленные методики исследований оптических свойств биотканей с разрешением во времени тесно связаны друг с другом. При импульсном зондировании рассеивающей среды фурье-анализ рассеянного импульса, ко-

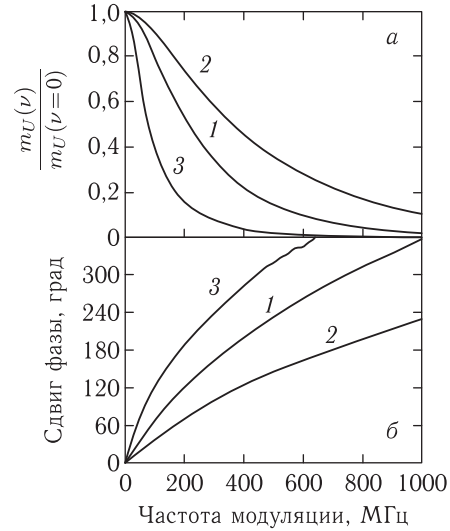


Рис. 2.6. Амплитудный (а) и фазовый (б) отклики модельной среды (целное (1, 3) и разбавленное (40%) (2) молоко), полученные путем фурье-преобразования экспериментальных импульсных откликов среды: 1, 2 — режим просвечивания (кювета толщиной 2 см), 3 — режим обратного рассеяния (большой объем цельного молока) при расстоянии $r_{sd} = 2$ см между облучающим и приемным волоконными световодами [162]

торый может быть сделан аппаратно или программно, позволяет получить одновременно амплитудно-фазовый отклик среды для непрерывного набора гармоник [1, 3, 30–32, 162, 504, 509, 510, 531, 532, 541]. Рис. 2.6 иллюстрирует на примере модельной рассеивающей среды (цельное и разбавленное молоко) типичное поведение амплитудно-фазового отклика биотканей [162]. Такие характеристики используются в спектроскопии биотканей, например при определении *in vivo* степени оксигенации гемоглобина крови [551] или содержания глюкозы в крови или ткани [34, 564–566].

В задачах визуализации макронеоднородностей важное значение имеет пространственное разрешение, которое можно получить при использовании волн фотонной плотности. Теоретические данные для двух поглощающих макронеоднородностей, находящихся в рассеивающей среде, показывают, что для их раздельного обнаружения достаточно обеспечить точность измерения фазы не хуже 1,0% и амплитуды волн не хуже 2,0% (рис. 2.7) [91, 540, 560]. Прогнозируемая пространственная разрешающая способность диффузионной томографии на основе волн фотонной плотности приближается к 1 мм, что сравнимо с разрешающей способностью позитронной эмиссионной и магнитно-резонансной томографии [163]. При этом важными достоинствами оптической томографии являются простота устройств, возможность дополнительного контрастирования объектов молекулами красителей, а также возможность визуализации локальных метаболических процессов.

В качестве примера на рис. 2.8 приведены восстановленные изображения молочной железы с опухолью в виде контурных линий для μ_a и μ'_s , полученные при просвечивании ткани модулированным видимым и ближним ИК-излучением [162]. Хорошо видна область локализации опухоли с повышенными значениями коэффициентов поглощения и рассеяния.

При использовании интерференции волн фотонной плотности, возбуждаемых разнесенными в пространстве источниками, возможно достижение рекордной разрешающей способности, меньшей 1 мм [543, 561]. Однако не только разрешающая способность влияет на качество изображения, необходимо также обеспечить условия

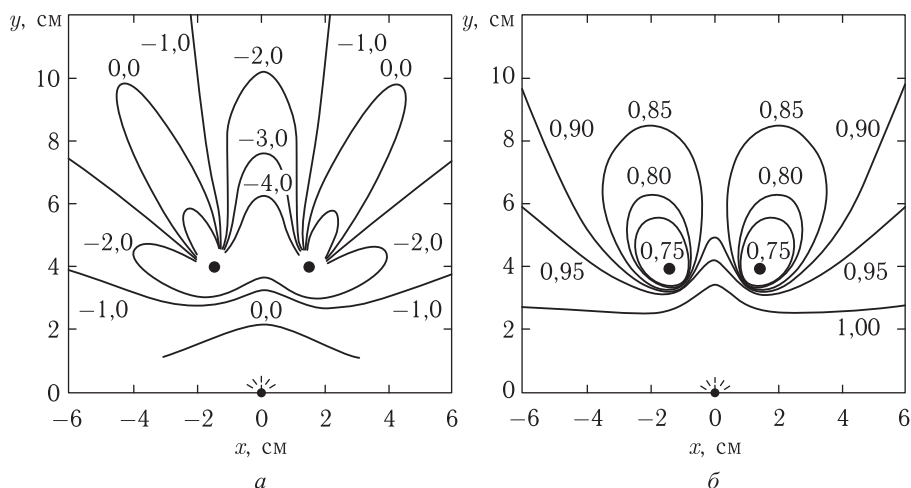


Рис. 2.7. Теоретические пространственные x - y -распределения относительного сдвига фазы (а) и модуляции интенсивности (б) на частоте 200 МГц, полученные при облучении системы из двух абсолютно поглощающих шариков диаметром 0,5 см, находящихся в рассеивающей однородной среде ($\mu'_s = 10 \text{ см}^{-1}$, $\mu_a = 0,02 \text{ см}^{-1}$). Источник расположен в начале координат (0, 0), а поглотители в точках (-2, 4) и (2, 4) [540, 560]

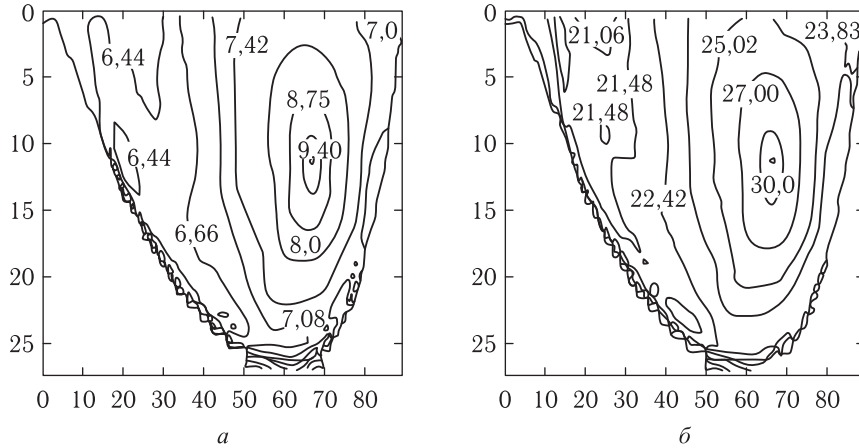


Рис. 2.8. Восстановленные оптические изображения молочной железы с опухолью, полученные при просвечивании ткани модулированным излучением в видимой и ближней ИК-области спектра. Слева дано изображение в виде контурных линий для коэффициента поглощения μ_a (10^{-2} см $^{-1}$), а справа — для транспортного коэффициента рассеяния μ'_s (см $^{-1}$). Опухоль локализована вблизи точки (70, 10), значения коэффициентов относительные [162]

получения достаточно высокого контраста и малую чувствительность к движению и геометрии объекта. Иммерсия объекта (например, молочной железы) в жидкость с примерно такими же, как у исследуемой ткани, рассеивающими и поглощающими свойствами позволяет устранить сильное влияние граничных условий и геометрии образца, облегчает оптическое согласование пробного лазерного пучка, значительно ослабляет влияния небольших перемещений объекта (влияние дыхания, сердечных биений и пр.) в процессе измерений, а также дает возможность калибровать результаты измерений по хорошо известным стандартным параметрам рассеивающей иммерсионной жидкости [537, 554]. В ряде случаев такая достаточно простая методика является альтернативой для более сложных способов визуализации биоткани с использованием измерений на одной частоте модуляции для большого числа расстояний между источником и приемником излучения (см., например, [555]) или измерений для многих частот модуляции (см., например, [537, 554]).

Кроме визуализации макронеоднородностей молочной железы, метод позволяет исследовать другие ткани, включая мозг и легкие, а также целый ряд физиологических процессов, связанных с гемодинамикой, обусловленной потребностью ткани или органа в кислороде. Одним из наиболее важных примеров является изменение распределения кислорода в функционирующем мозге, особенно в процессе его активности [163]. Другим примером является возможный мониторинг свойств, связанных с ростом опухоли: большой объем крови из-за большей плотности и большего объема кровеносных сосудов, прорастающих в опухоль; дезоксигенация крови за счет относительно высокой метаболической активности внутри опухоли; возрастание концентрации внутриклеточных органелл, продуцирующих дополнительную энергию для поддержания быстрого роста клеток; известкование ткани, сильно увеличивающее рассеяние света. Некоторые из этих свойств могут быть полезными при определении типа опухоли — доброкачественная, злокачественная и т.п. [163].

В заключение этого раздела отметим, что довольно значительная плотность биотканей определяет в ряде случаев необходимость учета длительности индивидуального акта рассеяния t_1 (см. (2.23)), которое может оказаться сравнимым со

средним временем между взаимодействиями t_2 (см. (2.22)) [557]. Кроме того, широко используемое диффузионное приближение имеет существенные ограничения при анализе оптических свойств биотканей фазово-частотным методом, поэтому развиваются более универсальные методы моделирования распространения волн фотонной плотности, основанные на использовании оригинальных алгоритмов Монте-Карло [557, 562, 563].

2.4. Принципы оптической диффузионной спектроскопии и томографии

2.4.1. Диффузионная оптическая спектроскопия. Подводя итог рассмотрению оптических свойств биотканей с многократным рассеянием, следует кратко остановиться на перспективных приложениях этих исследований, многие из которых уже упоминались при обсуждении проблем распространения света в сильно рассеивающих средах. Итак, оптическая диагностика и мониторинг патологических или физиологических изменений биоткани, крови и других биологических жидкостей может быть осуществлен спектроскопически (в данном случае спектрофотометрически). При этом возможно зондирование объекта на многих или, в крайнем случае, на двух длинах волн для того, чтобы оказалось возможным зарегистрировать изменения в спектре поглощения исследуемого хромофора (гемоглобина, билирубина и пр.), появление или исчезновение линий поглощения веществ — продуктов метаболизма или химических препаратов, введенных для проведения диагностики или терапии (цитохром оксидаза, глюкоза, гематопорфирин, индоцианин зеленый и пр.) [12, 13, 22, 30–32, 34, 95–97, 103, 124, 130, 131, 133, 135, 136, 144, 157, 185, 551]. Часто, по аналогии с обычной инвазивной биопсией, оптический спектральный метод называют оптической неинвазивной биопсией, или просто оптической биопсией.

Важно, что для биологических объектов для правильной интерпретации результатов по измерениям поглощения необходимо учесть (или исключить) влияние рассеяния света. При измерениях *in vitro* возможно полное восстановление истинного спектра поглощения ($\mu_a(\lambda)$), если используются метод двух интегрирующих сфер и адекватная методика решения обратной задачи. Регистрация *in vivo* спектров отражения в видимой или ближней ИК-области спектра позволяет, например, осуществлять мониторинг кровенаполнения кожи человека [250, 567, 568] или локализовывать внутричерепную гематому [569].

С другой стороны, сами спектры пропускания, а также поляризационные и угловые характеристики рассеяния дисперсных сред (при слабом поглощении) несут обширную информацию об их структуре, размерах и форме рассеивателей [12, 13, 24–41, 171, 180, 565, 570–574], что используется, например, для определения степени агрегации эритроцитов крови [572, 574].

Описанные в предыдущих разделах методики измерений с разрешением во времени дают дополнительную возможность реализовать спектроскопические схемы для измерений *in vivo* как спектров поглощения (или мониторинга поглощения на отдельных длинах волн), так и спектров обратного рассеяния за счет временной или фазовой селекции рассеянных и нерассеянных фотонов. Такие методики успешно используются, например, для неинвазивного количественного определения степени оксигенации гемоглобина крови в ткани [511, 531, 532, 575, 576] (см. табл. 2.2–2.4) или чрескожного определения содержания глюкозы в крови [34, 564–566].

Отметим, что длинноволновая видимая и ближняя ИК-область спектра 750–850 нм оказывается предпочтительной в спектроскопии *in vivo* биотканей как с точки зрения возможности более глубокого зондирования ткани, так и в ряде случаев более простых алгоритмов решения обратной задачи.

Т а б л и ц а 2.2. Основные измеряемые параметры и характеристики спектрофотометров и визуализаторов тканей мозга ближнего ИК диапазона [600]

| Измеряемые параметры и характеристики прибора | Непрерывные фотометры с фиксированным расстоянием между источником и приемником | | | Одно- или двух-канальные оксиметры | | | | Визуализаторы | | |
|---|---|--|----------------------------|---------------------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| | Дискретные длины волн | Широкополосные, спектроскопия второй производной | ДВС | ПРС НР | ФМС МД | ФМС МЧ | ВРС | НР | ФМС | ВРС |
| HbO ₂ , Hb, tHb | да* | да, абсолютные значения | нет | да* | да, абсолютные значения | да, абсолютные значения | да, абсолютные значения | да* | да, абсолютные значения | да, абсолютные значения |
| Скорость кровотока | нет | нет | да, относительная | нет | нет | нет | нет | нет | нет | нет |
| μ_a , μ_s и СДПФ | нет | да, СДПФ | нет | нет | да | да | да | нет | да | да |
| Насыщение гемоглобина кислородом в ткани (SO ₂ , %) | нет | да | нет | да | да | да | да | нет | да | да |
| Глубина зондирования для $r_{sd} = 4$ см | малая | малая | малая | малая, но для SO ₂ большая | большая | малая | малая | малая | большая | малая |
| Скорость опроса, Гц | ≤ 100 | 1 | ≥ 5 | ≤ 6 | ≤ 100 | ≤ 1 | ≤ 6 | ≤ 100 | ≤ 50 | 1 |
| Пространственное разрешение, см | О | О | возможно | О | О | О | О | ≤ 1 | ≤ 1 | ≤ 1 |
| Стабильность оптического контакта | критично | критично | критично | некритично | некритично | критично | некритично | критично | критично | некритично |
| Дискриминация между тканью мозга и окружающими тканями (скальп, череп, ЦСЖ) | О | О | возможно | О | возможно | О | возможно | О | возможно | возможно |
| Исследование глубоких структур мозга | возможно для новорожденных | возможно для новорожденных | возможно для новорожденных | возможно для новорожденных | возможно для новорожденных | возможно для новорожденных | возможно для новорожденных | возможно для новорожденных | возможно для новорожденных | возможно для новорожденных |

ЦСЖ — цереброспинальная жидкость, НР — непрерывный режим, ДВС — диффузионно-волновая спектроскопия, HbO₂ — оксигемоглобин, Hb — дезоксигемоглобин, tHb = (HbO₂ + Hb) — полный гемоглобин, МД — многодистантная геометрия, МЧ — многочастотные измерения, О — отсутствует, ФМС — фазово-модуляционная спектроскопия, ПРС — спектроскопия с пространственным разрешением, ВРС — спектроскопия с разрешением во времени, СДПФ — средняя длина пути фотона, * — дифференциальный фактор длины пути (ДФДП) фотона включен в расчет СДПФ в ткани [= ДФДП × (расстояние между источником и приемником)].

Таблица 2.3. Коммерческие клинические оптические измерители ближнего ИК диапазона (из работы [600] с добавлениями)

| Прибор | Метод | Число каналов | Компания | Интернет адрес | |
|-----------------------|----------------------------|---|------------------------|--|--------------------|
| Фотометры | BOM-L1 TR | 1 | Omegawave, Япония | www.omegawave.co.jp | |
| | HEO-200 ^a | 1 | OMRON, Япония | — | |
| | Micro-RunMap | 1 | NIM, Inc., США | — | |
| | OXYMON MkIII | 1-96 | Artinis, Нидерланды | www.artinis.com | |
| | Luminostix | 2 | Luminostix, Нидерланды | www.luminostix.com | |
| Оксиметры | FORE-SIGHT ^b | 1 | Casmed, США | www.casmed.com | |
| | INVOS 5100C ^b | 2 или 4 | Somanetics, США | www.somanetics.com | |
| | InSpectra 325 ^b | 1 | Hutchinson, США | www.htbiomeasurement.com | |
| | NIMO | 1 | NIROX, Италия | www.nirox.it | |
| | NIRO-100 | 2 | Hamamatsu, Япония | www.hamamatsu.com | |
| | NIRO-200 | 2 | | | |
| | ODISsey | 2 | Vioptix, Inc., США | www.vioptix.com | |
| | OM-220 | 2 | Shimadzu, Япония | www.med.shimadzu.co.jp | |
| | Luminostix | Непрерывное излучение, одностантная ПРС | 2 | Luminostix, Нидерланды | www.luminostix.com |
| | OxiplexTS | Многостантная ФМС | 1 или 2 | ISS®, США | www.iss.com |
| | TRS-20 | Многостантная ВРС | 2 | Hamamatsu, Япония | www.hamamatsu.com |
| | O2C | Широкополосная спектроскопия | 2 | LEA, Германия | www.lea.de |
| | Визуализаторы | Dynot | до 32 | NIRx, США | www.nirx.net |
| ETG-4000 ^b | | 44 | Hitachi, Япония | www.hitachimed.com | |
| ETG-7000 ^b | | 72 | | | |
| LED IMAGER | | 16 | NIM, Inc., США | — | |
| nScan D1200 | | от 16 до 32 | Arquatis, Швейцария | www.arquatis.com | |
| nScan W1200 | | 16, беспроводный | | | |
| NIRO-200 | | 8 | | | |
| NIRS 4/58 | | 4 или 58 | TechEn, Inc, США | www.nirsoptix.com | |
| OMM-2001 | | 42 | Shimadzu, Япония | www.med.shimadzu.co.jp | |
| OMM-3000 | | 64 | | | |
| Imagent | | ФМС | до 128 | ISS®, США | www.iss.com |
| Siemens AG | | ФМС | 2D-сканирование, 2 мин | Siemens AG Medical Engineering, Германия | [596, 603] |

^a Более не выпускается промышленностью.

^b Разрешен Управлением по контролю за продуктами и медикаментами США — USA Food Drug Administration (FDA).

ФМС — фазово-модуляционная спектроскопия, ПРС — спектроскопия с пространственным разрешением, ВРС — спектроскопия с разрешением во времени.

ISS® — Fluorescence & Analytical Instrumentation

Таблица 2.4. Разрабатываемые прототипы медицинских оптических устройств ближнего ИК-диапазона

| Прототип | Метод | Число каналов | Организация-разработчик, название | Ссылка |
|---------------|----------------------------|---|---|------------|
| Оксиметры | Широкополосная ФМС | 1 | Калифорнийский университет, Ирвин, США | 614 |
| | ФМС | 1 | Университет Киля, Великобритания | 615 |
| | Широкополосная ПРС | 1 | Университет Кобленца, Германия | 616 |
| | Непрерывное излучение | 8 | Университет Хельсинки, Финляндия | 617 |
| | Многодистантная ПРС | 1 | NIM, Inc., США | 618 |
| | Непрерывное излучение | 1 | INFМ, Италия, IRIS-3 | 619 |
| | Многодистантная ПРС ФМС | 1 | Университет Цинхуа, Китай, TSNIR-3 Университетский госпиталь Цюриха, Швейцария | 620 621 |
| Визуализаторы | Непрерывное излучение | 64 | Техасский университет, Арлингтон, США | 622 |
| | Непрерывное излучение | 22 | Университетская клиника Шарите, Германия | 623 |
| | Непрерывное излучение | 20 | Университетский колледж Лондона, Великобритания | 624 |
| | Непрерывное излучение | 16 | Университет Богазиши, Турция, NIROXCOPE 201 | 625 |
| | Непрерывное излучение | 16 | Юговосточный университет, Китай | 626 |
| | Непрерывное излучение | Вар. | Колумбийский университет, США | 627 |
| | Непрерывное излучение | 16 | Дрексель университет, США | 628 |
| | Непрерывное излучение | 300 | Вашингтонский университет, США | 629 |
| | Непрерывное излучение | 16 | Университетский госпиталь Цюриха, Швейцария | 630 |
| | ВРС | 16 | Physikalisch-Technische Bundesanstalt, Германия | 631 |
| | ВРС | 32 | Гарвардский университет, США | 632 |
| | ВРС | 16 | Намамatsu, Япония | 633 |
| | ВРС | 16 | Политехнический институт Милана, Италия | 634 |
| | ВРС | 32 | Университетский колледж Лондона, Великобритания | 590 |
| | ВРС | 8 | Университет Страсбурга, Франция | 635 |
| | ВРС | 16 | Академия наук, Польша | 636 |
| | ФМС | 16 | Университет Хельсинки, Финляндия | 637 |
| | ФМС | 16 | Йонсей университет, Южная Корея | 638 |
| | ПРС | 64 | Университет Хоккайдо, Япония | 639 |
| | ПРС | ПЗС | Калифорнийский университет, Ирвин, США | 640 |
| ФМС | Скан. | Саратовский университет, Россия | 641 | |
| ФМС | 12/32 | Международный лазерный центр МГУ, Россия | 642, 643 | |
| ФМС | Скан. | Институт прикладной физики РАН, Н. Новгород, Россия | 613 | |

ПЗС — бесконтактная ПЗС-камера (камера на основе прибора с зарядовой связью), ФМС — фазово-модуляционная спектроскопия, ПРС — спектроскопия с пространственным разрешением, ВРС — спектроскопия с разрешением во времени, Вар. — варьируемое, Скан. — сканирование.

2.4.2. Диффузионная оптическая томография

2.4.2.1. Вводные замечания. Длинноволновая видимая и ближняя ИК-область спектра оказываются предпочтительными и в диффузионной оптической томографии (ДОТ). Основная задача томографии состоит в локализации и получении двух- или трехмерных изображений макронеоднородностей в биоткани (опухоли, гематомы и пр.). При этом в оптической томографии возможна как прямая, так и косвенная локализация опухоли. Прямая осуществляется за счет обнаружения локальных изменений оптических параметров самой ткани (поглощение и рассеяние), а косвенная — за счет визуализации локальных метаболических процессов или скорости кровотока [5, 12, 13, 30–32, 163]. Визуализация метаболических процессов, включая скорость и распределение кровотока и лимфотока в ткани, имеет прямое отношение к так называемой функциональной томографии, что является существенным достоинством оптического метода, поскольку в рамках одного метода можно получить информацию о структуре ткани и ее функционировании [5, 12, 13, 30–32, 163, 362, 510, 511, 577]. В настоящее время развивается несколько направлений оптической томографии, включая томографические системы и алгоритмы диффузионной томографии, основанные на регистрации обратно рассеянного непрерывного излучения на разных длинах волн и по разным направлениям, использовании группы выделенных (прямо прошедших или диффузно рассеянных) фотонов при облучении объекта импульсами света сверхкороткой длительности, или регистрации волн фотонной плотности; методы, основанные на использовании когерентных и поляризационных свойств оптического излучения, а также принципов конфокальной и нелинейной микроскопии [1, 3, 12, 13, 15, 16, 18–21, 27–33, 41, 120, 121, 125, 162, 175, 183, 509–511, 576, 578–651].

Физические принципы методов диффузионной оптической томографии и некоторые примеры их применения в медицинской диагностике представлены в предыдущих разделах главы. Далее рассмотрим эти методы более подробно.

2.4.2.2. Томография непрерывного излучения. Данный метод диффузионной оптической томографии (ДОТ) основан на измерениях интенсивности диффузно рассеянного излучения при различных положениях источника непрерывного излучения и детектора. Распределение интенсивности в точках детектирования для заданных положений источника может быть получено путем решения стационарного уравнения диффузии (2.6) с соответствующими граничными условиями либо, если это необходимо, с использованием более точного численного моделирования методом Монте-Карло на основе уравнения ТПИ (2.1). Визуализация структуры объекта сводится к нахождению распределений $\mu_a(\mathbf{r})$ в результате решения обратной задачи диффузии излучения по измеренным в конечном числе точек значениям интенсивности. Первые попытки получения изображений биообъектов с использованием этого подхода датируются 1984–1991 гг. (см. [120, 121, 511]), но, поскольку диффузный характер распространения излучения затруднял получение изображений неоднородностей с приемлемым для медицинской диагностики пространственным разрешением и контрастом, то дальнейший прогресс ДОТ был связан в основном с развитием модуляционных методов.

Тем не менее, в настоящее время метод ДОТ с использованием непрерывного излучения в диапазоне длин волн 650–1200 нм широко используется для функциональной диагностики и визуализации различных тканей и органов. Несомненное достоинство данного метода — простота реализации диагностических устройств, не требующих применения быстродействующих источников и приемников излучения, а также высокочастотных устройств обработки сигналов. Одно из известных применений данного метода в лабораторной и клинической практике — это мониторинг активности коры головного мозга человека. В этом случае не требуется высокое

пространственное разрешение, визуализация активности осуществляется по степени оксигенации ткани (крови) путем измерения поглощения зондирующего излучения на нескольких длинах волн [12, 13, 30–32, 327, 511, 576, 578, 602, 639, 648–650]. В [578] описана система визуализации, в которой источники излучения (лампы накаливания) и приемники (кремниевые фотодиоды) объединены в блок размером 9×4 см. В блоке используются 9 источников и 8 детекторов, объединенных парно. В каждой паре осуществляется детектирование рассеянного излучения на длинах волн 760 и 850 нм с помощью интерференционных фильтров с полушириной пропускания $\Delta\lambda_f = 9$ нм. Используются также системы с ПЗС-камерой в качестве детектора рассеянного излучения, которые позволяют осуществлять визуализацию неоднородностей в сильно рассеивающей среде на глубине до 1,5 см для длины волны зондирования 633 нм (см. [120, 121]). Разработаны быстродействующие алгоритмы реконструкции квазитрехмерных изображений оптических неоднородностей.

Если в ходе регистрации последовательности оптических изображений производится механическое воздействие на молочную железу, то такой метод можно отнести к оптомеханическим методам диагностики. Примером является динамическая оптическая маммография (DOBI — Dynamic optical breast imaging) [651], когда производится небольшая компрессия молочной железы под давлением около 10 мм рт. ст. При этом изменяются скорость кровотока и кровенаполнение тканей в области компрессии. Показано, что в условиях компрессии оптические свойства участков тканей, различающихся скоростью микроциркуляции, кровенаполнением, величиной интерстициального давления и скоростью потребления кислорода, изменяются по-разному. Это позволяет отличать нормальные и патологические ткани, что может использоваться в диагностике рака.

Основные промышленные и экспериментальные визуализаторы биотканей представлены в табл. 2.2–2.4 [600, 622–630, 651]. Благодаря простоте реализации и малой стоимости компонентов подавляющее большинство устройств использует непрерывное излучение.

2.4.2.3. Импульсная томография. На рис. 2.9, а иллюстрируется принцип зондирования рассеивающих сред короткими световыми импульсами, реализуемый в импульсной томографии [1, 3, 12, 13, 30–32, 64, 489, 491, 498, 500, 501, 503, 505, 509–511, 523, 579–600, 631–636, 644–647]. При детектировании излучения, прошедшего через объект в направлении зондирующего пучка, импульсу диффузно рассеянного излучения предшествует баллистический предвестник, обусловленный нерассеянной составляющей и задержанный по отношению к моменту прихода зондирующего импульса в рассеивающую среду на время $t_b \approx L/c$ (L — толщина рассеивающей среды в направлении распространения зондирующего излучения). Амплитуда баллистического предвестника при зондировании протяженных объектов (например, головного мозга) существенно меньше амплитуды импульса, соответствующего диффузно рассеянной составляющей. В частности, для типичных значений коэффициента экстинкции биоткани $\mu_t = \mu_s + \mu_a \approx 10\text{--}100 \text{ см}^{-1}$ для длин волн в окне прозрачности и при $L \approx 20$ см нерассеянная составляющая будет практически недетектируемой, величиной порядка $10^{-90}\text{--}10^{-900}$ от интенсивности зондирующего импульса, что существенно ограничивает возможность использования баллистических фотонов для получения изображений для объемных тканей. Однако при небольшой толщине ткани, на уровне 0,1–1 см, баллистические фотоны могут быть зарегистрированы и использованы для построения изображений. Форма импульса, соответствующего диффузно рассеянной составляющей, определяется функцией плотности вероятности оптических путей фотонов s , $\rho(s)$, для заданных условий освещения и детекти-

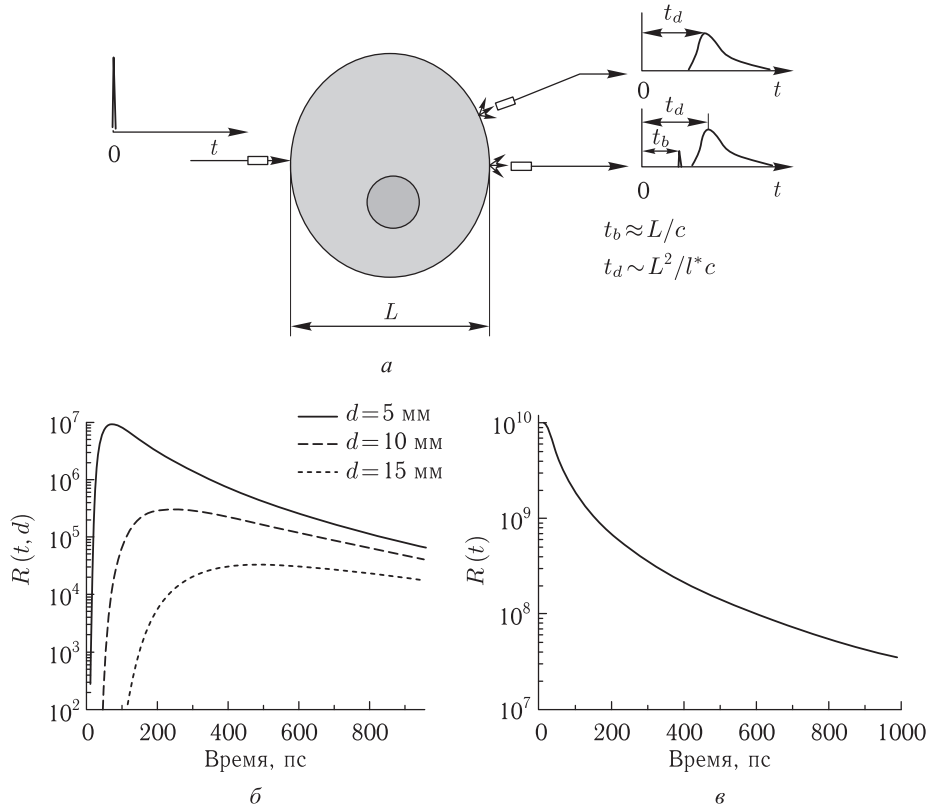


Рис. 2.9. Иллюстрация импульсного метода зондирования при исследовании «на просвет» (t_b и t_d — времена запаздывания баллистической и диффузной составляющих прошедшего излучения) (а); формы импульсов диффузно отраженного излучения для модели зондирования полубесконечной рассеивающей среды локализованным источником при детектировании точечным детектором (б) или со всей рассеивающей поверхности (в); параметры среды: $\mu_s = 6 \text{ см}^{-1}$, $\mu_a = 0,004 \text{ см}^{-1}$, $g = 0,7$, $n = 1,4$, $d \equiv r_{sd}$ — расстояние между источником и приемником, $l^* = (\mu'_s)^{-1}$, $R(t) = I(t)/I_0$ [120]

рования: $I(t - t_0) \sim \rho[c(t - t_0)]$, где t_0 — время прихода в среду зондирующего импульса.

На рис. 2.9, б, в приведены формы импульсов диффузно рассеянного излучения при зондировании полубесконечной среды коротким импульсом, поступающим в среду от локализованного источника (например, от оптического волокна), рассчитанные в соответствии с диффузионным приближением. Кривые на рис. 2.9, б соответствуют детектированию обратно рассеянного излучения детектором с малой площадью, расположенным на различных расстояниях от источника, кривая на рис. 2.9, в — детектированию рассеянного излучения со всей поверхности среды; величина $R(t) = I(t)/I_0$ может быть интерпретирована как зависящий от времени коэффициент диффузного отражения среды. Измерения характеристик импульса диффузно рассеянного излучения могут использоваться для определения оптических характеристик биотканей как рассеивающих сред.

Реконструкция томографических изображений биотканей может быть реализована путем детектирования как баллистической составляющей прошедшего излучения,

так и диффузно рассеянной составляющей. Выбор метода зондирования накладывает определенные ограничения на характеристики используемых источников и приемников. При детектировании баллистической составляющей реализуется принцип абсорбционной томографии, заключающийся в формировании последовательности «теневых» проекций структуры исследуемого объекта. Яркость получаемого изображения в данной точке определяется интегральным поглощением прошедшей через объект нерассеянной составляющей вдоль выбранного направления. Это позволяет осуществлять реконструкцию изображений с использованием традиционных методов абсорбционной томографии на основе преобразования Радона.

При практической реализации данного метода предъявляются высокие требования к источникам и приемникам излучения. Выделение баллистического предвестника требует стробирования детектируемого сигнала с временным окном, согласованным с длительностью зондирующего импульса. При увеличении ширины окна возрастает вероятность вклада в детектируемый сигнал рассеянных составляющих, распространяющихся преимущественно вдоль направления зондирующего пучка. Это приводит к снижению контраста формируемого изображения объекта. Стробирование баллистического предвестника необходимо осуществлять временным окном шириной порядка $(\mu_s c)^{-1}$, т. е. порядка времени распространения света между двумя последовательными актами рассеяния. Оценка ширины окна с использованием типичных значений μ_s для биотканей в окне прозрачности дает величину порядка 1 пс. В работах [579–581] проведены исследования возможности разделения баллистической и диффузной составляющих прошедшего излучения; в частности, найдено соотношение между характеристиками среды и параметрами зондирующего импульса [580], позволяющее получить реально наблюдаемую бимодальную форму детектируемого импульса, первый всплеск которого соответствует нерассеянной составляющей (см. рис. 2.9, а).

Другое обстоятельство, играющее важную роль при построении томографических систем на основе детектирования первопришедших фотонов, — это необходимость детектирования импульсов очень малой амплитуды. Данная проблема решается путем применения быстродействующих ФЭУ в режиме счета фотонов с последующей корреляционной обработкой последовательности фотоотчетов. При значительной оптической толщине объектов и биологически безопасных плотностях энергии зондирующих импульсов это приводит к необходимости накопления большого числа реализаций детектируемого сигнала.

Дискриминация диффузной составляющей с целью выделения баллистического предвестника может быть осуществлена как с помощью электронных средств, так и с использованием оптических эффектов. В частности, возможно использование интерференции между нерассеянной составляющей и специально сформированным опорным пучком, в том числе и в нелинейных оптических средах [396, 582, 583]. В работе [393] рассмотрено применение метода гетеродинной интерферометрии для детектирования баллистической составляющей. Дополнительные возможности для увеличения отношения сигнал/шум при выделении нерассеянной компоненты дает поляризационная дискриминация (фильтрация) детектируемого излучения, поскольку при зондировании линейно поляризованным излучением состояние поляризации баллистического компонента соответствует состоянию поляризации зондирующего излучения, а диффузная составляющая практически полностью деполяризована [27, 164, 584].

Другим подходом к оптическому стробированию баллистического предвестника является использование управляемых светом оптических затворов на эффекте Керра. Впервые подобный метод был использован в работе [499]. На образце биоткани *in vitro*, содержащим аномальную область с высоким значением μ_s , которая состояла из

раковых клеток, было показано, что детектирование первопришедших фотонов позволяет получить более контрастные проекции томографируемого объекта по сравнению со случаем детектирования диффузной составляющей. Вместо или в дополнение к оптическому стробированию, можно также использовать селективное усиление баллистического предвестника (например, на основе эффекта комбинационного рассеяния [585, 586] или параметрического преобразования света [587]).

Импульсный метод зондирования на основе детектирования диффузной составляющей также может быть использован для получения томографических изображений биотканей. Подобная возможность была впервые продемонстрирована в работе [588]. В данном случае к оптической схеме импульсного томографа не предъявляются столь высокие требования по временному разрешению и чувствительности, поскольку длительность импульса диффузной составляющей может достигать сотен пикосекунд, а его амплитуда на несколько порядков больше амплитуды баллистического предвестника. Основные проблемы при использовании данного подхода связаны с разработкой алгоритмов реконструкции изображений по измеренным в различных точках функциям импульсного отклика системы источник–объект–приемник. Процедура реконструкции включает следующие основные этапы:

- 1) разбиение исследуемого объекта на набор конечных элементов и задание исходных значений μ_a и μ'_s для каждого элемента;
- 2) выбор оптимальной конфигурации нахождения источников и приемников на поверхности объекта, позволяющей осуществлять зондирование всех элементов;
- 3) измерение функции импульсного отклика для каждого положения;
- 4) вычисление функции импульсного отклика для каждого положения, исходя из заданных значений μ_a и μ'_s для каждого элемента объекта;
- 5) сравнение вычисленных и измеренных функций импульсного отклика и (при необходимости) коррекция исходного набора значений μ_a и μ'_s .

Этапы 4) и 5) повторяют до получения минимального отклонения вычисленных значений функции импульсного отклика от измеренных значений. При вычислении функций импульсного отклика могут быть использованы подходы, основанные на численном решении нестационарного уравнения диффузии, или на основе моделирования методом Монте-Карло. В последние два десятилетия было разработано большое число эффективных алгоритмов решения обратной задачи импульсной ДОТ, включая вычислительные схемы на основе инверсного метода Монте-Карло [509–511].

В качестве источников излучения в импульсных системах применяются диодные лазеры, излучающие в диапазоне 600–1500 нм пикосекундные импульсы (~ 50 пс) при энергии порядка 10 пДж, твердотельные лазеры в режиме модуляции добротности (широко используется титан-сапфировый лазер, перестраиваемый в диапазоне 690–980 нм), а также лазеры на красителях. Приемниками служат лавинные фотодиоды, ФЭУ и электронно-оптические преобразователи с усилителями яркости (стрик-камеры) [1, 3, 30–32, 509–511].

В настоящее время в мировой практике существует общепринятый подход к разработке подобных систем, определяющий основные принципы их построения: многоканальная, как правило волоконно-оптическая, система ввода зондирующего излучения в исследуемый объект; несколько источников зондирующего излучения с различными длинами волн и многоканальная система сбора и детектирования рассеянного излучения [1, 3, 13, 30–32].

В одной из таких систем, излучение, генерируемое тремя диодными лазерами, через оптический демультиплексор последовательно поступает в 64 точки ввода, равномерно распределенные на поверхности объекта [589]. Подключение источника

излучения к соответствующей точке ввода осуществляется с помощью коммутатора 1×64 . Рассеянное излучение детектируется одновременно 64 приемниками (ФЭУ в режиме счета фотонов). Последовательности фотоотсчетов подвергаются одновременной корреляционной обработке по каждому из 64 каналов. Время получения изображения объекта, восстанавливаемого по набору из 63×64 реализаций детектируемых сигналов, составляет приблизительно 30 мин.

В импульсной томографической системе, описанной в [510, 590], также использован принцип многоканального зондирования и детектирования. Источником служит титан-сапфировый лазер, что позволяет увеличить энергию зондирующих импульсов по сравнению с диодными лазерами одновременно с возможностью перестройки в широком спектральном диапазоне. Лазерное излучение через волоконно-оптический переключатель и 32 световода доставляется к объекту. Регистрация рассеянного света осуществляется системой детектирования из 32 волоконно-оптических жгутов и многоанодных микроканальных ФЭУ. Суммарное время накопления информации при реконструкции изображения составляет приблизительно 10–20 мин и определяется временем сбора данных для каждого из положений источника излучения и временем переключения каналов осветительной системы. В результате испытаний были выявлены следующие проблемы, типичные для импульсных многоканальных систем: необходимость учета различий в задержках при распространении зондирующего импульса по световодам от источника к объекту и от объекта к фотодетекторам; наличие временных дрейфов (для разработанного образца — приблизительно 5 пс/ч) даже в случае длительного (10-часового) прогрева оборудования; межканальная интерференция измеряемых сигналов; наличие отражений от торцов световодов, искажающих детектируемые импульсы.

После сбора данных осуществляется восстановление изображения в виде пространственного распределения коэффициентов поглощения и рассеяния с помощью пакета программ TOAST (time-resolved optical absorption and scattering tomography — оптическая томография поглощения и рассеяния с временным разрешением) [591].

Фактором, существенно ограничивающим применение импульсной ДОТ в реальном времени, является характер зондирования объекта — цикл последовательных переключений источника между световодами, осуществляющими доставку излучения к различным участкам объекта. В [510] описан несколько иной принцип импульсного зондирования, который заключается в использовании осветительной системы, состоящей из световодов различной длины. Длина световодов подобрана так, чтобы обеспечить заданную задержку при распространении импульсов в соседних волокнах (порядка 25 пс). При засветке световодов объект зондируется последовательностью импульсов с заданной задержкой, и в детектируемой каждым детектором последовательности импульсов рассеянного излучения положение каждого импульса соответствует определенной паре источник–детектор. В качестве источников использованы лазеры на красителях с длинами волн 750 и 820 нм, накачиваемые азотным лазером. Длительность зондирующих импульсов составляла 500 пс при частоте следования 40 МГц. Отметим, что при зондировании сильно рассеивающих объектов время реконструкции изображения увеличивается за счет необходимости накопления достаточного количества реализаций детектируемых сигналов.

В 1995–1996 годах фирмами IDS (США) и Philips (Голландия) были выпущены промышленные образцы импульсных систем для диагностики рака молочной железы [510]. В томографе фирмы IDS используется титан-сапфировый лазер в режиме модуляции добротности, а детектирование прошедшего через объект света осуществляется с помощью матрицы лавинных фотодиодов. В процессе клинических испытаний данной системы были выявлены технические проблемы, связанные

с нестабильностью лазерного излучения и потерями в волоконных световодах. Фирма Philips также закрыла свой проект по выпуску импульсного оптического томографа.

Тем не менее, есть данные об успешном клиническом применении импульсных систем для диагностики рака молочной железы, томографии мозга новорожденных и исследования патофизиологии мышечной ткани при физических упражнениях [510, 590, 592–600, 631–636] (см. табл. 2.2–2.4). На рис. 2.10 и 2.11 показан типичный внешний вид клинической многоканальной импульсной томографической системы и проиллюстрирован характер получаемых оптических изображений в сравнении с магнитнорезонансным и рентгеновским изображениями.



Рис. 2.10. Типичная многоканальная оптическая импульсная томографическая система: *a* — волоконно-оптическая система, обеспечивающая передачу оптических сигналов источник–детектор, организованная в виде трех взаимосвязанных кольцевых рамок с посадочными местами для волокон; кольцевые рамки обеспечивают оптический контакт торцов световодов с поверхностью молочной железы пациента; *б* — аппаратура и положение пациентки в момент исследования [592]

Перспективы развития импульсной ДОТ связаны с совершенствованием элементной базы (появление надежных и недорогих быстродействующих источников и приемников, увеличение скорости обработки данных вычислительными системами), а также созданием multifunctionальных систем для многофакторного биохимического анализа биотканей в реальном времени.

2.4.2.4. Модуляционная томография. Другой метод ДОТ с разрешением во времени основан на использовании СВЧ-модулированного зондирующего излучения и анализе амплитудно-частотных или амплитудно-фазовых характеристик рассеянного излучения для различных положений источника и приемника относительно объекта и называется частотным или фазовым методом. В случае диффузионного распространения модулированного зондирующего излучения в рассеивающей среде, описываемого уравнением (2.24), в частотной области данное уравнение принимает вид, эквивалентный уравнению Гельмгольца [504, 562]:

$$(\nabla^2 + K^2)U(\mathbf{r}, \omega) = -Q(\mathbf{r}, \omega), \quad (2.41)$$

где $K^2 = (i\omega - c\mu_a)/D$, $Q(\mathbf{r}, \omega) = D^{-1} \cdot S_d(\mathbf{r}, \omega)$, а коэффициент диффузии фотонов D определяется соотношением (2.9).

Рассматривая случай распространения излучения в изотропной бесконечной среде от точечного источника, расположенного в точке $\mathbf{r} = 0$ и характеризуемого спектром $P(\omega)$, нетрудно получить, что при гармонической модуляции источника $P(\omega) = P_{DC}\delta(\omega) + P_{AC}\delta(\omega - \omega_0)$ ($P_{DC} \geq P_{AC}$) решение уравнения (2.41) имеет вид

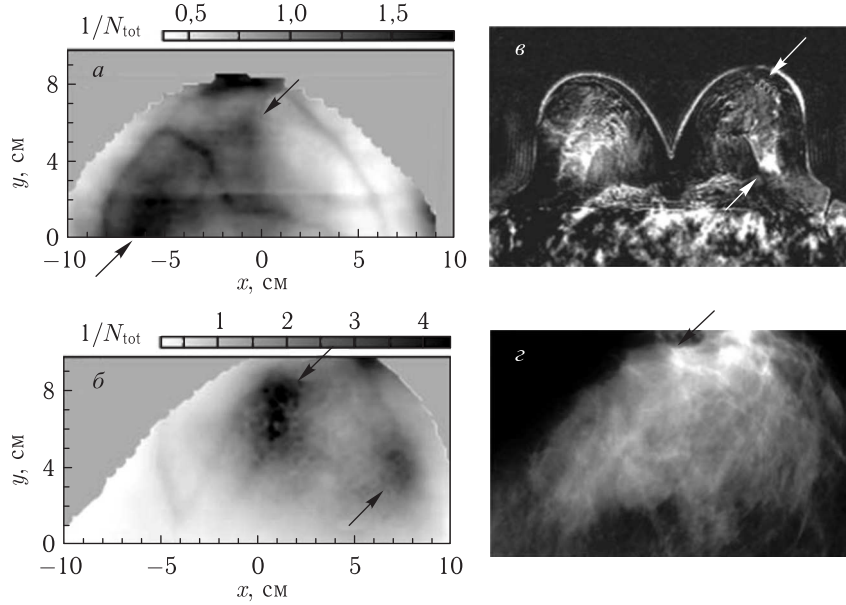


Рис. 2.11. Маммограммы пациентки с многополюсной карциномой протоков, показанной на изображениях стрелками: оптическая маммограмма левой молочной железы в кранио-каудальной проекции (проекция голова – нижняя часть туловища) (а); соответствующая срединно-боковая проекция (б); магнитно-резонансная маммограмма (поперечный срез) (в); рентгеновская маммограмма левой молочной железы в срединно-боковой проекции (г). Оптическая маммограмма представлена в виде обратного значения полного числа детектируемых фотонов $1/N_{\text{tot}}$ на длине волны 670 нм. Рентгеновская маммограмма не показывает карциному вблизи стенки грудной клетки [594]

сферической волны, амплитуда которой описывается выражением [562]

$$U_{AC}(r, \omega_0) = \frac{P_{AC}}{4\pi Dr} \exp \left\{ -r \left(\frac{c\mu_a}{2D} \right)^{0.5} \left[\left(1 + \frac{\omega_0^2}{c^2 \mu_a^2} \right)^{0.5} + 1 \right]^{0.5} \right\}, \quad (2.42)$$

а фаза волны равна

$$\Phi(r, \omega_0) = r \left(\frac{c\mu_a}{2D} \right)^{0.5} \left[\left(1 + \frac{\omega_0^2}{c^2 \mu_a^2} \right) - 1 \right]^{0.5} + \Phi_0, \quad (2.43)$$

где Φ_0 — начальная фаза волны, задаваемая источником.

Это дает основание рассматривать перенос гармонически модулированного излучения в среде с использованием представлений о затухающих волнах фотонной плотности, характеризуемых значением волнового числа

$$\left(c\mu_a/2D \right)^{0.5} \left[\left(1 + \frac{\omega_0^2}{c^2 \mu_a^2} \right) - 1 \right]^{0.5}, \quad (2.44)$$

а параметр $c\mu_a$ можно рассматривать как критическое значение частоты модуляции, определяющей характер затухания волн фотонной плотности в среде. Так, при $\mu_a = 0,1 \text{ см}^{-1}$ и показателе преломления среды $n = 1,4$ критическое значение частоты

равно $\omega_c \approx 2,14$ ГГц. При $\omega_0 \ll \omega_c$ коэффициент затухания фотонных волн слабо зависит от частоты и может быть приближенно оценен как $\{3\mu_a[\mu_a + (1 - g)\mu_s]\}^{0,5}$.

Как уже отмечалось выше для затухающих волн фотонной плотности характерны отражение и преломление на границе раздела двух сред с различающимися рассеивающими характеристиками, интерференция волн от двух и более источников и дифракция на локальных неоднородностях внутри рассеивающей среды. Наличие многократно рассеивающей среды принципиально для рождения и распространения таких волн [163, 537, 538, 543, 562].

Частотные зависимости волнового числа и коэффициента затухания для волн фотонной плотности определяют взаимосвязь между пространственным разрешением модуляционного метода и максимальной толщиной зондируемого слоя рассеивающей среды. Для большинства практических приложений в медицинской диагностике оптимальное значение частоты модуляции находится в диапазоне от 50 до 1000 МГц.

Основные направления клинического применения модуляционной ДОТ связаны с томографией головного мозга (обнаружение внутричерепных гематом, функциональная диагностика головного мозга, в частности — анализ гемодинамики) и диагностикой рака молочной железы (оптическая маммография). На рис. 2.12 представлена схема оптического томографа, разработанного фирмой Siemens AG Medical Engineering (Эрланген, Германия) [596, 603]. В качестве источников излучения используются 4 диодных лазера с длинами волн 690 нм (частота модуляции 69,50 МГц), 750 нм (69,80 МГц), 788 нм (70,20 МГц) и 856 нм (70,45 МГц). Доставка излучения к объекту и прием рассеянного излучения осуществляется с помощью световодов. Синхронное механическое сканирование объекта передающим и приемным световодами позволяет получить двумерные проекции внутренней структуры объекта. Время сканирования, необходимое для получения одного двумерного изображения, составляет 2 мин. Сравнение рентгеновских и оптических томограмм одного и того же объекта позволяет сделать вывод о том, что при достаточно высоком контрасте оптических томограмм, позволяющих с уверенностью диагностировать наличие новообразований, они характеризуются меньшим пространственным разрешением, что обусловлено диффузионным характером распространения света в биоткани. Несмотря на это оптическая диффузионная томография остается весьма перспективным направлением клинической диагностики, прежде всего благодаря биологической безопасности зондирующего ИК-излучения.

Одно из перспективных направлений развития модуляционной томографии связано с использованием многоэлементных фазированных излучателей (метод амплитудно-фазовой компенсации) [12, 31, 91]. Данный подход позволяет увеличить пространственное разрешение за счет интерференции волн фотонной плотности от различных источников. При использовании двух источников, испускающих волны фотонной плотности одинаковой амплитуды и частоты с фазовым сдвигом 180° , и детектора, расположенного в зоне, где разность хода волн от источников равна нулю, амплитуда детектируемого сигнала для изотропной рассеивающей среды равна нулю. Наличие неоднородности в области распространения волн фотонной плотности приводит к нарушению фазового согласования. Эксперименты с модельными средами показали, что пространственное разрешение в случае локализации поглощающей неоднородности достигает приблизительно 1 мм; аналогичное значение ожидается в случае рассеивающих неоднородностей.

На рис. 2.13 приведена схема модуляционной системы с использованием амплитудно-фазовой компенсации [604]. При формировании зондирующего излучения и детектировании рассеянного света используется принцип гетеродинной обработки сигналов, что позволяет осуществлять точные фазовые измерения в низкочастотном диапазоне с высокой точностью. Источниками служили 8 диодных лазеров с длиной

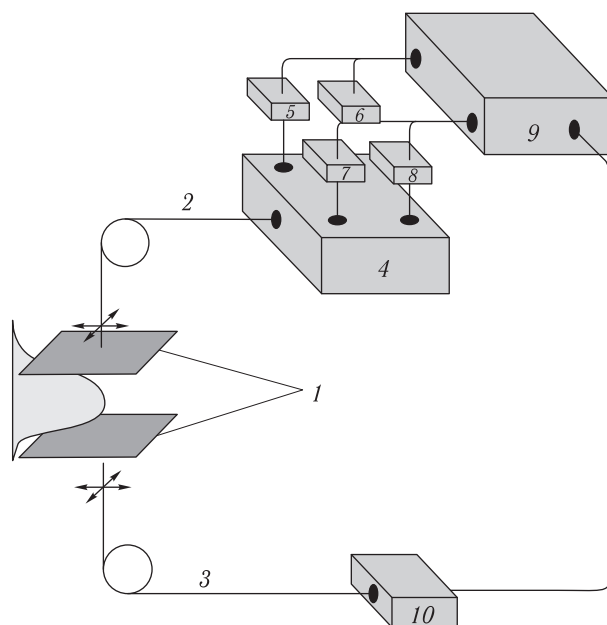


Рис. 2.12. Схема оптического маммографа фирмы Siemens AG (Германия): 1 — устройство фиксации объекта; 2 — световод для передачи излучения к объекту; 3 — световод для приема рассеянного излучения; 4 — волоконно-оптический мультиплексор 4×1 ; 5–8 — набор лазерных диодов; 9 — блок управления и обработки; 10 — детектор (ФЭУ) [603]

волны 780 нм. Несущая (модулирующая) частота равна 50 МГц, выделяемая частота — 1 кГц. В качестве приемников использованы четыре ФЭУ. Излучатели и приемники объединены в блок размером 9×4 см. Циклы измерений, соответствующих 16 различным комбинациям источников и приемников, повторяются с периодичностью 16 с.

Использование вместо каждого излучателя в блоке нескольких с различными длинами волн позволяет расширить функциональные возможности системы. Например, для набора из двух лазеров с длинами волн 750 нм и 830 нм в каждом источнике получается более чем двукратное увеличение амплитуды детектируемого сигнала вследствие уменьшения затухания зондирующего излучения [12, 13, 31]. Такие системы позволяют получить высококачественное изображение объекта исследований при времени выборки данных порядка 8 с и используются для функциональной диагностики мозга новорожденных и рака молочной железы.

Простая и универсальная исследовательская система была разработана в Саратовском университете [641]. Эта система включает квантово-размерные лазеры (длины волн 790 и 840 нм), гарантирующие высокоэффективную модуляцию лазерного излучения по цепи питания с низким уровнем шумов в диапазоне 100–1000 МГц, набор оптических волокон и управляемый компьютером оптический стол, позволяющий обеспечить различную геометрию эксперимента. Приемный блок содержит лавинный фотодиод с высокочастотным усилителем (20 дБ). Полный динамический диапазон приемного блока вместе со спектроанализатором или сетевым анализатором составляет 70 дБ.

В работах [642, 643] описан образец модуляционного томографа, позволяющий осуществлять визуализацию протяженных (размером до 140 мм) рассеивающих объ-

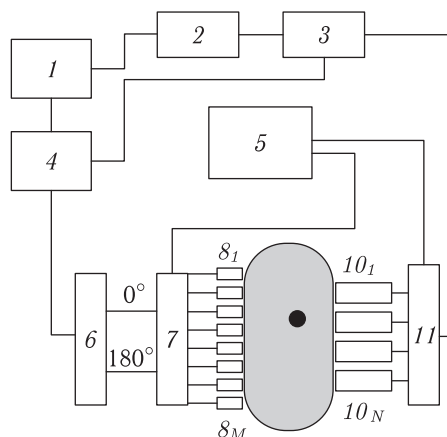


Рис. 2.13. Схема оптического томографа с фазовой компенсацией: 1 — генератор радиодиапазона; 2 — фазовый детектор; 3 — гетеродин; 4 — модулятор; 5 — блок обработки; 6 — фазорасщепитель; 7, 11 — коммутаторы; $8_1, \dots, 8_M$ — диодные лазеры; 9 — объект; $10_1, \dots, 10_N$ — фотоумножители [604]

ектов с параметрами, типичными для биологических тканей в окне их прозрачности. Источниками служили диодные лазеры с длинами волн 775, 808 и 818 нм, с мощностью излучения 15–30 мВт и частотой модуляции интенсивности 100 МГц. Для подачи излучения на объект исследования и приема рассеянного света использована система световодов с диаметром сердцевины 600 мкм (12 световодов для подачи и 32 для приема). Детектирование рассеянного излучения осуществлялось ФЭУ (Hamamatsu R636-10) в режиме счета фотонов. Для обработки последовательностей фотоотсчетов применен метод времяразрешенного счета фотонов, позволяющий получать гистограммы распределений фотоотсчетов по периоду модуляции, в результате анализа которых находятся амплитудно-фазовые характеристики детектируемого сигнала. Для восстановления изображений разработан быстрый проекционный алгоритм; время реконструкции для объекта размером до 140 мм составляло 5–10 мин.

На разработанном в Институте прикладной физики РАН (Н. Новгород) модуляционном ДОТ с параллельной геометрией были проведены успешные клинические исследования на 5 здоровых добровольцах и 5 пациентах с диагнозом карцинома молочной железы [613]. Томограф работал на трех длинах волн: 684 нм, 794 нм и 850 нм. Эти длины волн лазерных источников были выбраны из следующих соображений, длина волны 684 нм близка длине волны 700 нм, где дезоксигемоглобин имеет максимальный вклад в поглощение, длина волны 794 нм соответствует примерному равенству поглощения дезокси- и оксигемоглобина, а на длине волны 850 нм оксигемоглобин имеет максимум поглощения. Излучение всех трех лазеров направлялось с помощью волоконного жгута на объект. Частота модуляции интенсивности лазеров составляла 140 МГц. Рассеянный в направлении вперед свет (режим просвечивания) детектировался ФЭУ (Hamamatsu) с автоматическим управлением усиления, что существенно увеличивало динамический диапазон измерительной системы и позволяло избегать насыщения сигнала при движении источника и приемника к краю молочной железы, где ее толщина существенно меньше, чем в центре. Отметим, что ФЭУ работал в непрерывном режиме, а не в режиме счета фотонов. Для обеспечения измерений фазы модуляционного сигнала с высокой точностью для гетеродинирования сигналов использовались температурно-стабилизированные генераторы с разностью в частотах, равной 1 кГц. Оба низкочастотных сигнала (опорный и детектируемый)

оцифровывались с помощью АЦП. Расчеты разности амплитуд и фаз этих сигналов производились с помощью преобразования Гильберта, поскольку оно более устойчиво в условиях дрейфа частоты, по сравнению с обычно используемым преобразованием Фурье. Независимое сканирование источника и приемника в определенной плоскости обеспечивалось компьютерно-управляемыми шаговыми двигателями, область сканирования составляла $15 \times 15 \text{ см}^2$. Считывание информации осуществлялось автоматически для каждого нового шага сканирования при фиксированном расстоянии между источником и приемником последовательно для каждой из трех длин волн. При исследованиях молочная железа располагается между двумя прозрачными пластинами, которые соответствуют плоскостям источника и приемника, и слегка сжимается. 2D-изображения для коэффициентов поглощения и рассеяния на трех длинах волн, рассчитанные на основе решения обратной задачи рассеяния, показали существенные различия между нормальной и злокачественной тканью. Соответственно, существенно различны и реконструированные пространственные распределения значений концентрации полного гемоглобина ($t\text{Hb} = \text{Hb} + \text{HbO}_2$), дезоксигенированного гемоглобина Hb , оксигенированного гемоглобина HbO_2 и степени насыщения кислородом ($\text{StO}_2 = [\text{HbO}_2]/[t\text{Hb}]$). Чувствительность установки позволяла обнаруживать опухоли молочной железы на глубине до 8 см.

Результаты клинических исследований по диагностике рака молочной железы, томографии мозга новорожденных и изучению патофизиологии мышечной ткани при физических упражнениях, а также промышленные и экспериментальные установки на основе метода фазово-модуляционной спектроскопии (ФМС) представлены в работах [510, 592–600, 613–615, 621, 637, 638, 641–643] (см. табл. 2.2–2.4).

2.4.2.5. *Алгоритмы решения обратных задач.* Разработано значительное количество алгоритмов решения обратных задач ДОТ [163, 502, 540, 541, 549, 561, 605–612]. Остановимся здесь лишь на общих принципах и приведем несколько примеров. В частности, применительно к модуляционной томографии в работе [540] предложен метод реконструкции изображений по измеренному набору значений амплитуды и фазы модуляции рассеянного излучения при различных положениях источника и детектора относительно объекта. В основе алгоритма лежат методы теории возмущений, в соответствии с которыми пространственные распределения μ_a и μ'_s в зондируемом объеме представляются в следующем виде:

$$\mu_a(\mathbf{r}) \Rightarrow \mu_a^0 + \Delta\mu_a(\mathbf{r}); \quad \mu'_s(\mathbf{r}) \Rightarrow \mu_s^0 + \Delta\mu_s(\mathbf{r}). \quad (2.45)$$

Уравнение Гельмгольца вида (2.41) в этом случае должно быть заменено уравнением для возмущенных значений интенсивности диффузной составляющей:

$$(\nabla^2 + K^2)U(\mathbf{r}) = \frac{\delta(\mathbf{r})}{D_0} + \xi \cdot \Xi(\mathbf{r})U(\mathbf{r}), \quad (2.46)$$

где ξ — параметр; значения K и D_0 соответствуют невозмущенным параметрам объекта, функция $\Xi(\mathbf{r})$ определяется возмущениями μ_a и μ'_s . Комплексное значение амплитуды волны фотонной плотности может быть представлено как разложение в ряд по степеням параметра ξ :

$$U_{AC}(\mathbf{r}) = U_{AC0}(\mathbf{r}) + \xi U_{AC1}(\mathbf{r}) + \xi^2 U_{AC2}(\mathbf{r}) + \dots, \quad (2.47)$$

где член порядка N определяется следующим рекуррентным соотношением:

$$U_{ACN}(\mathbf{r}_d) = \int G(\mathbf{r}, \mathbf{r}_d)\Xi(\mathbf{r})U_{ACN-1}(\mathbf{r})d^3\mathbf{r}; \quad (2.48)$$

\mathbf{r}_d определяет положение приемника, $G(\mathbf{r}, \mathbf{r}_d)$ — функция Грина для уравнения Гельмгольца.

Для многих приложений коэффициент μ'_s можно считать постоянным по объему, а флуктуации μ_a — малой и плавно изменяющейся величиной (например содержание гемоглобина в ткани). В данном случае $\Xi(\mathbf{r}) \approx c\Delta\mu_a(\mathbf{r})/D_0$, и только линейный член в разложении (2.47) может рассматриваться при определении амплитуды и фазы волны фотонной плотности. Разбивая зондируемый объем на n элементов размером h , можно свести задачу восстановления $\mu_a(\mathbf{r})$ к решению системы линейных уравнений:

$$\begin{pmatrix} U_1(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d)_1 \\ U_1(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d)_2 \\ \dots \\ U_1(\mathbf{r}_s, \mathbf{r}_d)_m \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} T_{11} \dots T_{1n} \\ T_{21} \dots T_{2n} \\ \dots \\ T_{m1} \dots T_{mn} \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} \Delta\mu_a(\mathbf{r}_1) \\ \Delta\mu_a(\mathbf{r}_2) \\ \dots \\ \Delta\mu_a(\mathbf{r}_n) \end{pmatrix}, \quad (2.49)$$

где матричные элементы T_{km} могут быть представлены следующим образом:

$$T_{km} = G(\mathbf{r}_{dk}, \mathbf{r}_m) U_0(\mathbf{r}_{sk} - \mathbf{r}_m) \frac{h^3}{cD_0}.$$

В работах [524, 608–610, 644–647] рассмотрены эффективные алгоритмы решения обратных задач ДОТ с использованием метода «средних траекторий». Этот метод базируется на фундаментальном свойстве решения уравнения диффузии, выражающемся во взаимосвязи функций $U(\mathbf{r}, t)$ и $U_1(\mathbf{r}_l, \tau)$ в форме интегрального преобразования с функцией Грина диффузионного уравнения в качестве ядра, где τ характеризует момент времени, когда фотон, мигрирующий из точки пространства–времени для источника в точку пространства–времени приемника, окажется в точке пространства с координатами \mathbf{r}_l . Эта взаимосвязь позволяет представить относительное изменение оптического сигнала $\Delta I/I$, обусловленное наличием неоднородности в объекте (опухоль, например), в форме криволинейного интеграла по траектории, описывающей положение центра фотонного облака, распространяющегося в среде от источника к детектору:

$$-\ln\left(1 - \frac{\Delta I}{I}\right) = \frac{c}{n} \int_0^{L_{\text{ph}}} \frac{\langle \delta\mu_a(l) \rangle}{v(l)} dl, \quad (2.50)$$

где L_{ph} — среднестатистическая траектория фотонов; l — расстояние вдоль этой траектории; $v(l)$ — мгновенное значение скорости распространения облака вдоль траектории; $\langle \delta\mu_a(l) \rangle$ — изменение коэффициента поглощения вдоль траектории. Имеет место некоторая аналогия диффузионной и абсорбционной томографии, когда затухание сигнала обусловлено поглощающими включениями вдоль траектории зондирующего пучка. Интегральное уравнение (2.50) является аналогом преобразования Радона и может быть обращено с помощью быстрых алгоритмов рентгеновской томографии [646]. Правда, в отличие от преобразования Радона, интегрирование в (2.50) осуществляется не по прямой, а по кривой линии L_{ph} .

В работах [611, 612, 642, 643] рассмотрены нелинейные статистические алгоритмы решения обратных задач ДОТ, способные работать в режиме реального времени. В основе алгоритмов лежит гипотеза о взаимосвязи вероятности P'_{ij} нахождения неоднородности по результатам ij -измерения и по разности детектируемых потоков фотонов при наличии и отсутствии неоднородности в объекте: $P'_{ij} \propto F'_{ij} - F_{ij}$. Пространственное распределение P'_{ij} определяется плотностью вероятности $p_{ij} \propto P'_{ij} f'_{ij}(\mathbf{r})$, где $f'_{ij}(\mathbf{r})$ — трехмерное распределение вероятности прохождения фотонов, зарегистрированных в ij -измерении, через точку объекта с координатой \mathbf{r} .

Реконструкция изображения структуры объекта сводится к нахождению полного трехмерного распределения вероятности нахождения неоднородностей в различных точках объекта, определяемого через произведение $\prod_{ij} P'_{ij} f'_{ij}(\mathbf{r})$. Необходимые для этой процедуры значения $\Delta F'_{ij} = F'_{ij} - F_{ij}$ получаются в результате эксперимента, а значения $f'_{ij}(\mathbf{r})$ определяются с использованием моделирования методом Монте-Карло или приближенных аналитических методов. Эксперименты с модельными объектами с поглощающими неоднородностями продемонстрировали высокое быстродействие алгоритма при приемлемом качестве восстанавливаемых изображений.

Алгоритмы на основе нейронных сетей для определения оптических параметров и восстановления изображения внутренней структуры сильно рассеивающих сред по измерениям пространственного профиля рассеянного назад излучения представлены в [648, 649]. Применение методов обращения нейронной сети и нечеткой системы с последующим обращением позволяет определять коэффициент поглощения в рассеивающей среде с погрешностью 20 %, а коэффициент рассеяния и параметр анизотропии рассеяния на уровне 5–10 % [648]. С использованием моделирования пространственно-углового распределения обратно рассеянного оптического излучения методом Монте-Карло, сочетающим в себе две схемы моделирования эффективных оптических путей и статистических весов, показано, что метод искусственной нейронной сети достаточно эффективен при решении обратных задач по определению размера рассеивателей и восстановлению изображения локальных макронеоднородностей в биотканях [649].

Влияние преломления света на границах исследуемых объектов на восстановление изображения в трансмиссионной оптической томографии рассеивающих сред исследовано в [650]. Показано, что без коррекции преломления на границах цилиндрического объекта наблюдаются значительные искажения в изображении. Другим способом уменьшения искажений, связанных с преломлением света, может служить помещение объекта в иммерсионную среду, что используется на практике [22].

2.5. Взаимодействие поляризованного излучения с биологическими объектами

2.5.1. Анизотропия биотканей. Многие биологические ткани обладают оптической анизотропией [12, 13, 27, 31, 57]. Двулучепреломление тканей обусловлено главным образом линейной анизотропией волокнистых структур, характерных для соединительных тканей. Для таких структур усредненный показатель преломления вдоль направления волокон больше, чем поперек волокон, а моделью является набор параллельных цилиндров, образующих двулучепреломляющую среду с оптической осью, параллельной оси цилиндров. Это так называемое двулучепреломление формы, которое характерно для большого разнообразия биологических тканей, включая роговицу, склеру и сетчатку глаза, хрящ, сухожилие, твердую мозговую оболочку (*dura mater*), мышечную, нервную, зубную и костную ткани. Ткани могут содержать одноосные и/или двуосные двулучепреломляющие структуры.

Например, в костной и зубной тканях — это минерализованные структуры, содержащие кристаллы гидроксиапатита. В частности, эмаль зуба представляет собой упорядоченный набор таких кристаллов, окруженных белково-водно-липидным матриксом [191, 193–195, 199]. Хорошо ориентированные гексагональные кристаллы гидроксиапатита диаметром 30–40 нм и длиной до 10 мкм упакованы в органический матрикс и образуют эмалевые призмы (или стержни) диаметром 4–6 мкм. Эмалевые призмы ориентированы приблизительно перпендикулярно поверхности зуба. В свою очередь, дентин зуба пронизан дентиновыми тубулами в виде полых органических

цилиндров с сильно минерализованной оболочкой. Диаметр тубул равен 1–5 мкм, а их плотность лежит в диапазоне $(3-7) \cdot 10^6 \text{ см}^{-2}$ [191, 193, 199].

Сухожилие состоит в основном из параллельных плотно упакованных коллагеновых волокон, образующих параллельные пучки с вкраплением длинных эллипсоидальных фибробластов. В общем случае волокна сухожилия имеют цилиндрическую форму с диаметром от 20 до 400 нм.

У артерии наружный адвентициальный слой состоит, в основном, из коллагеновых волокон диаметром 1–12 мкм и более тонких эластиновых волокон диаметром 2–3 мкм. Как и у сухожилия, цилиндрические коллагеновые и эластиновые волокна ориентированы преимущественно вдоль одной оси, что обуславливает двулучепреломление. С другой стороны, миокард содержит волокна, ориентированные вдоль двух различных осей. Миокард состоит преимущественно из волокон сердечной мышцы, образующих ленты, выходящие вокруг желудочков и предсердия. Для миокарда типично двулучепреломление, поскольку показатель преломления вдоль оси мышечного волокна отличается от показателя преломления в поперечном направлении.

Двулучепреломление формы возникает, когда оптическая разность фаз между двумя ортогонально поляризованными компонентами отлична от нуля для света, рассеянного вперед. После многократных актов рассеяния вперед накапливается относительная разность фаз и между ортогонально поляризованными компонентами образуется запаздывание (δ_{oe}) аналогичное тому, которое возникает при двойном лучепреломлении. Для упорядоченных линейных структур рост фазовой задержки можно характеризовать разностью эффективных показателей преломления для света, поляризованного вдоль и поперек длинной оси линейной структуры (Δn_{oe}). Влияние двулучепреломления ткани на распространение линейно поляризованного света зависит от угла между направлением поляризации падающего света и оптической осью вещества ткани. Фазовая задержка δ_{oe} между ортогонально поляризованными компонентами пропорциональна расстоянию d , пройденному в двулучепреломляющей среде [652]:

$$\delta_{oe} = \frac{2\pi d \Delta n_{oe}}{\lambda_0}. \quad (2.51)$$

Среда из параллельных цилиндров является положительной одноосной двулучепреломляющей средой ($\Delta n_{oe} = (n_e - n_o) > 0$) с оптической осью, параллельной осям цилиндров. Поэтому луч, у которого электрический вектор направлен параллельно осям цилиндров, будет называться «необыкновенным», а луч, у которого электрический вектор перпендикулярен осям цилиндров, — «обыкновенным». Электрический вектор необыкновенного луча лежит в главной плоскости, т.е. в той же плоскости, что и оптическая ось. Разность $(n_e - n_o)$ между показателями преломления необыкновенной и обыкновенной волн является мерой двулучепреломления среды, состоящей из цилиндров. В рэлеевском пределе, когда диаметр цилиндра $\ll \lambda$, двулучепреломление формы определяется соотношением [653, 654]

$$\Delta n_{oe} = (n_e - n_o) = \frac{f_1 f_2 (n_1 - n_2)^2}{f_1 n_1 + f_2 n_2}, \quad (2.52)$$

где f_1 — объемная доля цилиндров; f_2 — объемная доля базового вещества, а n_1 , n_2 — соответствующие показатели преломления. При заданной разности показателей преломления максимальное двулучепреломление ожидается для примерно равных объемных долей тонких цилиндров и базового материала. Для систем с большими диаметрами цилиндров ($\gg \lambda$) двулучепреломление стремится к нулю.

Двулучепреломление формы используется в микроскопии биообъектов как средство изучения структуры ткани. Для разделения двулучепреломления формы и мате-

риала средние показатели преломления материала волокон и окружающего вещества должны быть сделаны равными, поскольку двулучепреломление формы исчезает при $n_1 = n_2$.

Линейный дихроизм (двойное поглощение или ослабление), т.е. различное поглощение (ослабление) для двух ортогональных поляризаций, в системах, образованных длинными цилиндрами, определяется разностью между мнимыми частями соответствующих эффективных показателей преломления. В зависимости от соотношения между размерами и оптическими константами материала цилиндров, эта разность может принимать как положительные, так и отрицательные значения [218].

Известные из литературы значения двулучепреломления для сухожилий, мышечной ткани, коронарной артерии, миокарда, склеры, хряща и кожи имеют $\Delta n_{oe} \sim 10^{-3}$ (см., например, работы [652, 655–661]). Измеренные вариации показателя преломления для быстрой и медленной осей роговицы кролика показывают, что ее двулучепреломление меняется в пределах от 0 в вершинной точке роговицы до $5,5 \cdot 10^{-4}$ в основании, где она присоединяется к склере [662]. Преобладающая ориентация коллагеновых волокон приводит к двулучепреломлению и дихроизму [237].

Поляризационно-чувствительная оптическая когерентная томография позволяет измерять линейное двулучепреломление в рассеивающей ткани с высокой точностью. Были получены такие данные: $\Delta n_{oe} = 1,4 \cdot 10^{-3}$ для мышечной ткани грызунов [652, 661]; $(4,2 \pm 0,3) \cdot 10^{-3}$ для сухожилия поросенка в норме и $(2,24 \pm 0,07) \cdot 10^{-3}$ для термически обработанной ткани (90 °C, 20 с), $1,5 \cdot 10^{-3}$ – $3,5 \cdot 10^{-3}$ для кожи свиньи и $3,0 \cdot 10^{-3}$ для хряща быка [663]; и $(3,7 \pm 0,4) \cdot 10^{-3}$ для сухожилия быка [659]. Такое двулучепреломление обеспечивает 90%-фазовую задержку на глубине порядка нескольких сот микрометров.

Двулучепреломление и дихроизм связаны с плотностью и некоторыми другими свойствами коллагеновых волокон ткани, тогда как ориентация быстрой оси отражает ориентацию коллагеновых волокон. Плотность коллагеновых волокон в коже и хряще не так однородна, как в сухожилии, поэтому распределение ориентаций коллагеновых волокон не столь упорядоченно, а значит и распределение параметров двулучепреломления [663].

Кроме линейного двулучепреломления и дихроизма, многие ткани показывают оптическую активность. Так называемая хиральность молекул, возникающая из-за несимметричной их структуры, приводит к ряду характерных оптических эффектов под общим названием оптической активности [218]. Хорошо известным проявлением оптической активности является способность вращать плоскость поляризации линейно поляризованного света вокруг направления его распространения. Угол поворота зависит от концентрации хиральных молекул, толщины слоя среды и длины волны света. Ткани, содержащие хиральные компоненты, демонстрируют оптическую активность [662, 664, 665]. Интерес к хиральными рассеивающим средам стимулируется потенциальной возможностью неинвазивного *in situ* оптического мониторинга глюкозы у больных диабетом [27, 34, 109, 123, 664, 665].

В сложных тканевых структурах агрегаты частиц, в частности сферических частиц, могут быть ответственными за оптическую активность ткани. Можно построить и более сложные модели анизотропных тканей. Например, роговица глаза может быть представлена как система плоских анизотропных слоев (пластинок или ламелл), каждый из которых образован плотно упакованными длинными цилиндрами (фибриллами), оптические оси которых ориентированы по спирали. Такая волокнисто-слоистая структура роговицы отвечает за линейный и круговой дихроизм и его зависимость от угла между пластинками [237].

2.5.2. Описание поляризованного излучения. Слабо рассеивающие биоткани. До сих пор мы игнорировали векторный характер излучения, распространяющегося в рассеивающих средах, таких как биоткани, поскольку считали, что в силу случайного характера неоднородных сред происходит быстрая деполяризация света при его распространении в среде. Однако в ряде случаев (неплотные биоткани, такие как ткани глаза; монослой клеток; поверхностные слои ткани, например кожи, и т.п.) степень поляризации прошедшего или отраженного света оказывается вполне измеряемой. При этом информативными параметрами, характеризующими структуру биотканей и ансамблей клеток, являются как степень деполяризации первоначально поляризованного света, характер преобразования поляризации из одного вида в другой, так и появление поляризованного компонента в рассеянном свете при облучении объекта неполяризованным излучением [3, 12, 13, 19, 27, 30–35, 41, 164, 171, 431, 571, 572, 666–680].

Рассмотрим преобразование состояния поляризации любого типа (линейной, круговой или эллиптической) в рассеивающей среде с типичными для биотканей параметрами. Для этого проанализируем взаимодействие монохроматической плоской волны с изолированным рассеивателем [76, 217, 358, 676]. Состояние поляризации рассеянного света описывается вектором Стокса:

$$\mathbf{I}_s = M \cdot \mathbf{I}_i, \quad (2.53)$$

где M — 4×4 -матрица рассеяния (или матрица Мюллера); \mathbf{I}_i — вектор Стокса падающего излучения.

Вектор Стокса определяется как

$$\mathbf{I} = \begin{bmatrix} I \\ Q \\ U \\ V \end{bmatrix}, \quad (2.54)$$

где

$$\begin{aligned} I, Q &= \langle E_x E_x^* \pm E_y E_y^* \rangle, \\ U, V &= \langle E_x E_y^* \pm E_y E_x^* \rangle \end{aligned} \quad (2.55)$$

E_x и E_y — ортогональные компоненты вектора электрического поля, $\langle \rangle$ скобки означают усреднение по времени.

В результате рассеяния на частице свет в общем случае становится эллиптически поляризованным. Для сферически симметричных частиц из оптически неактивного материала

$$M = \begin{vmatrix} M_{11} & M_{12} & 0 & 0 \\ M_{12} & M_{11} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & M_{33} & M_{34} \\ 0 & 0 & -M_{34} & M_{33} \end{vmatrix}. \quad (2.56)$$

Элементы матрицы рассеяния света (МРС) зависят от угла рассеяния ϑ , длины волны, геометрических и оптических параметров рассеивателей.

Степень линейной поляризации рассеянного света через параметры Стокса определяется как

$$P_L = Q_s / I_s, \quad (2.57)$$

а круговой как

$$P_C = M_{33} / M_{11}. \quad (2.58)$$

Для ансамбля взаимодействующих частиц в приближении однократного рассеяния [5, 27] элементы МРС имеют вид

$$M_{ij}(\vartheta) = M_{ij}^0(\vartheta)NF(\vartheta), \quad (2.59)$$

где M_{ij}^0 — элементы МРС изолированной частицы; N — число рассеивателей; $F(\vartheta)$ — интерференционный член, учитывающий пространственную корреляцию частиц.

Отметим, что нормированные элементы МРС (M_{ij}/M_{11}) не зависят от учета пространственной корреляции рассеивателей и совпадают с элементами МРС для изолированных частиц (предполагается монодисперсная система частиц).

2.5.3. Сильно рассеивающие биоткани. Состояние поляризации многократно рассеянного света анализируется либо в условиях пространственной диффузии фотонов, когда угловой спектр излучения практически изотропен [448, 674, 676, 677], либо при малоугловом рассеянии в средах с крупномасштабными неоднородностями [171, 671, 674, 678].

Следуя [171], отметим, что анализ состояния поляризации при малоугловом многократном рассеянии важен для многих задач из оптической диагностики биологических сред, которые могут быть представлены в виде случайных систем с дальнедействующими корреляциями флуктуаций диэлектрической проницаемости, которые показывают когерентные эффекты рассеяния [172, 173] или от которых следует ожидать флуктуации поляризации рассеянного света как от неупорядоченных сред с крупномасштабными неоднородностями [680].

В практическом плане ожидается, что поляризационные методы должны привести к более простым, по сравнению с временными и фазово-частотными, методам и схемам оптической медицинской томографии, а также дать новую информацию о структуре биотканей [27, 658, 659, 666, 668–673, 675, 681].

Рассмотрим сначала распространение линейно поляризованного излучения в биотканях и модельных средах. Одно из первых исследований степени деполяризации лазерного излучения при распространении в различных биотканях представлено в [667]. Измерялось отношение интенсивности компонентов прошедшего слоя биоткани света, поляризованного параллельно плоскости поляризации падающего излучения (I_{\parallel}) и перпендикулярно ей (I_{\perp}). Измерения проводились в узком телесном угле ($\sim 10^{-4}$ ср) в направлении падающего света на длинах волн аргонового (476, 488 и 514 нм) и гелий-неонового (633 нм) лазеров при диаметре пучка порядка 1 мм. Излучение считалось деполяризованным, когда $I_{\parallel}/I_{\perp} = 2$. В зависимости от толщины образца ткани и ее типа это отношение изменялось от 300 до 1. Длина пути света в ткани l_p , на которой происходит деполяризация света ($I_{\parallel}/I_{\perp} = 2$), является характеристикой ткани. Оказалось (рис. 2.14), например, что значения l_p сильно различаются для белого вещества мозга и ткани его корковой области и составляют 0,19 и 1,0 мм (476–514 нм) и 0,23 и 1,3 мм (633 нм) соответственно. Дерма кожи человека (без крови) имеет длину деполяризации $l_p = 0,43$ мм (476–514 нм) и 0,46 мм (633 нм).

Длина деполяризации уменьшается при патологическом изменении ткани стенки аорты: $l_p = 0,54$ мм (норма), 0,39 мм (стадия известкования) и 0,33 мм (стадия некротической язвы), $\lambda = 476$ –514 нм. Цельная кровь с низким гематокритом имеет значительную длину деполяризации на $\lambda = 633$ нм, $l_p = 4,0$ мм.

Очевидно, что длина деполяризации должна быть близка к средней транспортной длине пробега фотона l_{tr} (см. (2.10)), так как она характеризует расстояние, на котором направление рассеянного света становится полностью случайным, а следовательно случайной становится и плоскость поляризации линейно поляризованного света [666, 669]. Поскольку l_{tr} определяется значением редуцированного коэффициента

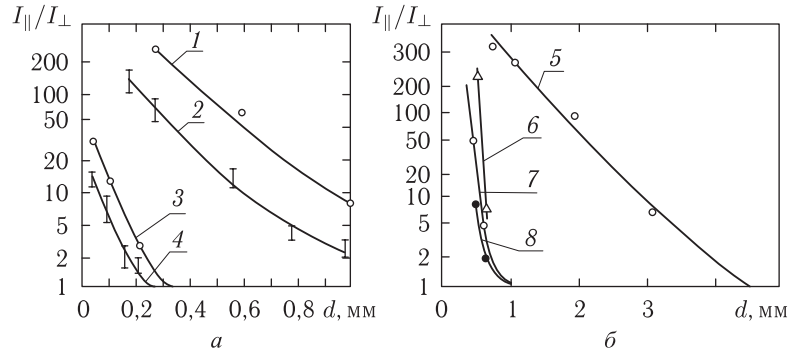


Рис. 2.14. Зависимости степени деполяризации лазерного излучения ($I_{\parallel} : I_{\perp}$) от глубины проникновения (d) в ткани мозга (а) и кровь (б) человека [667]. Излучение He-Ne-лазера с $\lambda = 632,8$ нм (1, 3, 5); Ar-лазера с $\lambda = 476/488/514$ (2, 4), с $\lambda = 514$ нм (6), с $\lambda = 488$ нм (7); с $\lambda = 476$ нм (8). 1, 2 — серое вещество мозга; 3, 4 — белое вещество мозга; 5–8 — цельная кровь (низкий гематокрит). (Измерения выполнены в пределах малого телесного угла (10^{-4} ср) вдоль оси лазерного пучка диаметром 1 мм. Для 6–8 наблюдается сильное влияние флуоресценции)

рассеяния $\mu'_s = \mu_s(1 - g)$, l_p должно существенно зависеть от параметра анизотропии рассеяния, что и демонстрируют приведенные выше экспериментальные данные [667] (см. рис. 2.14). Например, для крови параметр g наибольший среди многих типов биотканей ($g \approx 0,982 \div 0,995$) [682].

Отметим, что ослабление коллимированного света, в отличие от деполяризации, определяется полным коэффициентом затухания μ_t (см. (1.1)), который для многих тканей существенно больше μ_{tr} , поэтому возможны ситуации, когда нерассеянный свет (баллистические фотоны) уже не регистрируется, а первоначальная поляризация рассеянного вперед в некотором небольшом телесном угле света (фотоны с зигзагообразными траекториями) сохраняется. На рис. 2.15 представлена качественная диаграмма, характеризующая возможные режимы с сохранением или разрушением линейной поляризации в зависимости от размера частиц, составляющих биоткань, и их концентрации [666].

В работе [669] экспериментально установлено, что линейная поляризация сохраняется в пределах 2,5 транспортных длин l_{tr} ($P = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp}) = 0,1$). Например, для кожи, которая для красного и ближнего ИК-излучения имеет $\mu_a \cong 0,4$ см $^{-1}$ и $\mu'_s \cong 20$ см $^{-1}$, $l_{tr} \cong 0,48$ мм. Следовательно, свет может распространяться в коже на длине $\cong 1,2$ мм, сохраняя еще линейную поляризацию, такой путь в биоткани соответствует временной задержке порядка 5,3 пс, что позволяет получать поляризационные образы макронеоднородностей биоткани, эквивалентные таковым при селекции фотонов временными методами, описанными в предыдущих разделах. Важными достоинствами поляризационной визуализации является, помимо селекции диффузно рассеянных фотонов, возможность исключения зеркального отражения на поверхности биоткани [683, 684], например изменением угла облучения и приема отраженного излучения [669]. Кроме обнаружения макронеоднородностей, что можно получить и с помощью временных методов, появляется новая возможность регистрации двулучепреломления и оптической активности поверхностных слоев ткани, в частности кожи. В [683, 684] экспериментально продемонстрирована возможность визуализации микрососудов кожи лица с использованием поляризационного контрастирования.



Рис. 2.15. Схематическое представление областей существования режимов поляризации рассеянного света при облучении рассеивающей среды линейно поляризованным излучением

Информацию об оптических параметрах рассеивающей среды можно получить не только из исследований степени деполаризации предварительно поляризованного света, но также из исследований степени возникающей поляризации света у первоначально неполяризованного пучка света при его распространении в рассеивающей среде. В частности, в средах с крупномасштабными рассеивателями (часто встречающаяся модель биотканей) деполаризация является эффектом более высокого порядка малости ($\sim \vartheta^4$, $\vartheta < 1$), чем возникновение поляризации ($\sim \vartheta^2$) [171].

В слабо поглощающих средах с малоугловым многократным рассеянием для фазовой функции рассеяния типа Хензи–Гринштейна (см. (2.5)) степень линейной поляризации описывается следующей формулой [171]:

$$P = -\frac{(\mu'_s z)^4}{2\vartheta^2} \cdot \left[\sqrt{1 + \left(\frac{\vartheta}{\mu'_s z}\right)^2} - 1 \right]^2 \cdot \left[1 + \left(\frac{\vartheta}{\mu'_s z}\right)^2 \right]. \quad (2.60)$$

Отсюда следует, что в области очень малых углов $\vartheta \ll \mu'_s z$ степень поляризации не зависит от глубины:

$$P = -\vartheta^2/8, \quad (2.61)$$

а на крыльях индикатрисы рассеяния ($\vartheta \gg \mu'_s z$) степень поляризации стремится к значению

$$P = -\vartheta^2/2, \quad (2.62)$$

равному степени поляризации однократно рассеянного света.

Если характер преобразования вектора Стокса на каждом акте рассеяния известен, то можно найти состояние поляризации света после его многократного рассеяния в объемной среде, используя различные приближения теории многократного рассеяния [671, 674] или метод Монте-Карло [164, 671]. В частности, для малых частиц эффекты многократного рассеяния проявляются в нарушении соотношения симметрии для элементов МРС (см. (2.56)), $M_{12}(\vartheta) \neq M_{21}(\vartheta)$, $M_{33}(\vartheta) \neq M_{44}(\vartheta)$,

существенно снижается степень линейной поляризации рассеянного излучения при углах, близких к $\pi/2$ [674].

Согласно [671], для системы малых пространственно некоррелированных частиц степень линейной ($i = L$) и круговой ($i = C$) поляризации в дальней зоне света, прошедшего слой толщиной d и первоначально полностью поляризованного (линейно или по кругу), определяется соотношением

$$P_i \cong \frac{2d}{l_s} \operatorname{sh} \frac{l_s}{\xi_i} \cdot \exp\left(-\frac{d}{\xi_i}\right), \quad (2.63)$$

где $l_s = 1/\mu_s$,

$$\xi_i = \left(\zeta_i \cdot \frac{l_s}{3}\right)^{0,5} \quad (2.64)$$

— характеристическая длина деполаризации для слоя рассеивателей, $d \gg \xi_i$, $\xi_L = l_s/\ln(10/7)$, $\xi_C = l_s/\ln 2$.

Отсюда следует, что характеристическая длина деполаризации для падающего света с линейной поляризацией больше (в $\sqrt{2}$ раз), чем соответствующая длина для распространения света с сохранением круговой поляризации. Соотношения (2.63)

и (2.64) справедливы и для системы сферических частиц больших размеров (сравнимых с длиной волны, рассеяние Ми), если заменить l_s на транспортную длину $l_{tr} \equiv 1/\mu'_s$.

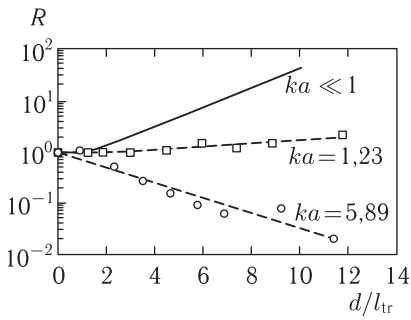


Рис. 2.16. Полулогарифмические графики отношения степени поляризации $R \equiv P_L/P_C$ в зависимости от d/l_{tr} для трех значений ka , $k = 2\pi/\lambda$. Сплошная линия соответствует рэлеевскому рассеянию ($ka \ll 1$). Пунктирные линии соответствуют согласованию экспериментальных данных с уравнением (2.63) при $l_s = l_{tr}$. Экспериментальные точки соответствуют измерениям для водных суспензий сферических частиц полистиролового латекса диаметром 0,22 мкм (\square) и 1,05 мкм (\circ), $\lambda_0 = 670$ нм [671]

в промежуточной области R постоянно, а в области рассеяния Ми R убывает. Такое поведение связано с переходом от изотропного однократного рассеяния к анизотропному. Качественно физическая причина разного характера деполаризации заключается в том, что наличие сильного обратного рассеяния (изотропное рассеяние) «не портит» линейную поляризацию, в то же время для круговой поляризации сильное обратное рассеяние эквивалентно смене характера поляризации на обратное (как отражение от зеркала), т. е. эквивалентно деполаризации, поэтому для сильно вытянутой индикатрисы однократного рассеяния (анизотропное рассеяние) степень круговой поляризации при распространении света в слое должна сохраняться дольше, чем линейной.

Таким образом, различные биоткани или одни и те же биоткани, но в различных патологических или функциональных состояниях (изменяются ka ($k = 2\pi/\lambda$, a — размер рассеивателя) и l_{tr}), должны демонстрировать разный отклик на зондирование светом с линейной и круговой поляризацией, что может быть использовано как в оптической медицинской томографии, так и при определении оптических и спектроскопических параметров биотканей.

2.6. Оптические свойства тканей глаза

2.6.1. Оптические модели тканей глаза. Здоровые биоткани переднего отрезка глаза, такие как роговица и хрусталик, являются исключительно прозрачными в видимой области спектра, что связано с отсутствием сильно поглощающих хромофоров и упорядоченной структурой этих тканей. Рассеяние также является важным при распространении света в тканях глаза. Размеры рассеивателей и расстояние между ними меньше или сравнимы с длиной волны видимого излучения, относительный показатель преломления вещества рассеивателей невелик («мягкие частицы»). Типичными моделями тканей глаза являются длинные диэлектрические круглые цилиндры (роговица, склера) или сферические частицы (хрусталик), распределенные в изотропном базовом веществе хаотически (склера, мутный хрусталик) или в соответствии с определенным законом (прозрачные роговица и хрусталик) [3, 5, 57, 166–168, 222, 224, 229, 234, 285–693]. Анализ светорассеяния в тканях глаза может быть выполнен на основе модели однократного рассеяния благодаря малому значению поперечного сечения рассеяния.

При неупорядоченном расположении рассеивателей результирующая интенсивность поля является суммой интенсивностей полей, рассеянных отдельными частицами. В случае упорядоченной системы рассеивателей необходимо складывать не интенсивности, а поля, т. е. учитывать интерференционные эффекты, возникающие в присутствии ближнего порядка рассеивателей. В интегральном виде индикатриса рассеяния для симметричного рассеяния частиц с парной корреляцией описывается выражением [3, 5, 10, 167, 168, 685–688]

$$I(\vartheta) = I_0(\vartheta) \left\{ 1 + \rho \int_0^{\infty} [g(r) - 1] \exp[i(\mathbf{S}_1 - \mathbf{S}_0)\mathbf{r}] d^3r \right\} = I_0(\vartheta)F, \quad (2.65)$$

где $I_0(\vartheta)$ — индикатриса рассеяния изолированной частицы; ϑ — угол рассеяния; ρ — плотность частиц; $g(r)$ — функция распределения рассеивающих центров (отношение локальной плотности к средней плотности рассеивающих центров (рис. 2.17), для невзаимодействующих центров $g(r) \rightarrow 1$); $\mathbf{S}_0, \mathbf{S}_1$ — единичные вектора для падающей и рассеянной волн; \mathbf{r} — радиус-вектор рассеивателя; d^3r — объем рассеивателя; F учитывает интерференционные эффекты.

Соотношение (2.65) справедливо для монодисперсной системы рассеивателей, и для его использования необходимо знать индикатрису рассеяния для одной частицы, $I_0(\vartheta)$, которая рассчитывается на основе теории Ми или соответствующих приближенных соотношений.

Для случайно распределенных в пространстве рассеивателей (например, модель склеры) полидисперсность может быть учтена достаточно просто с использованием гамма-распределения частиц по их радиусам (см. (1.19)) [222, 224].

Для упорядоченных биотканей, таких как прозрачная роговица и хрусталик, учет полидисперсности является сложной проблемой. В простейшем случае двухфазной системы рассеивателей выражение, аналогичное (2.65), может быть найдено с ис-

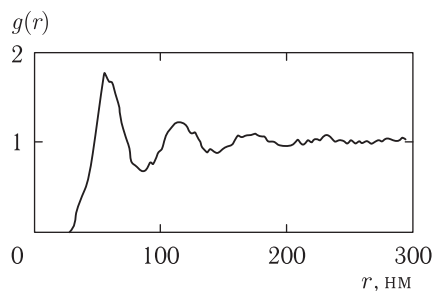


Рис. 2.17. Функция распределения рассеивающих центров стромы роговицы глаза кролика, восстановленная на основе обработки электронных микрофотографий срезов ткани [687, 688]

пользованием четырех структурных функций $g_{11}(r)$, $g_{22}(r)$, $g_{12}(r)$ и $g_{21}(r)$, которые характеризуют взаимодействие частиц одного и разных сортов [234]. Двухфазная система, состоящая из ансамбля одинаковых по размеру малых частиц и небольшой примеси крупных частиц, является хорошей моделью патологической ткани, например катарактального хрусталика.

Для системы длинных цилиндров интерференционный член F определяется выражением [686–688]

$$F = 1 + \rho \int_0^{\infty} J_0(\mathbf{S} \cdot \mathbf{r}) \cdot r[g(r) - 1]dr, \quad (2.66)$$

а для ансамбля сферических частиц аналогично имеем [5, 168]

$$F = 1 + 4\pi\rho \int_0^{\infty} r^2[g(r) - 1] \frac{\sin(\mathbf{S}r)}{(\mathbf{S}r)} dr, \quad (2.67)$$

где J_0 — функция Бесселя нулевого порядка; $|\mathbf{S}| = 2k \sin(\vartheta/2)$; $k = 2\pi n/\lambda_0$.

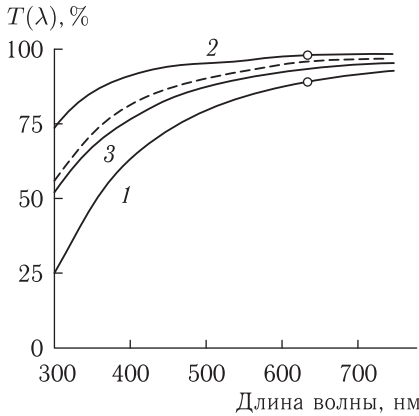


Рис. 2.18. Спектры коллимированного пропускания роговицы глаза человека: 1, 2 и 3 — расчетные спектры для двух ортогональных линейных поляризаций и неполяризованного света, 1 — свет поляризован вдоль фибрилл, расчет проведен для нормального падения света на поверхность роговицы и справедлив для периферической части роговицы, где фибриллы в слоях ткани имеют приблизительно одинаковую ориентацию. Толщина роговицы 0,46 мм, плотность рассеивателей $\rho = 3 \cdot 10^{10} \text{ см}^{-2}$. Пунктиром дан эксперимент для неполяризованного света, а кружочками показаны измерения для двух ортогональных поляризаций на $\lambda = 633 \text{ нм}$ [167]

2.6.2. Спектры пропускания и рассеяния. Интенсивность коллимированного света, проходящего через слой рассеивающей ткани со средней плотностью рассеивателей ρ и толщиной l , определяется соотношением

$$I = I_0 \exp(-\rho\sigma_s l), \quad (2.68)$$

где I_0 — интенсивность падающего пучка, а сечение рассеяния

$$\sigma_s = \frac{1}{\rho I_0} \int_{4\pi} I(\vartheta) d\Omega. \quad (2.69)$$

Спектры пропускания роговицы, рассчитанные на базе модели рассеяния монодисперсной системы упорядоченных ориентированных вдоль поверхности роговицы длинных диэлектрических цилиндров (фибрилл) с показателем преломления $n = 1,470$ и диаметром 26 нм, находящихся в базовом веществе ($n_0 = 1,345$), представлены на рис. 2.18. Видна анизотропия пропускания для линейно поляризованного излучения, а также сильное влияние рассеяния на пропускание роговицы в УФ-области спектра. Следует отметить, что расчет сделан без учета полос поглощения белков и воды в УФ-области спектра, которые, как и для всех типов живых тканей, для роговицы оказываются очень сильными (коэффициент поглощения равен 2700 см^{-1} на длине волны 193 нм и 210 см^{-1} на 248 нм, см. табл. 3.1) и, конечно, проявляются в длинноволновой части УФ-спектра пропускания роговицы, одна-

ко, как показывают расчеты и экспериментальные исследования, в этой области (300–400 нм) значительно влияние и рассеяния света.

Хрусталик не является столь прозрачной тканью, как роговица. В ближней УФ и видимой области спектра для хрусталика человека поглощение различными хромофорами, такими как связанный с белками триптофан, кинуренин (З-НKG) и возрастной белок, оказывается существенным [484]. Концентрация возрастного белка увеличивается с возрастом (этим определяется старческое пожелтение хрусталика), а пигмента З-НKG, наоборот, несколько уменьшается. В рассматриваемой модели однократного рассеяния поглощение учитывается путем введения комплексного показателя преломления [689]:

$$n(\lambda) = n' + in'' = n' + i(t \cdot n_t''(\lambda) + kn_k''(\lambda) + pn_p''(\lambda)), \quad (2.70)$$

где коэффициенты t , k и p характеризуют вклад в поглощение каждого из рассматриваемых хромофоров. Возрастные изменения оптических свойств хрусталика, кроме того, связаны с появлением фракции рассеивателей с увеличенными размерами и показателем преломления их материала. На рис. 2.19 представлены расчетные спектры коллимированного пропускания в модели «молодого» и «возрастного» хрусталика. Видны существенные различия в спектрах в коротковолновой части спектра.

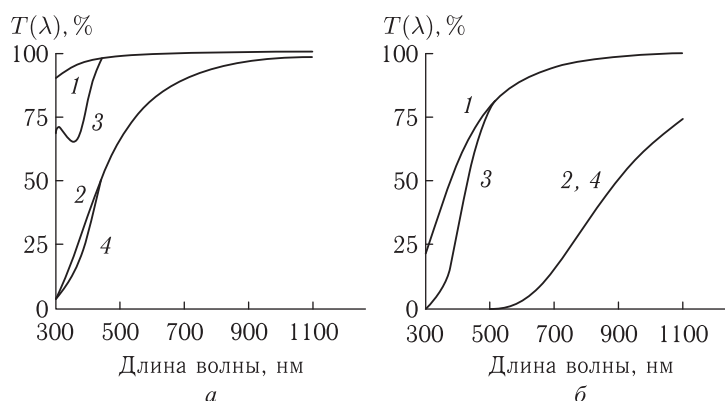


Рис. 2.19. Спектры коллимированного пропускания хрусталика, рассчитанные для упорядоченных (1, 3) и неупорядоченных (2, 4) рассеивателей (1, 2 — нет поглощения, 3, 4 — при наличии поглощения): а — модель молодого хрусталика (диаметр рассеивателей $d = 0,02$ мкм, $n = 1,43$, $t = 0,003$, $k = 0,005$, $p = 0$), б — модель возрастного хрусталика ($d = 0,04$ мкм, $n = 1,47$, $t = 0,003$, $k = 0,002$, $p = 0,015$), объемная плотность рассеивателей $w = 0,3$, $n_0 = 1,345$, толщина хрусталика 5 мм [689]

Экспериментальные спектры для полного пропускания (измерены с помощью интегрирующей сферы) изолированных возрастного и катарактального хрусталиков представлены на рис. 2.20 [690]. В данном случае спектры демонстрируют достаточно близкий характер, поскольку при таком способе измерений изменение рассеивающих свойств ткани зарегистрировать трудно, а изменения в спектрах следует отнести, в основном, на счет изменения характера поглощения, которое действительно более сильно проявляется для хрусталика с бурой катарактой.

Изменение состава рассеивателей и поглотителей с возрастом приводит к довольно существенным различиям также и в спектрах рассеяния. Результаты расчетов для обратного рассеяния и рассеяния под углом 90° качественно согласуются с экспериментальными данными (см., например, рис. 2.21) [229, 689–691].

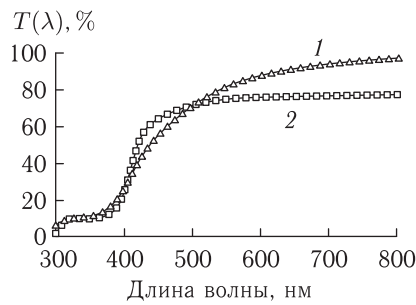


Рис. 2.20. Экспериментальные спектры полного пропускания изолированных хрусталиков человека: 1 — хрусталик в норме (56 лет); 2 — катарактальный хрусталик (88 лет). Измерения проведены на спектрофотометре с интегрирующей сферой [690]

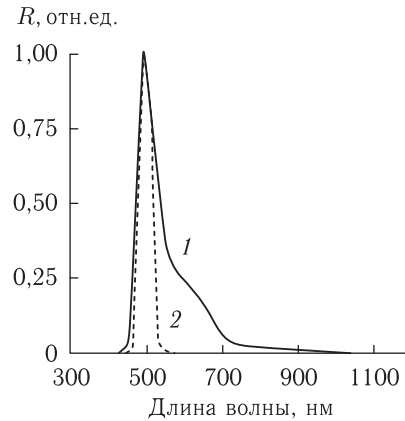


Рис. 2.21. Расчетный (1) и экспериментальный (2) спектры рассеяния хрусталика под углом 90° . Эксперимент взят из [691]. Расчет проведен для смеси упорядоченных малых частиц диаметром $d = 0,06$ мкм ($t = 0,003$, $k = p = 0,03$, $n_0 = 1,345$, $n_1 = 1,47$) с добавлением 1% крупных неупорядоченных частиц ($d = 0,6$ мкм, $t = k = 0$, $p = 0,1$, $n_0 = 1,345$, $n_1 = 1,55$) [229]

Возможность «просветления» мутной непрозрачной биоткани (склеры) и переход от режима многократного к режиму малократного рассеяния при замещении базового вещества ткани другим, с более высоким показателем преломления можно увидеть на рис. 2.22, 2.23 [223, 224]. Результаты моделирования методом Монте-Карло вполне удовлетворительно совпадают с экспериментальными данными [223, 224]. Для непрозрачной склеры показатель преломления фибрилл $n_c = 1,470$, а базового вещества $n_0 = 1,345$, толщина склеры ~ 1 мм. В качестве модели склеры была рассмотрена монодисперсная система случайно ориентированных в плоскостях, параллельных поверхности склеры, диэлектрических цилиндров (фибрилл) со средним диаметром цилиндров 100 нм.

2.6.3. Поляризационные свойства тканей глаза. Как уже было показано на примере биотканей с многократным рассеянием, распространение света в биотканях определяется не только коэффициентами рассеяния, поглощения и фазовой функцией рассеяния, но также поляризационными свойствами ткани, которые, в свою очередь, зависят от размеров, рефракции, морфологии, внутренней структуры и оптической активности материала рассеивателей [5, 27, 76, 217, 358, 570, 676, 694, 695]. Поляризационные свойства упруго рассеянного света описываются матрицей рассеяния (MPC) (матрицей Мюллера), каждый из 16 элементов которой зависит от длины волны, размеров, формы и материала рассеивателей (см. (2.56)).

Измерения элементов матрицы Мюллера достаточно прозрачных биологических тканей и жидкостей можно осуществить с помощью лазерного поляризационного нефелометра (ЛПН), используемого во многих исследованиях [3, 5, 10, 27, 76, 168, 674, 696–699]. Например, ЛПН, предложенный в [697] и подробно описанный в [5], использует принцип модуляции исходного лазерного пучка и демодуляции рассеянного излучения (преобразование модуляции поляризации в модуляцию интенсивности) с помощью вращающихся с определенными скоростями фазовых ($\lambda/4$) пластинок в падающем и рассеянном потоках. ЛПН обеспечивает измерение полной MPC в

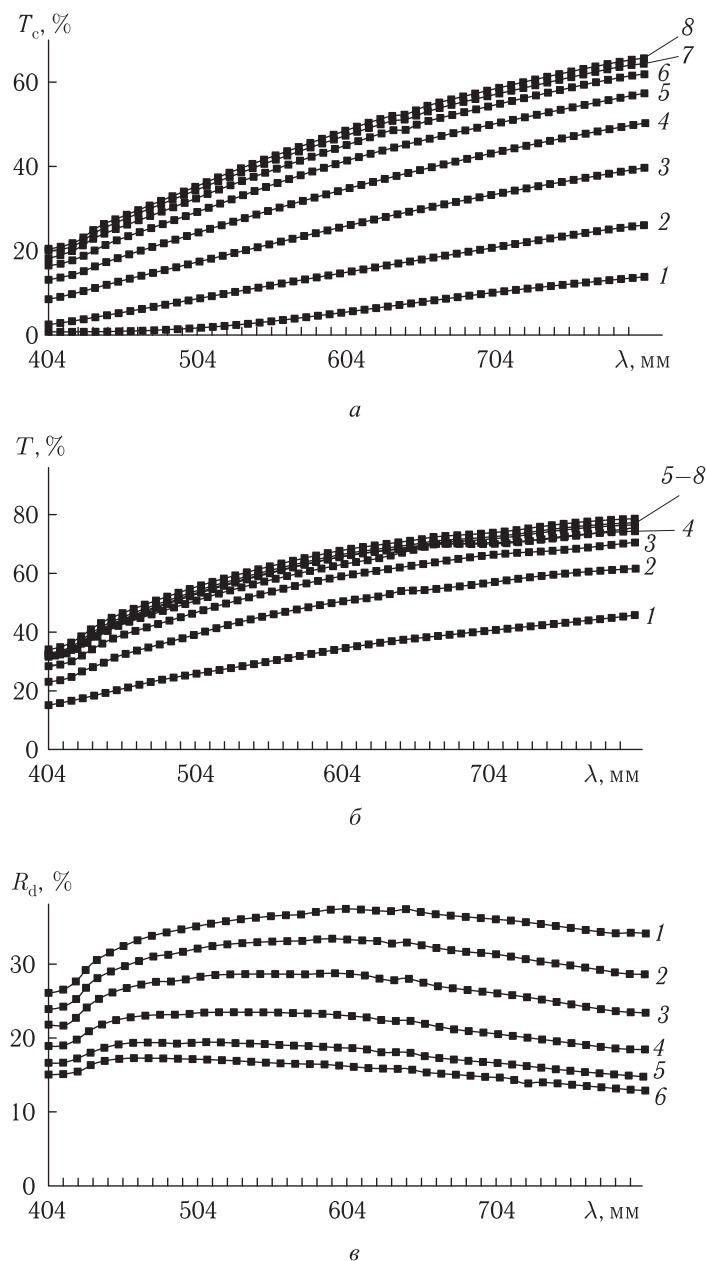


Рис. 2.22. Спектры коллимированного (*a*) и полного (*б*) пропускания, а также диффузного отражения (*в*) склеры, измеренные в процессе ее «просветления» с помощью раствора *тразографа* (60%): спектры 1 были измерены через 1 мин после помещения образца склеры в раствор, спектры 2–8 зарегистрированы последовательно, каждый через 2 мин (время регистрации одного спектра 85 с); толщина образцов: 0,6 мм (*a*); 0,7 мм (*б*); 0,7 мм (*в*), сильная пигментация ткани [223, 224]

диапазоне углов рассеяния $0-175^\circ$. Измерения проводятся на длине волны гелий-неонового лазера с $\lambda = 633$ нм. Скорости вращения фазовых пластинок устанавливаются исходя из требуемого быстродействия ЛПН и необходимости определения всех или нескольких элементов МРС. Для определения всех 16 элементов МРС соотношение скоростей вращения входной и выходной фазовых пластинок было выбрано равным 1 : 5. Быстродействие ЛПН (измерение 16 элементов матрицы для фиксированного угла рассеяния) составляет несколько секунд. Средняя точность измерений элементов матрицы оценивается на уровне 3–5%. В регистрирующей части установки используется фотоумножитель, работающий в режиме счета фотонов.

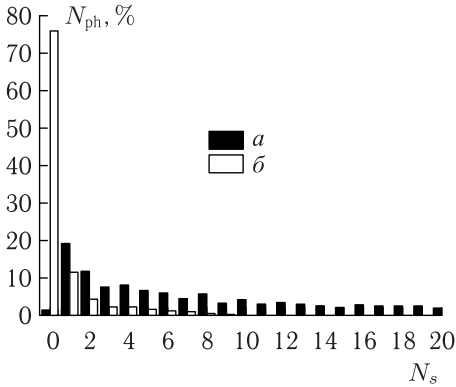


Рис. 2.23. Гистограммы распределения числа актов рассеяния N_s , которые испытывают фотоны, проходящие через склеру N_{ph} (% от общего числа): *a* — модель нормальной склеры, $n_0 = 1,345$; *b* — модель частично просветленной склеры, $n_0 = 1,410$; $n_c = 1,474$, $\lambda = 633$ нм [223, 224]

(за счет формирования конгломератов высокомолекулярных белков). Прозрачный хрусталик характеризуется монодисперсной системой рассеивателей малого диаметра. Мутный хрусталик содержит довольно большую фракцию более крупных рассеивателей.

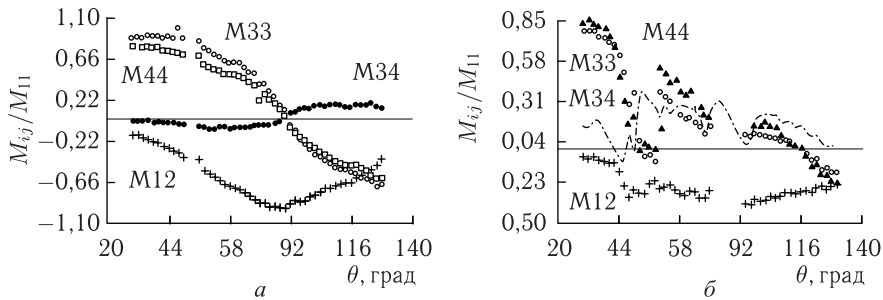


Рис. 2.24. Экспериментальные угловые зависимости для элементов МРС нормального (*a*) (возраст 56 лет, 5 ч после смерти) и катарактального (*б*) (возраст 88 лет, 5 ч после смерти) хрусталиков глаза человека [690]

Сравнение спектров пропускания (см. рис. 2.20) с угловыми зависимостями элементов МРС, измеренными на одной длине волны, показывает более высокую чувствительность последних к изменениям структуры рассеивающей среды, что дает возможность использовать измерения элементов МРС для ранней диагностики изменений структуры биоткани, связанных с появлением катаракты. Результаты прямых модельных экспериментов показаны на рис. 2.25 [10, 530, 697]. Измерения были выполнены для растворов α -кристаллинов (квазимонодисперсная фракция частиц

с диаметром около 0,02 мкм), выделенных из свежих хрусталиков телят (препарат α -кристаллина был предоставлен Дж. Клауваертом из Антверпенского университета, он же принимал участие в проведении эксперимента), и высокомолекулярных белков (средний диаметр около 0,8 мкм), выделенных из мутных хрусталиков [697]. Измерение угловых зависимостей элементов МРС позволяет надежно регистрировать появление крупнодисперсной фракции рассеивателей, что трудно сделать путем спектрофотометрических измерений, так как пропускание образца уменьшается всего на 1%. Итак, для ансамблей рассеивателей, содержащих небольшую фракцию сравнительно крупных частиц, метод матрицы рассеяния обладает необходимой чувствительностью, поэтому может служить основой для диагностики катаракты.

Лазерная поляризационная нефелометрия может быть использована для исследований *in vitro* различных тканей глаза, от роговицы до сетчатки. При увеличении быстродействия ЛПН, необходимого для исключения сенсорно-моторной реакции глазного яблока в процессе измерений, возможны и измерения *in vivo* для целого глаза с получением информации о структуре отдельных тканей, что позволит диагностировать не только катаракту, но и другие офтальмологические заболевания, в частности глаукому [700].

На примере исследований МРС глаз кролика было показано, что водянистая влага передней камеры глаза представляет собой прозрачное изотропное вещество, дающее небольшое рассеяние света (интенсивность рассеянного света не превышает 1,5–2% от интенсивности падающего), вызываемое растворенными в нем компонентами органического происхождения [696].

Исследования МРС стекловидного тела показали, что эта ткань, имея аморфную структуру, не изменяет поляризационных характеристик прямо прошедшего света, что дает возможность изучать поляризационные свойства глазного дна. С другой стороны, некоторые патологии стекловидного тела приводят к изменениям элементов МРС. В частности, небольшие внутриглазные кровоизлияния легко фиксируются за счет сильного рассеяния на эритроцитах крови [696].

Угловые зависимости элементов МРС монослоя дискообразных и сферулированных эритроцитов в зависимости от плотности их упаковки изучались авторами [170]. Было обнаружено влияние степени упаковки на угловую зависимость M_{11} в области углов рассеяния $\vartheta = 15\text{--}16^\circ$ как для дисков, так и для сфер. В диапазоне углов $\vartheta = 110\text{--}170^\circ$ угловые зависи-

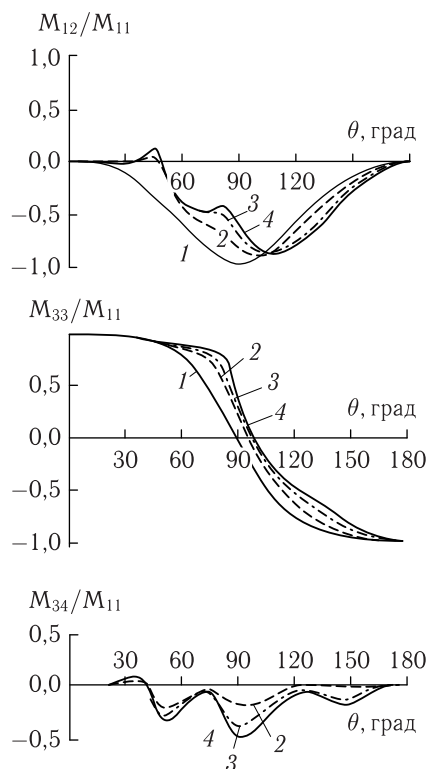


Рис. 2.25. Угловые зависимости элементов матрицы рассеяния для растворов α -кристаллина с фракцией крупных рассеивателей, экстрагированных из катарактального хрусталика, измеренные на длине волны $\lambda = 633$ нм. Относительная объемная концентрация α -кристаллина $w_1 = 0,3$, крупнодисперсной фракции — w_2 : 1 — $w_2 = 0$ ($T = 99\%$); 2 — $w_2 = 5 \cdot 10^{-5}$ ($T = 98\%$); 3 — $w_2 = 1,4 \cdot 10^{-4}$ ($T = 94\%$); 4 — $w_2 = 2,5 \cdot 10^{-4}$ ($T = 90\%$), T — пропускание раствора на $\lambda = 633$ нм, толщина слоя раствора 5 мм [697]

мости для M_{11} , M_{22} , M_{33} , M_{21} в большей степени зависят от формы рассеивателей, чем от их концентрации. Показана возможность определения показателя преломления эритроцитов на основе измерений величины элемента M_{12} для углов рассеяния $\vartheta \approx 140\text{--}160^\circ$. В [572] показана высокая чувствительность угловых зависимостей элементов МРС M_{11} и M_{12} к степени агрегированности эритроцитов в плазме крови.

Техника измерений МРС была также использована для исследований образования комплексов липосом с капсульным антигеном чумного микроба. Измерения показали, что для исходной суспензии липосом рассеиватели обладают оптической активностью, что подтверждается неравенством нормированных элементов M_{44} и M_{33} , отличием от нуля элементов M_{23} (M_{32}) и M_{13} (M_{31}) при достаточно точном выполнении равенств $M_{23} = -M_{32}$ и $M_{13} = -M_{31}$. В предположении монодисперсности систем рассеивателей с диаметром 0,03 мкм показатели преломления для лево- и право-циркулярно поляризованных волн следующие: $n_L = 1,39$ и $n_R = 1,41$. В то же время оптическая активность липосом возрастает при взаимодействии с антигеном чумного микроба (образование комплексов), измерения дают $n_L = 1,38$ и $n_R = 1,42$. Предложено использовать разницу в величинах элементов M_{33} и M_{44} для $\vartheta \leq 90^\circ$ в качестве оценки процентного содержания антигена в липосомах [10].

Применения измерений МРС для исследований суспензий различных частиц, включая спиральные головки сперматозоидов, несколько видов бактерий, описаны в [76, 358]. Регистрация элементов МРС перспективна и для более эффективного дифференцирования клеток крови в пролетной цитометрии [358, 359]. Эти измерения не так просты, поскольку амплитуды информативных элементов матрицы, таких как M_{34} , малы из-за случайной ориентации рассеивателей в прозрачных растворах.

Угловые зависимости нормированного элемента M_{34} для различных бактерий представляют собой осциллирующие функции (подобные представленным на рис. 2.25), положение максимумов которых очень чувствительно к изменениям размеров бактерий, что позволяет следить за их ростом [165, 701, 702].

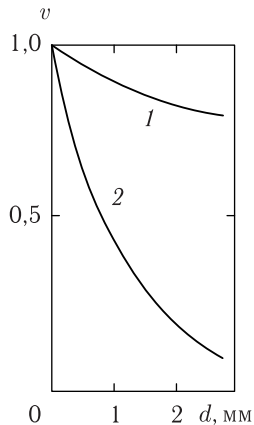


Рис. 2.26. Зависимость видимости интерференционной картины v от толщины прозрачного (1) и мутного (ядерная катаракта) (2) хрусталиков глаза человека. Измерения выполнены для постоянного расстояния между интерферирующими пучками (He-Ne-лазер с $\lambda = 632,8$ нм) [703]

Помимо угловых зависимостей для биотканей характерными являются спектральные и пространственные зависимости поляризационной анизотропии и оптической активности. Например, для роговицы глаза поляризационные характеристики соответствуют неидеальной фазовой пластинке и в значительной мере зависят от координаты [5]. В центре роговица близка к изотропной среде, а на краях ее анизотропия максимальна и возрастает с уменьшением длины волны (см. рис. 2.18). В результате в зависимости от азимута колебаний линейно поляризованного излучения пропускание роговицы в видимой области изменяется в пределах от 10 до 25% при уменьшении длины волны от 700 до 400 нм. Зубные ткани также обладают поляризационной анизотропией [191, 192].

Дифракционные и интерференционные явления достаточно широко используются в лазерной диагностике биотканей [1, 5, 175, 181–183, 703], поэтому важно знать влияние оптической неоднородности и упорядоченности биотканей на формировании картин дифракции и интерференции, образующихся при когерентном лазерном облучении. В качестве примера на рис. 2.26 показаны зависимости видимости интерфе-

ренционной картины, $v = (I_{\max} - I_{\min}) / (I_{\max} + I_{\min})$, образованной двумя когерентными точечными источниками, находящимися в рассеивающей среде, от толщины среды и степени ее мутности. Значительное снижение видности интерференционной картины, обусловленное вкладом рассеянного излучения, затрудняет применение лазерных интерферометров при диагностике ретиальной остроты зрения в условиях сплошной мутности хрусталика или при измерении скорости движения биочастиц в рассеивающей среде.

Прямое отношение к оптическим моделям тканей глаза имеет работа [704], в которой исследуется угловая структура излучения, рассеянного дисперсным слоем с высокой концентрацией оптически мягких частиц.

2.7. Особенности взаимодействия лазерного излучения с биотканями

2.7.1. Введение. В дополнение к уже отмеченным выше свойствам лазерного излучения, которые показали некоторые важные особенности взаимодействия излучения с биологическими тканями и клетками, например возможность получения коротких и сверхкоротких импульсов света или заданного состояния поляризации, обсудим те из них, которые связаны, в основном, с когерентностью лазерного излучения. Когерентность излучения важна для многих биомедицинских приложений, связанных с возможностью бесконтактных неинвазивных измерений и получения изображений, например скорости кровотока и лимфотока в сосудах и микроциркуляции крови в тканях. К ним относятся спекл-корреляционные методы анализа рассеянного когерентного света от движущихся клеток или компонентов ткани, интерферометрия лазерных спекл-полей, интерферометрия с использованием источников излучения с малой степенью временной когерентности, цифровая голографическая и фазовая микроскопия, а также методы на основе нелинейных преобразований когерентного излучения в биотканях (например, генерация второй гармоники) или преобразований лазерного излучения на нелинейных кристаллах для получения терагерцового излучения, которое, в свою очередь, тоже используется для спектроскопии и томографии биотканей.

Кратко остановимся на идеях, используемых в когерентной и конфокальной томографии и микроскопии. В когерентной томографии биотканей на сегодняшний день наиболее широко обсуждаются два подхода. Первый по своей сути очень близок к импульсной томографии, так как также основан на регистрации прямопрошедших фотонов. Однако селекция этих фотонов осуществляется за счет сохранения ими когерентности по отношению к падающему пучку путем оптического гетеродинамирования (интерференции), поэтому метод может регистрировать томограммы сравнительно протяженных (1–2 см) объектов и в непрерывном режиме [393–397]. Второй подход основан на селекции обратно рассеянных (отраженных) фотонов локальными неоднородностями биоткани за счет использования интерферометров с низкокогерентными источниками света (суперлюминесцентные светодиоды, фемто-секундные лазерные системы), однако их пространственная когерентность является высокой, что позволяет использовать одномодовые волоконно-оптические интерферометры [12, 16, 19, 21, 27, 29, 33, 106, 111–113, 116, 117, 125, 183, 432–438]. Такие томографы имеют рекордное пространственное разрешение, порядка 5–15 мкм, при низком уровне шумов и широком динамическом диапазоне, порядка 90–100 дБ. Область их применения — это тонкие (1–2 мм) сравнительно прозрачные ткани: кожа, ткани глаза (роговица, хрусталик, ретина и пр.), слизистые оболочки и т. п.

Сканирующая конфокальная микроскопия, использующая конфокальный принцип для селекции прошедших от заданного объема рассеянных фотонов (две оптически

сопряженные диафрагмы малых размеров в плоскости предметов и изображений), является основой развития одного из направлений в оптической томографии биотканей и клеток с субклеточным разрешением [1, 12, 13, 15, 19, 175, 439–446, 707]. Именно для конфокальной микроскопии в последнее время появились значительные результаты по 3D-визуализации живой ткани, в частности кожи, с разрешением, позволяющим распознавать различные типы клеток, а также одновременно наблюдать движущиеся клетки крови в микрососудах [442, 443]. Реализована также конфокальная томография твердых тканей зуба [444]. Однако конфокальные сканирующие микроскопы, используемые для получения томограмм биотканей, — это сравнительно дорогостоящие устройства, требующие принятия мер по защите от вибраций и высокого уровня компьютеризации. Отметим, что низкокогерентные томографы кроме принципа селекции «когерентных» фотонов используют одновременно конфокальный принцип, поэтому контраст изображения оказывается значительным даже при измерениях *in vivo*, кроме того они могут быть компактными, сравнительно недорогими устройствами. Сравнение двух методик визуализации — гетеродинной и конфокальной — дано в работе [446].

Для визуализации клеток и клеточных структур широко применяются голографическая интерферометрия [396–399, 708–713] и фазовая интерференционная микроскопия [714–718]. Эти методы используют высокостабильные лазеры и обеспечивают субклеточное разрешение вплоть до нанометров.

Приведенные в разделе 2.5 данные свидетельствуют о перспективности поляризационных методов для оптической томографии биотканей [12, 27, 652, 655–673, 675, 681, 683, 684, 700, 705, 706]. Получены, например, вполне обнадеживающие результаты по визуализации структуры зрительного нерва, что очень важно в ранней диагностике глаукомы [700].

Развитие нелинейной микроскопии и томографии, основанных на генерации гармоник и многофотонной флуоресценции в клеточных структурах при воздействии на них излучения фемтосекундного лазера ближнего инфракрасного диапазона, привело к революционным изменениям в технологии визуализации живых клеток, поскольку стал возможным, без применения каких бы то ни было специальных маркеров, продолжительный неразрушающий мониторинг живых клеток и тканей в их естественных физиологических условиях [15, 20, 260–269, 719–739]. В настоящее время оптическая биопсия с использованием нелинейной микроскопии дает зачастую гораздо лучшие изображения, чем гистологические срезы, сделанные при стандартной биопсии [738]. Важно, что повышая на три порядка интенсивность в импульсе фемтосекундного лазера в нелинейном микроскопе, его уже можно использовать как прецизионный наноразмерный оптический скальпель для проведения тонких операций на клетке без повреждений окружающих структур. Это так называемая тераностика (терапия/диагностика), когда в рамках одной технологии сначала проводится диагностика (нахождение патологии при использовании излучения лазера меньшей интенсивности), а затем путем простого повышения интенсивности импульса того же лазера производится воздействие, например разрезание митохондрии или хромосомы [737]. Такая процедура может быть использована для оптической чистки клеточных кластеров [739] и оптической трансфекции клеток (см. табл. 1.10 [424]).

2.7.2. Формирование спеклов и интерферометрия рассеивающих сред. Статические и динамические спекл-структуры (поля) формируются в результате интерференции большого числа элементарных волн со случайными фазами, возникающими при отражении когерентного света от неподвижной или движущейся шероховатой поверхности биоткани или при его прохождении через рассеивающую свет биоткань, в том числе и с движущимися рассеивателями, например клетками крови или

лимфы [12, 13, 19, 27, 31, 78, 104, 105, 114, 128, 176, 181, 182, 400, 403–408, 430, 431, 577, 672, 673, 739–756]. Спеклы (по-русски, пятна) представляет собой результат трехмерной интерференции в каждой точке пространства, где встречаются прошедшие или отраженные от оптических неоднородностей волны. В общем случае существует два типа спеклов: субъективные спеклы, которые получаются в пространстве изображений оптической системы (включая глаз), и объективные спеклы, которые формируются в свободном пространстве и обычно наблюдаются на экране (ПЗС-матрице), расположенном на некотором расстоянии от объекта. Поскольку практически все биоткани, включая даже такие прозрачные как роговица глаза, оптически неоднородны (см. раздел 2.6), то освещение их когерентным светом всегда вызывает появление спекл-структур (рис. 2.27, цветная вклейка), которые либо искажают результаты измерений и, следовательно, должны быть устранены, либо несут новую информацию о структуре и движении ткани и ее компонентов, и тогда могут быть использованы в биомедицинской диагностике.

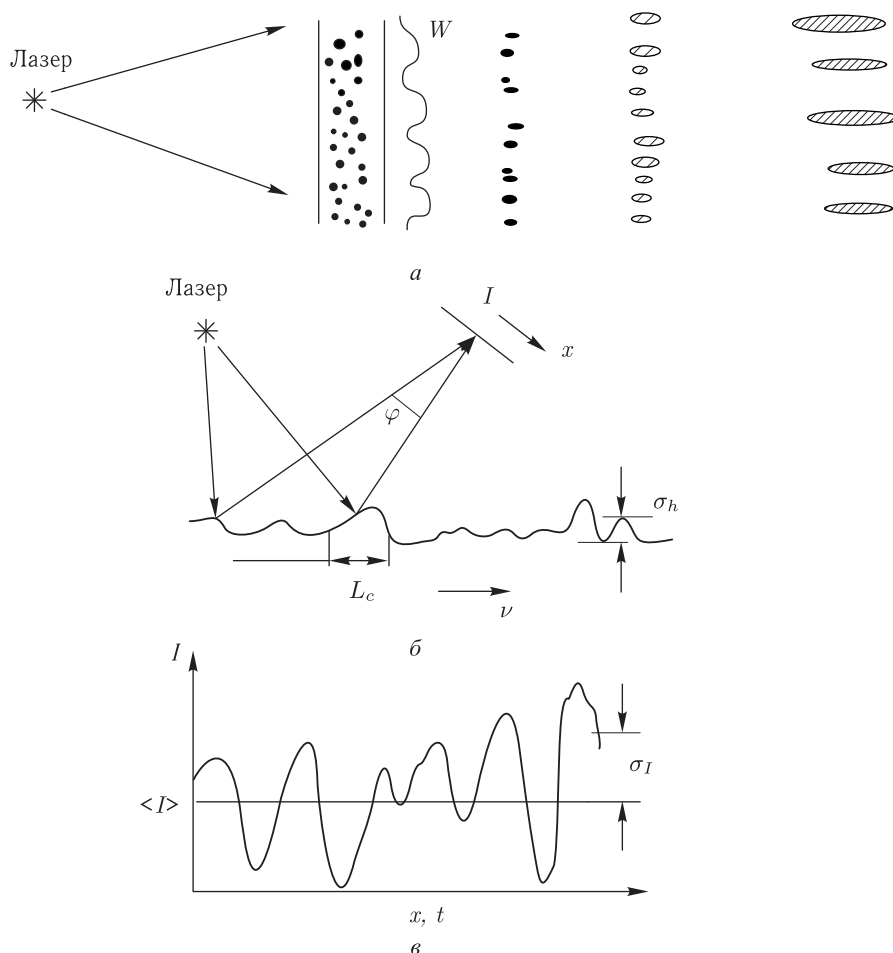


Рис. 2.28. Формирование и распространение спеклов (а), наблюдение спеклов (б) и модуляция интенсивности (в); W — рассеянная волна [12]

Принципы формирования и распространения спекл-полей, формируемых при взаимодействии когерентного света с оптически неоднородной средой, схематически иллюстрирует рис. 2.28. Средний размер спеклов в дальней зоне поля оценивается как $d_{av} \sim \lambda/\varphi$, где λ — длина волны, а φ — угол наблюдения. Смещение точки наблюдения по экрану (x) или сканирование лазерного пучка по объекту с некоторой скоростью v (или эквивалентное движение самого объекта относительно лазерного пучка), при котором точка наблюдения остается неподвижной, приводит к возникновению пространственных или временных флуктуаций интенсивности рассеянного поля. Эти флуктуации характеризуются средним значением интенсивности $\langle I \rangle$ и стандартным отклонением σ_I (см. рис. 2.28, б). Сам объект характеризуется стандартным отклонением σ_n высоты неоднородностей и длиной корреляции L_c этих неоднородностей.

Поскольку многие биоткани и клетки являются фазовыми объектами [105, 176], то распространение когерентных пучков в них можно описывать в рамках модели случайного фазового экрана (СФЭ) [174]. Амплитудный коэффициент пропускания СФЭ дается выражением

$$t_s(x, y) = t_0 \exp\{-i\Phi(x, y)\}, \quad (2.71)$$

где t_0 — не зависящее от координат амплитудное пропускание; $\Phi(x, y)$ — случайный фазовый сдвиг, вносимый СФЭ в точке (x, y) за счет вариаций показателя преломления $n(x, y)$ или толщины СФЭ $h(x, y)$. Для тонких пропускающих и отражающих СФЭ фазовые сдвиги определяются, соответственно, следующими соотношениями:

$$\Phi(x, y) = \frac{2\pi}{\lambda}[n(x, y) - 1]h(x, y), \quad (2.72)$$

$$\Phi(x, y) = \frac{4\pi}{\lambda}h(x, y). \quad (2.73)$$

Фазовые флуктуации рассеянного поля характеризуются стандартным отклонением σ_φ и длиной корреляции L_φ . Два предельных типа СФЭ — это слабо рассеивающие СФЭ ($\sigma_\varphi^2 \ll 1$) и глубокие СФЭ ($\sigma_\varphi^2 \gg 1$).

При описании статистических свойств спеклов в зависимости от решаемых задач можно использовать статистику первого или второго порядка. Статистика первого порядка описывает свойства спекл-полей в каждой точке. Такое описание обычно использует функцию распределения вероятности (ФРВ) интенсивности $p(I)$ и контраст

$$V_I = \frac{\sigma_I}{\langle I \rangle}, \quad (2.74)$$

где $\sigma_I^2 = \langle I^2 \rangle - \langle I \rangle^2$, а $\langle I \rangle$ и σ_I^2 — средняя интенсивность и дисперсия флуктуаций интенсивности соответственно.

Для идеальных условий, когда комплексная амплитуда рассеянного света имеет гауссову статистику, контраст $V_I = 1$ (развитые спеклы), и ФРВ интенсивности есть экспонента с отрицательным показателем [758]:

$$p(I) = \frac{1}{\langle I \rangle} \exp\left(-\frac{I}{\langle I \rangle}\right). \quad (2.75)$$

В соответствии с этим распределением наиболее вероятное значение интенсивности спеклов равно нулю, т. е. деструктивная интерференция происходит с большей вероятностью.

ФРВ интенсивности, описываемая выражением (2.75), соответствует интерференции поляризованного света, когда поляризация спеклов сохраняется неизменной и соответствует поляризации падающего света, т. е. объект не деполаризует рассеянный свет [13]. Материалы, в которые свет мало проникает и рассеяние происходит

в основном с поверхности или преобладает однократное рассеяние в объемной среде, в общем случае создают спекл-поля с распределением интенсивности, соответствующим (2.75). С другой стороны, в средах с многократным рассеянием, что характерно для многих биологических тканей, интерферирующий свет деполяризуется [27]. В условиях многократного рассеяния спекл-поля могут иметь ФРВ интенсивности, существенно отличающуюся от формы (2.75) и обычно представляемую в терминах некогерентной комбинации двух спекл-полей [13]:

$$p(I) = 4 \frac{I}{\langle I \rangle^2} \exp\left(-\frac{2I}{\langle I \rangle}\right). \quad (2.76)$$

Действие спекл-интерферометров основано на интерференции двух спекл-полей [19]. Спеклы могут интерферировать как когерентно, так и некогерентно. В случае когерентной комбинации статистические свойства результирующего третьего спекл-поля остаются принципиально теми же, что и у двух исходных полей, и в типичном случае описываются выражением (2.75). Однако при описании ФРВ интенсивности спекл-полей от большинства биологических тканей более подходящим оказывается соотношение (2.76). Причина состоит в следующем: когерентный свет, рассеянный тканью, создает случайным образом поляризованные спекл-структуры, и любые две ортогонально поляризованные компоненты рассеянного света некогерентны друг другу. Таким образом поляризованные случайным образом отдельные спекл-структуры можно рассматривать как некогерентную комбинацию двух или более спекл-структур.

Частично развитые спекл-поля характеризуются контрастом $V_I < 1$. Контраст может быть ниже единицы по следующим причинам:

- 1) если к спекл-полю добавляется однородный когерентный фон, например, в случае слабой неоднородности сильная зеркальная (нерассеянная) компонента когерентного пучка интерферирует со спекл-полем, очевидно, что в предельном случае однородной среды спеклы исчезают, $V_I = 0$;
- 2) если появляется однородный некогерентный фон (например, из-за снижения когерентности источника света или многократного рассеяния в среде).

Для гауссовой статистики и гауссовой корреляционной функции фазовых флуктуаций распространение интенсивности спекл-поля в свободном пространстве вдоль оси z за СФЭ описывается выражением [174]

$$\sigma_I^2(z) = \frac{\sigma_\varphi^2}{2} \left(1 + \frac{1}{1 + D^2}\right), \quad (2.77)$$

где $D = z\lambda/\pi L_\varphi^2$ — волновой параметр. Для слабо рассеивающего СФЭ ($\sigma_\varphi^2 \ll 1$) контраст спекл-поля (2.74) всегда меньше единицы. Для глубокого СФЭ ($\sigma_\varphi^2 \gg 1$) контраст достигает своего максимума в зоне дифракции Френеля ($D \cong 1$), когда $z_{\max} = (2\pi/\lambda)(L_\varphi^2/\sigma_\varphi)$, $V > 1$. Тот факт, что контраст выше единицы означает, что темные области доминируют в спекл-структуре. Появление максимума флуктуаций интенсивности объясняется фокусировкой рассеянных волн за СФЭ [13, 19, 400]. В зоне дифракции Фраунгофера имеем $V_I \rightarrow 1$.

Статистика второго порядка показывает, насколько быстро меняется интенсивность от точки к точке пространства и времени, т. е. она характеризует размер и распределение размеров спеклов в структуре или временные флуктуации интенсивности для динамических спеклов от движущихся неоднородностей. Статистика второго порядка обычно описывается с помощью автокорреляционной функции флуктуаций интенсивности

$$g_2(\Delta\xi) = \langle I(\xi + \Delta\xi)I(\xi) \rangle \quad (2.78)$$

и ее фурье-образа, представляющего спектр мощности случайного процесса, $\xi \equiv x$ или t — пространственная или временная переменная; $\Delta\xi$ — ее изменение; угловые скобки $\langle \rangle$ означают усреднение по ансамблю или по времени.

В общем случае из-за значительного вклада объемного рассеяния при отражении или прохождении лазерного излучения через биоткань формируются частично развитые спекл-поля со сравнительно малым размером спеклов, контрастом, отличным от единицы, и случайной поляризацией света в отдельных спеклах. Все это делает описание сигнала двухлучевого спекл-интерферометра, в котором в одном из плеч находится исследуемый объект, довольно сложным. Тем не менее, главные черты интерференции такого интерферометра можно выявить при анализе простейшего случая, когда спекл-поля сохраняют линейную поляризацию. Распределение интенсивности на выходе такого двухлучевого интерферометра спекл-интерферометра можно записать в виде [407, 759]

$$I(r, t) = I_r(r) + I_s(r) + 2[I_r(r)I_s(r)]^{1/2}|\gamma_{11}(\Delta t)|\cos\{\Delta\Phi_I(r) + \Delta\Psi_I(r) + \Delta\Phi_I(t)\}, \quad (2.79)$$

где $I_r(r)$ и $I_s(r)$ — распределения интенсивности опорного и сигнального поля, соответственно; r — поперечная пространственная координата; $\gamma_{11}(\Delta t)$ — степень временной когерентности света; $\Delta\Psi_I(r)$ — детерминированная разность фаз интерферирующих волн; $\Delta\Phi_I(r) = \Phi_{I_r}(r) - \Phi_{I_s}(r)$ — случайная разность фаз; а $\Delta\Phi_I(t)$ — зависящая от времени разность фаз, связанная с движением объекта. В частности, для продольных гармонических колебаний одного из зеркал (объекта) с амплитудой l_0 и частотой Ω_v , $\Delta\Phi_I(t) = (4\pi/\lambda)l_0 \sin(\Omega_v t)$.

При отсутствии спекл-модуляции детерминированная разность фаз $\Delta\Psi_I(r)$ отвечает за формированием регулярных интерференционных полос. Выходной сигнал спекл-интерферометра максимален, когда интерферирующие поля согласованы по фазе ($\Delta\Psi_I(r) = \text{const}$ в пределах апертуры приемника), при этом используются сфокусированные лазерные пучки (поскольку формируются спеклы максимального размера) и приемник интерференционного сигнала с максимально возможной площадью. Для фотоприемника большой апертуры, который в основном усредняет амплитудно-фазовые пространственные вариации интерференционного поля, глубина модуляции фотоэлектрического сигнала интерферометра с сфокусированными пучками описывается следующими простыми соотношениями [759]:

$$\beta = \left| \frac{\sin(u)}{u} \right|, \quad u = \pi(\text{NA})^2 \frac{\Delta z}{\lambda}, \quad (2.80)$$

где (NA) — числовая апертура объектива в объектном плече спекл-интерферометра, Δz — продольное смещение объекта.

Пространственно-модулированные лазерные пучки, полученные путем регулярной интерференции, довольно широко используются в биомедицинских исследованиях, например в лазерной анемометрии биологических жидкостей, цитометрии, в исследованиях седиментации крови, ретинометрии [5, 12, 13, 19, 388, 760–763]. Одни методы используют малые расстояния между интерференционными полосами, $\Lambda_I = \lambda/2\vartheta_I$ (ϑ_I — угол между волновыми векторами интерферирующих полей), которые сравнимы с размерами неоднородностей рассеивающего объекта. В этом случае удается, например, измерить скорость клетки, пролетающей пространственно-модулированным пучком, поскольку пространственная модуляция света дает возможность зафиксировать координату клетки при пересечении интерференционных полос.

С другой стороны, использование модулированных пучков с большими расстояниями между полосами интерференции, существенно превосходящими размеры неод-

нородностей, приводит к проявлению новых корреляционных эффектов в рассеянном поле [12, 13, 19, 760–763]. Интерференционные полосы средней интенсивности, возникающие в этом случае, имеют контраст $V_I(z)$, меняющийся вдоль оси распространения света z за счет эффекта пространственной фильтрации рассеянного излучения. Если диаметр пучка и расстояние между полосами достаточно велики, полосы модулируют спекл-поле и эволюция контраста полос средней интенсивности вдоль оси z определяется статистическими параметрами объекта и расстоянием между полосами.

Интерференционные полосы средней интенсивности регистрируются фотоприемником со щелью, ориентированной вдоль полос. Широкая апертура используется для усреднения спекл-модуляции рассеянного поля. Глубина модуляции фотоэлектрического сигнала равна относительному контрасту интерференционных полос [760–762]:

$$\frac{V_I(z)}{V_{I0}} = |\mu(z)|, \quad (2.81)$$

где $V_I(z)$ — контраст полос средней интенсивности, V_{I0} — контраст в исходном лазерном пучке, а $|\mu(z)|$ — модуль коэффициента поперечной корреляции комплексной амплитуды рассеянного поля.

В биомедицинских приложениях находит применение схема со сфокусированными пучками, когда пространственно-модулированный пучок света фокусируется с помощью дифракционно-ограниченной оптической системы с апертурой $D > \Lambda_I$ (рис. 2.29, цветная вклейка). В этом случае в области фокусировки формируется два пространственно разделенных световых пятна. Поскольку освещаются две различные области объекта, взаимодействие указанных световых пятен с рассеивающей средой порождает две совершенно разные (некоррелированные) спекл-составляющие дифракционного поля. Если расстояние между интерференционными полосами удовлетворяет неравенству $\Lambda_I < d_{av}$ (средний размер спеклов в плоскости наблюдения), то диаметр перетяжки пучка удовлетворяет неравенству $2w_0 > L_\varphi$. В такой ситуации в пределах каждого спекла наблюдаются регулярные интерференционные полосы, ориентированные случайным образом от спекла к спеклу. Контраст полос зависит в этом случае только от соотношения между интенсивностями интерферирующих полей и не зависит от статистических свойств объекта. Если $\Lambda_I > d_{av}$ и $2w_0 > L_\varphi$, в рассеянном поле полосы не видны (или сильно искажены за счет рассеяния на неоднородностях) (рис. 2.29, в). Однако, когда объект (или пучок света) движется в поперечном направлении, появляется набор полос средней интенсивности (см. рис. 2.29, г). Контраст этой картины определяется статистическими свойствами объекта.

Метод спеклов для изучения случайных фазовых объектов с использованием пространственно модулированного пучка дает возможность определять такие статистические параметры объекта, как стандартное отклонение σ_φ и длина корреляции L_φ фазовых флуктуаций [12, 13, 19, 760–763]. Этот метод можно использовать для изучения тонких слоев эпидермиса человека, более толстых прозрачных биотканей переднего сегмента глаза человека (роговицы и хрусталика) и склеры в процессе оптического просветления (увеличенной прозрачности) в условиях механических и осмотических напряжений [12, 19, 22, 761–763].

Например, клинические испытания на 238 пациентах показали хорошие возможности метода при исследовании ретиальной остроты зрения при наличии у пациентов катаракты разной степени тяжести (мутности), что позволило надежно прогнозировать результат хирургического вмешательства при операциях на хрусталике [763]. Поскольку интерференционная картина усредняется при сканировании сфокусированного лазерного пучка, то даже пациенты с мутным (катаракта) хрусталиком

могут видеть интерференционные полосы (см. рис. 2.29, б–г), что дает возможность определять остроту зрения отдельно ретины даже при наличии помутнений хрусталика.

2.7.3. Динамическое рассеяние света

2.7.3.1. Квазиупругое рассеяние света, принципы доплеровской спектроскопии. Рассеяние света от подвижных объектов называется динамическим рассеянием, в отличие от рассеяния от неподвижных объектов, которое называется статическим или упругим, поскольку происходит без изменения энергии. Напротив, при рассеянии на подвижном объекте происходит, хотя и небольшое, но заметное изменение энергии, поэтому динамическое рассеяние часто называют квазиупругим рассеянием. В основе квазиупругого рассеяния лежит эффект Доплера, который и определяет сдвиг частоты рассеянного света в соответствии с известным соотношением [577]

$$\Delta\nu_D = (\nu_s - \nu_0) = \nu_0 \frac{v}{c} (\cos \vartheta_i - \cos \vartheta_s), \quad (2.82)$$

где ν_s — частота рассеянной волны, ν_0 — частота падающей волны, v — скорость движения рассеивателя, c — скорость света, ϑ_i — угол между вектором падающего на объект излучения и направлением движения объекта, ϑ_s — угол между направлением движения объекта и наблюдением рассеянного излучения.

Доплеровский сдвиг пропорционален скорости рассеивающей свет частицы. Измерение этого сдвига и соответствующих углов ϑ_i и ϑ_s позволяет определять скорость движения частицы или потока частиц. В этом заключается идея доплеровских измерителей скорости. Однако во многих случаях, в том числе и для живых объектов, имеет место набор скоростей движения частиц и их направлений. Поэтому при измерениях определяется не одна частота, а спектр доплеровских частот, по которому можно, в принципе, восстановить распределение частиц по скоростям и направлениям движения. Такие измерения уже называются доплеровской спектроскопией или спектроскопией квазиупругого рассеяния, или фотонно-корреляционной спектроскопией, что отражает фундаментальную связь между спектром флуктуаций интенсивности и автокорреляционной функцией случайного процесса, обусловленного доплеровскими сигналами от многих рассеивателей [5, 12, 13, 19, 577, 764].

На практике доплеровский сдвиг частоты для сравнительно малых скоростей микроциркуляции крови не может быть измерен непосредственно, поскольку он очень мал по сравнению с частотой света. Например, для типичной скорости кровотока в 1 см/с сдвиг частоты не превышает 100 кГц. Традиционные спектральные методы не могут обеспечить такие измерения. Однако в случае использования лазеров и техники оптического смещения (гетеродинамирования или самобиений) это возможно. Поскольку ток фотодетектора пропорционален интенсивности, то оптическое смещение на приемнике компонентов электрического поля рассеянного света может быть описано с помощью автокорреляционной функции интенсивности, которая в случае гауссовой статистики связана с автокорреляционной функцией первого порядка формулой Зигерта:

$$g_2(\tau) = \langle I(t)I(t+\tau) \rangle = A\{1 + \beta_{sb}|g_1(\tau)|^2\}, \quad (2.83)$$

где τ — время задержки, $A = \langle i \rangle^2$ — квадрат среднего значения фототока или базовая линия автокорреляционной функции, β_{sb} — параметр эффективности самобиений, $\beta_{sb} \approx 1$, а

$$g_1(\tau) = \frac{\langle E(t)E^*(t+\tau) \rangle}{\langle |E(t)|^2 \rangle} \quad (2.84)$$

— нормированная автокорреляционная функция оптического поля.

Для монодисперсной системы броуновских частиц имеем

$$g_1(\tau) = \exp(-\Gamma_T \tau), \quad (2.85)$$

где $\Gamma_T = q^2 D_T$ — параметр релаксации, $D_T = k_B T / 6\pi\eta r_h$ — коэффициент трансляционной диффузии, k_B — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура, η — абсолютная вязкость среды, а r_h — гидродинамический радиус частицы. Многие биологические системы характеризуются бимодальным распределением коэффициента диффузии, когда быструю диффузию (D_{Tf}) можно отделить от медленной диффузии (D_{Ts}), связанной, например, с агрегацией частиц [5, 764].

Целью спектроскопии квазиупругого рассеяния является реконструкция распределения рассеивающих частиц по размерам, что необходимо для диагностики и мониторинга заболеваний. Реализация режима однократного рассеяния и использование источников когерентного света в этом случае имеют принципиальное значение.

2.7.3.2. Динамические спеклы, спекл-корреляционный метод. Лазерный спекл-корреляционный метод основан на исследовании пространственно-временных свойств динамических спекл-полей [12, 13, 19, 577, 758, 765–768]. Если рассеиватели движутся случайно, т.е. имеет место броуновское движение рассеивающих частиц, то формируемые при этом оптические спеклы подчиняются гауссовой статистике. В этом случае пространственно-временная корреляционная функция комплексной амплитуды рассеянного света может быть факторизована и представлена в виде произведения пространственной и временной корреляционных функций. Однако в случае рассеивающей среды, удовлетворяющей модели движущегося глубокого случайного фазового экрана (СФЭ) ($\sigma_\varphi^2 \gg 1$), пространственные и временные флуктуации не являются независимыми [765–768].

Следуя работам [577, 765], рассмотрим пространственно-временные свойства динамических спеклов, которые формируются при рассеянии гауссова (лазерного) пучка на движущемся СФЭ. Рассеивающий объект, содержащий большое число случайным образом распределенных рассеивающих центров, движется в плоскости со скоростью \mathbf{v} (рис. 2.30). В предположении, что флуктуации фазы подчиняются гауссовой статистике и вариации фазы рассеянного света, выраженные в масштабе оптической длины пути, много больше длины волны излучения, выражения (2.83) и (2.84) могут быть обобщены для учета пространственной корреляции. Тогда нормированная пространственно-временная корреляционная функция стационарного процесса может быть записана как [765]:

$$g_2(\mathbf{r}, \tau) = \frac{\langle I_1 I_2 \rangle}{\langle I_1 \rangle \langle I_2 \rangle} = 1 + |g_1(\mathbf{r}, \tau)|^2, \quad (2.86)$$

где

$$g_1(\mathbf{r}, \tau) = \frac{\langle E_1 E_2^* \rangle}{(\langle E_1 E_1^* \rangle \langle E_2 E_2^* \rangle)^{1/2}} \quad (2.87)$$

— пространственно-временная корреляционная функция комплексной амплитуды рассеянного поля; $\mathbf{r} = \mathbf{X}_1 - \mathbf{X}_2$ (см. рис. 2.30), $\tau = t_1 - t_2$.

В случае нормального падения гауссова пучка на движущийся перпендикулярно пучку СФЭ с перетяжкой пучка, расположенной на расстоянии z от плоскости экрана (рис. 2.30), радиус лазерного пучка на экране w и кривизна волнового фронта на

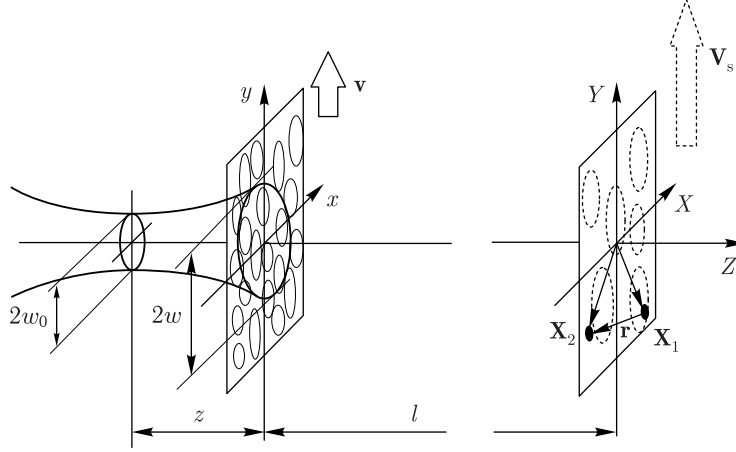


Рис. 2.30. Рассеяние лазерного гауссова пучка диаметром $2w$ на движущемся со скоростью \mathbf{v} случайном фазовом экране (СФЭ), расположенном в плоскости (xy) перпендикулярно лазерному пучку; (XY) — плоскость наблюдения динамических спеклов, отнесенная на расстояние l от СФЭ [577]

объекте ρ определяются следующими соотношениями:

$$w = w_0 \left[1 + \left(\frac{z}{a} \right)^2 \right]^{1/2}, \quad (2.88)$$

$$\rho = z \left[1 - \left(\frac{a}{z} \right)^2 \right], \quad (2.89)$$

где $a = \pi w_0^2 / \lambda$, w_0 — размер лазерного пучка в перетяжке.

В этом случае нормированная пространственно-временная корреляционная функция интенсивности рассеянного света в плоскости наблюдения, расположенной на расстоянии l от плоскости объекта, определяется соотношением [765]

$$g_I(\mathbf{r}, \tau) - 1 = \exp \left(-\frac{|\mathbf{v}|^2 \tau^2}{w^2} \right) \exp \left(-\frac{1}{r_s^2} \left| \mathbf{r} - \left(1 + \frac{l}{\rho} \right) \mathbf{v} \tau \right|^2 \right), \quad (2.90)$$

где $r_s = 2l / (k_0 w)$ — средний размер спекла в плоскости наблюдения, $k_0 = 2\pi n / \lambda$ — волновое число падающего излучения, \mathbf{v} — скорость перемещения СФЭ. Как следует из уравнения (2.90), спеклы перемещаются в плоскости наблюдений со скоростью

$$\mathbf{V}_s = \frac{\mathbf{r}}{\tau} = \left(1 + \frac{l}{\rho} \right) \mathbf{v}. \quad (2.91)$$

Хорошо известно, что движение динамических спеклов происходит в двух различных режимах, а именно если спеклы движутся без изменения своей структуры, то это так называемый режим «перемещения спеклов», если же спеклы меняют только свою структуру без перемещения в пространстве, то это так называемый режим «кипения спеклов». Последний режим характерен для случайного распределения скоростей рассеивающих центров.

Очевидно, что в нашем случае направленного движения рассеивающего экрана время, необходимое для смены реализации рассеивателей, освещаемых лазерным

пучком, равно:

$$\tau_T = \frac{w}{|\mathbf{v}|}. \quad (2.92)$$

Учитывая соотношение (2.91), величина перемещения может быть оценена как

$$r_T = \left(1 + \frac{l}{\rho}\right) w. \quad (2.93)$$

Описанная динамика оптических спеклов является основой для спекл-корреляционного метода измерения скорости. Основная идея состоит в измерении скорости перемещения спеклов в плоскости наблюдения и определении скорости движения объекта из соотношения (2.91). Существует множество методов измерения перемещения спекл-полей, от фотографической регистрации до использования высокоскоростных ПЗС и CMOS¹⁾ камер. Один из простейших методов заключается в регистрации флуктуаций интенсивности в двух пространственно разнесенных точках в плоскости наблюдения. Если расстояние между точками измерений короче, чем r_T (2.93), то будут записаны два подобных сигнала со смещением во времени τ_d . Величина τ_d соответствует времени, которое необходимо для перемещения спеклов из одной точки в другую. Эта величина может быть легко измерена с использованием кросс-корреляционного метода, описанного в [577].

2.7.3.3. Доплеровские визуализаторы кровотока. Диагностика многих заболеваний, связанных с нарушением микроциркуляции крови, требует мониторинга микроциркуляции на довольно больших поверхностях ткани [12, 13, 19, 41, 391]. Поскольку доплеровские методы характеризуются высокой пространственной локальностью, то для визуализации поля скоростей кровотока требуется механическое сканирование лазерного пучка или последовательный анализ флуктуаций интенсивности в пределах одного пикселя ПЗС-камеры, либо и то, и другое одновременно. Сканирующие лазерные системы для визуализации кровотока были разработаны и внедрены в производство [769, 770]. Однако в целом такие системы не обеспечивают необходимой скорости получения и анализа изображений микроциркуляции.

Естественный путь для увеличения скорости получения изображений состоит в параллельном измерении с использованием одномерных линеек или двумерных матриц фотоприемников. Новое поколение высокоскоростных устройств полнопольной (параллельной/многоканальной) лазерной доплеровской визуализации (ЛДВ) кровотока было недавно разработано на основе использования КМОП-камер [743–745]. Такая система ЛДВ выдает изображение кровотока с высоким разрешением каждые 0,7–11 с, в зависимости от числа используемых временных отсчетов в каждом пикселе (32–512 точек) и нужного пространственного разрешения изображения (256 × 256 или 512 × 512 пикселей). Типичный размер пикселя камеры 7 × 7 мкм², скорость выборки 40 МГц при 8-битном АЦП. Такой сенсор имеет равномерный спектральный отклик в диапазоне от 500 до 750 нм. В качестве стабильного когерентного источника света использовался твердотельный лазер с диодной накачкой с выходной мощностью 250 мВт ($\lambda = 671$ нм). Для равномерности освещения объекта в пределах площади с диаметром 170 мм лазерное излучение направлялось на объект через пластиковый волоконный световод (ВС) диаметром 1,5 мм с градиентной линзой (GRIN-линза, волоконно-оптическая линза с градиентом показателя преломления) диаметром 1,8 мм на дистальном конце. Рассеянный назад свет собирался объективом ($f = 6$ мм) с малой эффективной фокальной длиной ($f/D \equiv 1/(2NA) = 1,2$, где D — диаметр входящего зрачка), обеспечивая высокую эффективность сбора фотонов, что критично

¹⁾ CMOS камера — оптическая матричная камера на основе комплементарных металло-оксидных полупроводников (или КМОП-камера).

для малых времен интегрирования (в пределах нескольких десятков миллисекунд). Обычно камера располагалась на расстоянии 150–250 мм от поверхности исследуемой биоткани (см. рис. 2.31, а, цветная вклейка).

Обработка сигнала состоит в вычислении нулевого (M_0) и первого (M_1) моментов спектра плотности мощности $S(\nu)$ флуктуаций интенсивности $I(t)$ для каждого пикселя. Нулевой момент связан со средней концентрацией $\langle C \rangle$ движущихся частиц в объеме выборки. Первый момент (плотность потока или перфузия) пропорционален среднеквадратичной скорости движущихся частиц V_{rms} , умноженной на среднюю концентрацию [741]. Соответствующие выражения имеют вид:

$$\text{Концентрация} = \langle C \rangle \propto M_0 = \int_0^{\infty} S(\nu) d\nu, \quad (2.94)$$

$$\text{Перфузия} = \langle C \rangle V_{\text{rms}} \propto M_1 = \int_0^{\infty} \nu S(\nu) d\nu, \quad (2.95)$$

$$S(\nu) = \left| \int_0^{\infty} I(t) \exp(-i2\pi\nu t) dt \right|^2. \quad (2.96)$$

Здесь переменная ν — частота флуктуаций интенсивности, индуцированных фотонами с доплеровским смещением. На основе зарегистрированных временных вариаций сигнала от каждого пикселя в пределах исследуемого участка вычислялся спектр флуктуаций плотности мощности с применением алгоритма быстрого преобразования Фурье (БПФ).

На рис. 2.31, б показаны изображения распределения кровотока, полученные на коже пальцев здорового человека при полном времени формирования изображения примерно 5 с. Изображения хорошо показывают разницу в распределениях скоростей и концентраций. В дополнение к этим изображениям на рис. 2.32 (цветная вклейка) представлены изображения распределения параметра перфузии для пальцев руки человека в реальном масштабе времени на участке размером $5,5 \times 5,5 \text{ см}^2$ (256×256), полученные в эксперименте с временной окклюзией артерии [745]. На этих изображениях и соответствующем графике зависимости усредненной перфузии от времени хорошо видны изменения в распределении перфузии и ее средней величины в процессе окклюзии, во время ее снятия и после, при восстановлении исходного уровня перфузии. Хорошо видна гиперемия после снятия окклюзии и кинетика подавления и восстановления перфузии.

Время формирования изображения у рассмотренной высокоскоростной системы ЛДВ приближается к аналогичному показателю существенно более простых систем лазерной спекл-визуализации (ЛСВ) [12, 13, 19, 114, 181, 182, 746–756, 771], которые в настоящее время считаются самыми быстродействующими [750]. В системах ЛСВ информация о кровотоке получается путем измерения контраста спеклов изображения. Практически значения контраста, измеряемые в ЛСВ, прямо пропорциональны нормированному значению M_0 (см. (2.94)). В методе ЛДВ сигналы концентрации и скорости можно измерить независимо, об этом свидетельствуют изображения, показанные на рис. 2.31, б, которые демонстрируют различие между изображениями распределения перфузии (M_1) (см. (2.95)) и концентрации (M_0). Напротив, в методе ЛСВ эти два сигнала, как правило, смешаны, и поэтому не всегда возможно выяснить точную причину изменения контраста [742]. Тем не менее, была найдена высокая корреляция ($R^2 = 0,98$) между ЛДВ- и ЛСВ-измерениями одной

и той же области местного церебрального кровотока у крыс [746]. Из детального сравнения этих методов, проведенного в работе [749], следует, что ЛСВ, как и ЛДВ, может давать изображение сосудистой структуры биоткани с относительным распределением скорости кровотока, но он не позволяет произвести измерение перфузии в линейном режиме, что характерно для ЛДВ.

2.7.3.4. Методы лазерной спекл-визуализации полного поля. Как уже отмечалось выше, спекл-контрастный метод относится к методам лазерной спекл-визуализации (ЛСВ). Его полное название — метод анализа контраста лазерных спеклов (АКЛАС) (laser speckle contrast analysis (LASCA)). Он является концептуально простым высокоэффективным полнопольным методом визуализации кровотока [12, 13, 19, 114, 181, 182, 746–756, 771]. В измерительной системе используется ПЗС-камера, плата захвата изображения и специальное программное обеспечение для вычисления локального контраста спекл-структуры и преобразования контраста в цветное изображение, которое отображает распределение скоростей рассеивающих центров. Это результирующее изображение представляет собой усредненный по времени контраст спекл-поля. Усреднение производится достаточно быстро (время усреднения обычно равно 5–30 мс), поэтому измерения осуществляются в реальном времени.

Очевидно, что при времени усреднения, сравнимом с периодом флуктуаций интенсивности, вызванных динамическим рассеянием света, эффект состоит в размытии регистрируемой спекл-картины, т. е. снижении контраста спеклов. Контраст количественно описывается отношением стандартного отклонения флуктуаций интенсивности к средней интенсивности, $s_I/\langle I \rangle$ (см. (2.74)). Для реализации метода важным является выбор числа пикселей, по которым вычисляется локальный контраст: если их слишком мало — недостоверна статистика, слишком много — происходит потеря пространственного разрешения. На практике удовлетворительным компромиссом является квадрат 7×7 или 5×5 пикселей.

Для случайного распределения скоростей каждый спекл флуктуирует по интенсивности («кипение спеклов»). С другой стороны, при регулярном поперечном движении СФЭ спеклы также движутся регулярно в поперечном направлении, при усреднении их изображение смазывается и происходит снижение контраста. Для потока жидкости ситуация может быть комбинацией этих двух типов «движения». В каждом случае проблемой для количественных измерений является определение соотношения между контрастом спеклов и скоростью (или распределением скоростей). Чем выше скорость, тем быстрее флуктуации и тем больше размытие картины за время интегрирования. Имеет место следующее соотношение между контрастом спеклов и временной статистикой их флуктуаций [771]:

$$\sigma_s^2(T) = \frac{1}{T} \int_0^T \tilde{g}_2(\tau) d\tau, \quad (2.97)$$

где σ_s^2 — дисперсия флуктуаций интенсивности спекл-картины *в пространстве*; T — время интегрирования; $\tilde{g}_2(\tau) = [\langle I(\tau + \Delta\tau) - \langle I \rangle \rangle] \times [I(\tau) - \langle I \rangle]$ — коэффициент автокорреляции флуктуаций интенсивности отдельного спекла *во времени*. Формула (2.97) определяет связь между АКЛАС и теми методами, которые используют флуктуации интенсивности в лазерном свете, рассеянном движущимися объектами или частицами. АКЛАС измеряет величину в левой части уравнения (2.97); а спектроскопия корреляции фотонов, лазерный доплеровский метод и метод меняющихся во времени спеклов измеряют величину в правой части. Стоит также заметить, что АКЛАС использует *спекл изображения*, в то время как большинство

временных методов используют *спеклы дальнего поля*. Однако это не нарушает фундаментальной эквивалентности двух подходов, выражаемой соотношением (2.97).

Все методы позволяют определить время корреляции τ_c . В случае корреляции фотонов этот параметр измеряется непосредственно. В случае АКЛАС требуются некоторые дополнительные допущения для установления связи измеряемого контраста спеклов с τ_c .

В зависимости от типа движения можно использовать различные модели для нахождения соотношения между контрастом спеклов и временем корреляции τ_c для заданного времени интегрирования T . Например, в случае лоренцева распределения скоростей это соотношение имеет вид [771]:

$$\frac{\sigma_s}{\langle I \rangle} = \left[\frac{\tau_c}{2T} \left\{ 1 - \exp\left(-\frac{2T}{\tau_c}\right) \right\} \right]^{1/2}. \quad (2.98)$$

Как и все временные методы, АКЛАС испытывает трудности, связанные с привязкой корреляционного времени τ_c к распределению скоростей рассеивателей. Она неочевидна и зависит от эффектов многократного рассеяния, размеров и формы рассеивающих частиц, неньютонности потока и негауссовости статистики из-за малого числа рассеивателей в объеме, где проводится измерение, спина рассеивателей и т. д. Из-за неопределенностей, вызванных указанными факторами, во всех этих методах обычно полагаются главным образом на калибровку, а не на абсолютные измерения.

Формула (2.98) выражает контраст спеклов в усредненной по времени спекл-структуре как функцию времени экспозиции T и времени корреляции

$$\tau_c = 1/(ak_0v), \quad (2.99)$$

где v — средняя скорость рассеивающих частиц, k_0 — волновое число падающего света, а a — фактор, зависящий от лоренцевой полуширины и рассеивающих свойств ткани [741]. Как и в ЛДВ, здесь теоретически возможно связать времена корреляции τ_c с абсолютными скоростями эритроцитов, однако на практике это сложно, поскольку число движущихся частиц, с которыми взаимодействует свет, и их ориентации неизвестны [741]. Тем не менее, можно получить пространственные и временные распределения для относительной скорости из измерения отношения $2T/\tau_c$, которое пропорционально скорости и определяется как измеряемая относительная скорость [772, 774–776].

Как было описано выше, ЛСВ основана на пространственной статистике первого порядка спеклов, проинтегрированных по времени. Основной недостаток метода АКЛАС — потеря разрешения, обусловленная необходимостью усреднять по блоку пикселей, чтобы получить пространственную статистику, используемую в анализе, хотя принципиально он имеет более высокое разрешение, чем некоторые другие методы. Недавно был предложен модифицированный метод ЛСВ, так называемый метод лазерного временного контраста (ЛВК), использующий временную статистику спеклов, проинтегрированных по времени [752, 772]. В этом методе каждый пиксель в спекл-изображении может рассматриваться как одна точка. Тогда обработка сигнала состоит в вычислении временной статистики интенсивности каждого пикселя изображения:

$$N_{i,j} = \frac{\langle I_{i,j,t}^2 \rangle_t - \langle I_{i,j,t} \rangle_t^2}{\langle I_{i,j,t} \rangle_t^2}, \quad (2.100)$$

$$i = 1-480, \quad j = 1-640, \quad t = 1-m,$$

где $I_{i,j,t}$ — мгновенная интенсивность i -го и j -го пикселей в кадре с номером t исходной спекл-картины, а $\langle I_{i,j,t} \rangle_t$ — средняя интенсивность i -го и j -го пикселей по последовательности m кадров. Величина $N_{i,j}$ обратно пропорциональна скорости

рассеивающих частиц. Значение $N_{i,j}$ каждого пикселя в t следующих друг за другом кадрах ($I_{i,j,t}$) необработанной спекл-картины вычисляется по формуле (2.100). Затем процесс повторяется для следующей группы t кадров. Результаты представляются в виде двумерного изображения в серой шкале (65536 уровней яркости) или условно-цветовой шкале (65536 цветов), которая описывает пространственные вариации распределения скоростей в исследуемой области.

На рис. 2.33, а представлена оптическая схема системы визуализации кровеносных сосудов методом лазерного временного контраста (ЛВК) [773]. Измерительная система очень проста, освещающий диодный лазер на длину волны 670 нм, рассеиватель пучка, оптический фильтр и ПЗС-камера для регистрации спеклов. Твердотельный лазер с диодной накачкой с длиной волны 532 нм служит для создания окклюзии в выбранном сосуде путем его закупорки при коагуляции крови. Он необходим для проведения исследований по динамике сосудистой системы при окклюзии выборочных сосудов на модели уха мыши. Рис. 2.33, б представляет ЛВК-изображение в виде пространственного распределения значений временного контраста лазерных спеклов; большие сосуды видны как белые линии, более мелкие и разветвленные образования соответствуют сигналам от эритроцитов, движущихся в капиллярах. Важно, что в отличие от многих других методов интравитальной микроскопии [777] этот метод не использует флуоресцентных или каких-либо других меток для визуализации микрососудов и поэтому потенциально более приспособлен для применения на пациентах при мониторинге *in vivo* лазерной коагуляции сосудов. Он позволяет надежно и с хорошим разрешением детектировать через кожу с глубины до 0,3 мм изменения движения эритроцитов при окклюзии сосудов васкулярной системы уха мыши. Дальнейшие совершенствования метода и измерительной системы должны позволить обеспечить еще лучшее разрешение и увеличить глубину, с которой получают изображения.

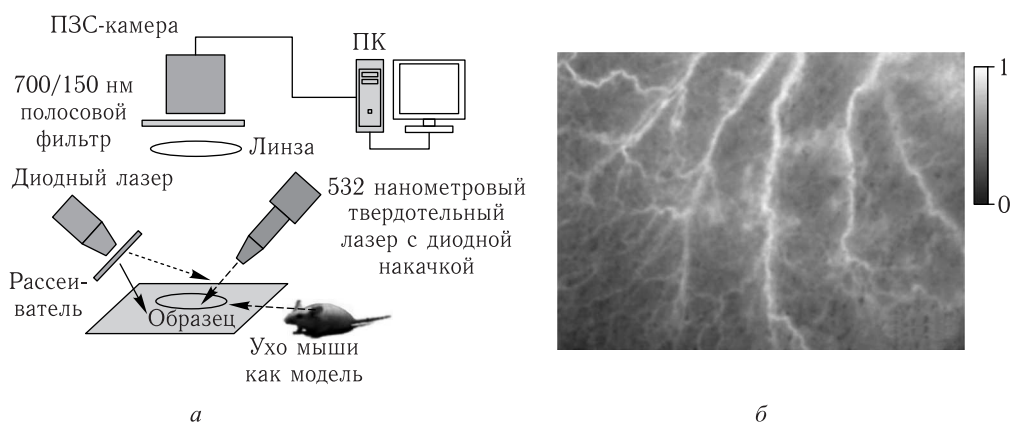


Рис. 2.33. Оптическая схема системы визуализации кровеносных сосудов методом лазерного временного контраста (ЛВК) (а); ЛВК изображение (б), шкала интенсивностей справа (0–1) представляет собой значение временного контраста лазерных спеклов; шкала размеров — бар = 1 мм; большие сосуды видны как белые линии, более мелкие и разветвленные образования соответствуют сигналам от эритроцитов, движущихся в капиллярах; 532 нанометровый твердотельный лазер с диодной накачкой служит для создания окклюзии в выбранном сосуде путем его закупорки при коагуляции крови [773]

Например, снижения шумов можно добиться путем использования активной схемы усреднения спеклов, которая гарантирует хорошее усреднение по ансамблю

[749, 755]. Можно применять различные методы генерирования спекл-изображений при сокращенном времени обработки, например путем использования вторичных низкокогерентных источников света — освещения рассеянным пучком лазера, пропущенным через вращающийся рассеиватель.

2.7.3.5. *Диффузионно-волновая спектроскопия (ДВС)*. Диффузионно-волновая спектроскопия (ДВС) — новый класс исследований в области динамического рассеяния света, связанный с изучением динамики частиц в пределах очень коротких промежутков времени [12, 13, 19, 31, 105, 128, 172, 179, 180, 185, 409, 778–784]. Фундаментальное отличие ДВС от спектроскопии квазиупругого рассеяния света заключается в том, что ДВС применима только в случае сред с многократным рассеянием, что очень важно для биотканей.

Несмотря на внешнее сходство между экспериментами по ДВС и корреляционной спектроскопии оптического смещения (см. (2.83)–(2.85)) [177, 178], теория ДВС основана на качественно отличном описании распространения излучения именно в сильно рассеивающих средах. Благодаря многократному рассеянию каждый фотон, достигший точки наблюдения, испытывает большое число актов рассеяния N . Последовательные акты рассеяния, происходящие в момент времени t на рассеивающих частицах, расположенных в точках $r_1(t), r_2(t), \dots, r_i(t), \dots, r_N(t)$ среды, с волновыми векторами $k_1, k_2, \dots, k_i, \dots, k_N$, приводят к формированию поля $E(t)$, у которого полный сдвиг фазы $\Delta\varphi(t)$ определяется как [780]

$$\Delta\varphi(t) = \sum_{i=0}^N k_i(t)[r_{i+1}(t) - r_i(t)], \quad (2.101)$$

$\Delta\varphi(t)$ зависит от полной длины пути s каждого фотона, мигрирующего от источника с координатой r_0 до приемника с координатой r_{N+1} :

$$s = \sum_{i=0}^N |r_{i+1}(t) - r_i(t)| = \sum_{i=0}^N \frac{k_i}{|k_i|} [r_{i+1}(t) - r_i(t)]. \quad (2.102)$$

Величина s связана с числом актов рассеяния N соотношением $s = Nl_s$, где $l_s = (\mu_s)^{-1}$. В сильно рассеивающих средах, например коже человека, s можно рассматривать как статистически независимое случайное блуждание. Функция распределения путей миграции фотонов $p(s)$ в среде определяется как вероятность того, что свет пройдет оптический путь s , двигаясь от точки r_0 до точки r_{N+1} [780]:

$$p(s) = \left(\frac{c}{4\pi s D}\right)^{3/2} \exp \frac{c|r_0 - r_{N+1}|^2}{4sD}. \quad (2.103)$$

Здесь D — коэффициент диффузии фотонов (см. формулу (2.8)), а c — скорость света в среде.

Поле $E(t)$ интерферирует с полем $E(t + \tau)$, рассеянным немного позже на том же ряде рассеивающих частиц в момент времени $t + \tau$. Время, необходимое фотону для прохождения всего оптического пути, короче характерного времени изменения положения рассеивающих частиц среды. Таким образом, в результате движения частиц разность фаз между полями $E(t)$ и $E(t + \tau)$ будет различной в разные моменты времени, т. е. флуктуирующей. Это определяет наличие временных флуктуаций интенсивности рассеянного излучения в дальней зоне (спеклы) (см. рис. 2.27).

Количественно указанные флуктуации описываются временной автокорреляционной функцией поля. Экспериментальная реализация ДВС весьма проста: нужно освещать рассеивающий объект светом лазера непрерывного действия и измерять флуктуации интенсивности рассеянного излучения в пределах одного спекла с по-

мощью ФЭУ (или лавинного фотодиода (ЛФД)) и электронного коррелятора. Типичная установка, используемая в модельных и экспериментальных исследованиях, показана на рис. 2.34 [12, 13, 19, 31, 179, 180, 185, 409, 782]. Свет, выходящий из некоторой области объекта, собирается одномодовым волоконным световодом (ВС) и передается на ФЭУ (или ЛФД). Выходной сигнал ФЭУ (ЛФД) с помощью цифрового автокоррелятора реконструируется во временную автокорреляционную функцию (АФ) флуктуаций интенсивности. Эта АФ связана с временной автокорреляционной функцией поля формулой Зигерта (см. соотношения (2.83) и (2.86)).

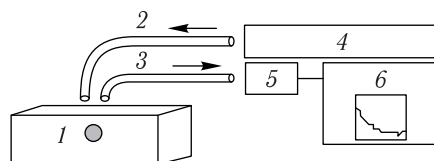


Рис. 2.34. Схема экспериментальной установки для ДВС: 1 — биоткань с локальной динамической неоднородностью — опухоль с питающими ее кровеносными сосудами (темный шарик); 2 и 3 — волоконно-оптический датчик — многомодовый облучающий волоконный световод (2) и одномодовый приемный волоконный световод; 4 — лазер с длиной когерентности не меньше, чем полная длина пути фотона s при многократном рассеянии; 5 — приемная система — фотоэлектронный умножитель (ФЭУ) или лавинный фотодиод (ЛФД), работающие в режиме счета фотонов и связанные с цифровым многоканальным электронным автокоррелятором (6) [12]

На рис. 2.35 показаны экспериментальные результаты для нормированной временной АФ поля. Характер АФ позволяет использовать их наклон (скорость затухания) как параметр для построения изображений динамических неоднородностей в среде. Это соответствует, в частности, ситуации, когда скорость микроциркуляции крови локально увеличена, например, вблизи растущей опухоли. Используя аналогичный подход, можно исследовать и направленные потоки крови.

Возможности метода ДВС для медицинских приложений были продемонстрированы в [185, 409, 782]. В работах [409, 782] в качестве лазера использовался титан-сапфировый лазер с мощностью около 100 мВт и длиной волны 800 нм. Лазерное излучение подавалось на объект через многомодовый ВС с диаметром сердцевины 200 мкм. Рассеянное излучение регистрировалось в пределах одного спекла с использованием одномодового ВС с диаметром сердцевины 5 мкм. Расстояние между оптическими волокнами на поверхности объекта оставалось постоянным и равнялось 6 мм. Скорость потока крови в объеме ткани предплечья человека устанавливалась при помощи наполняемой воздухом манжеты медицинского тонометра. Цифровой автокоррелятор на выходе ФЭУ, работающего в режиме счета фотонов, использовался для измерения временной АФ флуктуаций интенсивности и зависимости формы АФ от давления P , производимого тонометром. Такие зависимости для АФ поля, которая связана с АФ флуктуаций

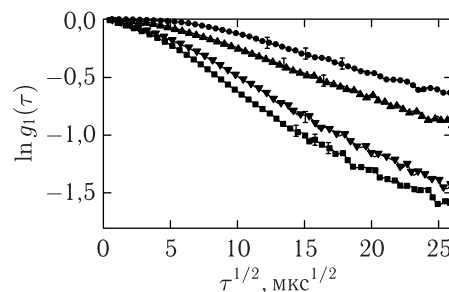


Рис. 2.35. Типичные автокорреляционные функции (АФ) флуктуаций поля $g_1(\tau)$, измеренные в условиях различной динамики кровотока в эксперименте на добровольце при окклюзии артерии предплечья и представленных в полулогарифмическом масштабе в зависимости от $\tau^{1/2}$; верхние кривые соответствуют медленному кровотоку, в то время как нижние — более быстрому [782]

интенсивности формулой Зигерта (см. (2.83)), представлены в полулогарифмическом масштабе на рис. 2.35. Эти зависимости указывают на высокую чувствительность наклона АФ к изменению давления, т. е. к изменению скорости объемного потока крови.

Из теоретического анализа следует [12, 13, 19, 31, 456, 778–780, 782], что как и в обычном методе динамического рассеяния света [177, 178], изменение $g_1(\tau)$ определяется через средний квадрат смещения частиц $\langle \Delta r^2(\tau) \rangle$ с той разницей, что наклон $g_1(\tau)$ растет пропорционально среднему числу рассеивающих частиц:

$$g_1(\tau) = \int_0^{\infty} p(s) \exp\left(-\frac{1}{3}k_0^2 \langle \Delta r^2(\tau) \rangle \frac{s}{l_{tr}}\right) ds. \quad (2.104)$$

l_{tr} — транспортная длина свободного пробега фотона (которая соответствует среднему расстоянию, на котором фотон полностью теряет первоначальное направление своего движения) (см. формулу (2.10)).

Учитывая уравнение (2.104), нормированная АФ флуктуаций поля может быть представлена в виде двух компонент, связанных с броуновским и упорядоченным движением рассеивающих частиц [409, 782]:

$$g_1(\tau) = \int_0^{\infty} p(s) \exp\left\{-2\left[\frac{\tau}{\tau_B} + \left(\frac{\tau}{\tau_S}\right)^2\right] \frac{s}{l_{tr}}\right\} ds, \quad (2.105)$$

где $\tau_B^{-1} \equiv \Gamma_T$ определяется формулой (2.85); $\tau_S^{-1} \cong 0,18G_V|\mathbf{q}|l_{tr}$ характеризует направленный поток частиц, а G_V — градиент скорости потока; $|\mathbf{q}|$ — модуль волнового вектора,

$$|\mathbf{q}| = \frac{4\pi n}{\lambda_0} \sin \frac{\vartheta}{2}, \quad (2.106)$$

где n — показатель преломления базового вещества рассеивающей среды (или средний показатель преломления базового вещества и вещества рассеивающих частиц, $n = \bar{n}$), а ϑ — угол рассеяния. Пространственный масштаб тестирования коллоидной структуры (ансамбля биологических частиц) определяется величиной обратного модуля волнового вектора, $|\mathbf{q}|^{-1}$.

Соотношение (2.105) позволяет выразить наклон АФ через коэффициент трансляционной диффузии ($D_T = k_B T / 6\pi\eta r_h$) (см. (2.85)) и градиент направленной скорости рассеивающих частиц G_V . Когда упорядоченное течение существенно преобладает над броуновским движением, полулогарифмический график зависимости $g_1(\tau)$ от $\tau^{1/2}$ имеет вид прямой линии, наклон которой пропорционален скорости потока рассеивающих частиц.

Рисунок 2.36 показывает измеренную скорость потока крови добровольца как функцию приложенного давления в области предплечья, создающего артериальную окклюзию. Если пренебречь броуновской компонентой, эта зависимость характеризуется изменением наклона АФ. Поскольку измерения производились на длине волны, близкой к изобестической точке (805 нм — длина волны, для которой имеет место равенство поглотительной способности оксигенированного и дезоксигенированного гемоглобина), изменение степени оксигенации крови из-за вариаций приложенного давления лишь слегка влияет на наклон АФ (скорость потока крови).

Заметим, что если параметры кровотока остаются постоянными, измеренные АФ дают информацию, относящуюся к статическим оптическим параметрам многократно рассеивающей среды, т. е. l_{tr} или μ'_s , μ_a и g (см. формулы (2.10) и (2.105)). Действительно, как показано в работе [784], полуширина спектра временных флуктуаций

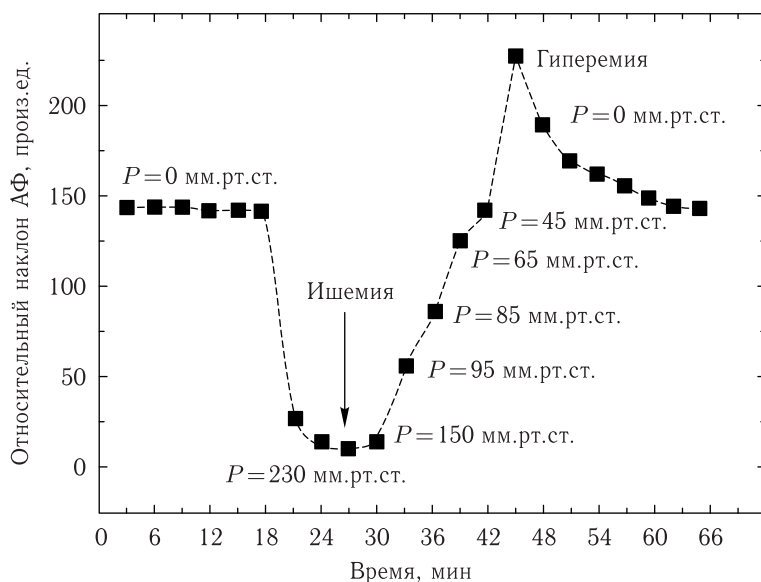


Рис. 2.36. Изменение относительного наклона временной АФ флуктуаций поля $g_1(\tau)$, представленной на рис. 2.35 и измеренной в реальном масштабе времени для добровольца при изменяющейся окклюзии артерии предплечья; степень окклюзии представлена в виде давления P в манжете на предплечье добровольца (мм. рт. ст.) [782]

интенсивности в условиях многократного рассеяния зависит не только от динамических и геометрических параметров рассеивающих частиц, но и от поглощающей способности эритроцитов в крови, что позволяет оценивать степень оксигенации крови из результатов измерений, производимых вдали от изобестической длины волны.

2.7.4. Конфокальная микроскопия. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, использующая конфокальный принцип (две оптически сопряженные диафрагмы или щели малого размера в плоскости предметов и изображений) для селекции отраженных (баллистических) фотонов (рис. 2.37), является хорошо разработанным методом получения высококачественных изображений в биомедицинских исследованиях [1, 3, 12, 13, 15, 18, 19, 41, 439–446, 707, 785–789]. Разрешение этого метода дает возможность распознать различные типы клеток и одновременно наблюдать движущиеся клетки крови в микрососудах [788].

В обычном микроскопе поперечное и продольное разрешение не являются независимыми. Большим преимуществом конфокального микроскопа является то, что продольное разрешение усилено за счет селекции фотонов, в результате чего появляется возможность «оптического секционирования», т. е. получения послойного изображения [15, 440, 443, 707, 785, 786]. Поперечное разрешение конфокального микроскопа обратно пропорционально числовой апертуре (NA) линзы объектива микроскопа [788]:

$$\Delta x = \frac{0,46\lambda}{NA}. \quad (2.107)$$

Разрешение Δx составляет 0,4 мкм при $NA = 1,2$ линзы объектива с водной иммерсией на длине волны $\lambda = 1064$ нм. Продольное разрешение более чувствительно к числовой апертуре линзы объектива микроскопа. Поэтому для получения максимального продольного разрешения и, следовательно, более тонкого послойного анализа, нужно

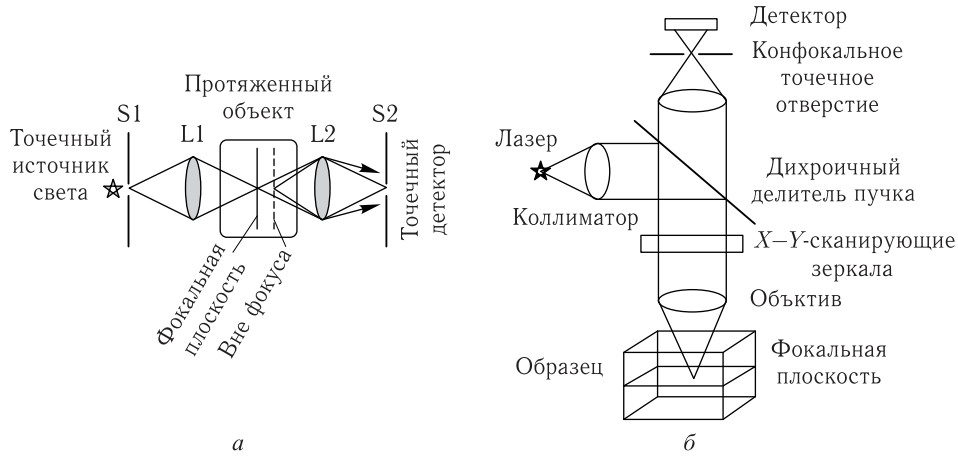


Рис. 2.37. Принцип работы сканирующего отражательного конфокального микроскопа [785]: *a* — принцип селекции фотонов; S1 и S2 — конфокальные точечные отверстия; L1 и L2 — фокусирующие линзы соответственно для освещения и собирания прошедшего света; фокальный объем формируется точечным источником света S1 и линзой L1; этот освещенный фокальный объем перетображается линзой L2, формирующей изображение на отверстии S2; *б* — оптическая схема лазерного отражательного сканирующего конфокального микроскопа; сфокусированный лазерный пучок играет роль точечного источника, а роль точечного детектора выполняет конфокальное точечное отверстие; дихроичный делитель пучка нужен для исследования возбуждаемой лазерным излучением более слабой флуоресценции из измерительного объема, в режиме отражения лазерного излучения используется обычный делитель пучка, при поляризационных измерениях делитель пучка может быть заменен поляризационной призмой; сканирующие зеркала осуществляют сканирование лазерного пучка в фокальной плоскости X–Y, а Z-сканирование осуществляется при перемещении конфокальной диафрагмы вдоль оси микроскопа, в результате получают трехмерное изображение объекта

использовать объективы микроскопа с наибольшей числовой апертурой. Полная ширина по поперечному продольному распределению энергетической освещенности определяет продольное разрешение или точность оптического секционирования [788]:

$$\Delta z = \frac{1,4n\lambda}{(NA)^2}, \quad (2.108)$$

где n — показатель преломления иммерсионной жидкости объектива. Продольное разрешение Δz составляет 1,4 мкм при $NA = 1,2$ линзы объектива с водной иммерсией на длине волны $\lambda = 1064$ нм и $n = 1,35$. В реальных условиях рассеивающей среды поперечное Δx и продольное Δz разрешение конфокального микроскопа может существенно ухудшаться. Например, измеренные для той же оптической системы значения в условиях рассеивающей среды составили: $\Delta x \cong 0,7$ мкм и $\Delta z \cong 3$ мкм, при $n = 1,35$, $\lambda = 1064$ нм и $NA = 1,2$ линзы объектива [788]. Примерно двукратные различия можно отнести на счет влияния сферической аберрации в условиях рассеяния.

Для линзы микроскопа с масляной иммерсией с числовой апертурой $NA = 1,4$ и на более короткой длине волны 442 нм, поперечное разрешение было равно $\Delta x \cong 0,14$ мкм, а продольное разрешение или разрешение по глубине — $\Delta z \cong 0,23$ мкм [785].

При наблюдении отдельной точки образца в отраженном свете с помощью обычного микроскопа, распределение интенсивности изображения можно описать выра-

жением [440, 785]

$$I(r) = \left(\frac{2J_1 \frac{2\pi}{\lambda} NA \cdot r}{\frac{2\pi}{\lambda} NA \cdot r} \right)^2, \quad (2.109)$$

где J_1 — функция Бесселя первого порядка, а r — поперечное расстояние в фокальной плоскости. Для конфокального случая в присутствии диафрагмы малого сечения изображение точки описывается формулой

$$I_{\text{conf}}(r) = I^2(r). \quad (2.110)$$

Для конфокального случая изображение в 1,4 раза более резкое по сравнению с обычным микроскопом, соответственно поперечное разрешение примерно на 40% лучше, чем у обычного микроскопа.

Если в конфокальном микроскопе сканирование осуществлять продольно так, чтобы интенсивность света, отраженного от плоского зеркала (объекта), регистрировалась как функция смещения зеркала (объекта) в направлении фокальной плоскости, то интенсивность отраженного света дается простой парааксиальной теорией в виде [790]:

$$I_{\text{conf}}(z) = \left(\frac{\sin \frac{v(z)}{2}}{\frac{v(z)}{2}} \right)^2. \quad (2.111)$$

Здесь $v(z)$ — нормированная продольная координата:

$$v = \frac{8\pi}{\lambda} n z \sin^2 \left(\frac{\alpha}{2} \right), \quad n \sin \alpha = NA. \quad (2.112)$$

В фокальной плоскости интенсивность отраженного сигнала максимальна. Эти соотношения верны для отображения плоских отражателей. Для точечных или линейных отражателей уравнение (2.111) принимает вид:

$$I_{\text{conf}}(z) = \left(\frac{\sin \frac{v(z)}{2}}{\frac{v(z)}{2}} \right)^4. \quad (2.113)$$

Послойная оптическая селекция выражена несколько слабее для точки или линии, чем для плоскости. Однако качество изображения зависит не только от разрешения, но и в очень большой степени от контраста изображения.

Высокий контраст изображения и высокое пространственное разрешение отражательной конфокальной микроскопии (ОКМ) достигаются благодаря зондированию малого (10–100 мкм²) объема биоткани. Локализация полезного сигнала в исследуемом объеме столь малых размеров становится возможной в результате взаимного оптического согласования источника лазерного излучения, исследуемого объема и фотоприемника. Поле зрения источника света и фотоприемника ограничено за счет использования сфокусированного пучка с фокусом в предметной плоскости и точечной диафрагмы, расположенной в плоскости изображения (рис. 2.37, б) [785]. Если глубина проникновения z_f фокуса линзы внутрь биоткани не превышает трех-четырех длин свободного пробега фотона $l_{\text{ph}} = \mu_t^{-1}$ (см. (1.1)), то такие условия лазерного освещения и приема отраженного сигнала гарантируют, что фотоны, отраженные точно назад компонентами клеток внутри зондируемого объема (так называемые баллистические фотоны), преобладают в регистрируемом сигнале. Именно эти фотоны несут неискаженную информацию, позволяющую реконструировать внутреннюю структуру исследуемой ткани.

С ростом z_f , т. е. когда фокус проникает глубже в рассеивающую среду, доля баллистических фотонов в детектируемом сигнале снижается, в то время как доля фотонов, рассеянных средой, увеличивается. При типичных условиях эксперимента с биологическими тканями ОКМ позволяет различить баллистические фотоны на фоне множества рассеянных средой фотонов, пока z_f не станет больше l_{ph} в 5–8 раз. Другими словами, из-за многократного рассеяния света, характерного для большинства биотканей, ОКМ позволяет получить изображение клеточной структуры, например кожи, расположенной на глубине не более 300–400 мкм [442, 786–788], однако иммерсионное просветление (снижение рассеяния) кожи может существенно повысить эффективность ОКМ [791, 792].

2.7.5. Оптическая когерентная томография. Оптическая когерентная томография (ОКТ) аналогична ультразвуковой визуализации с тем отличием, что вместо звуковых волн измеряется интенсивность отраженного от образца видимого или инфракрасного света. Стробирование по времени используется таким образом, что время, необходимое для прихода назад отраженного света, или время задержки эха в терминах ультразвуковых волн, используется для определения интенсивности отраженного света как функции глубины. В отличие от ультразвука, времена задержки очень малы, на уровне фемтосекунд, что обусловлено большой скоростью распространения света, и поэтому не могут быть измерены средствами электроники. Для измерения таких ультракоротких времен задержки света, отраженного от различных по глубине слоев образца, используется оптический интерферометр с низкокогерентным источником света. В качестве такого низкокогерентного источника может быть взята просто яркая спектрально широкополосная лампа, светодиод, суперлюминесцентный диод (СЛД), фемтосекундный лазер, лазер со свипированием частоты или фемтосекундный лазер с преобразователем в суперконтинуум на основе фотонно-кристаллического волоконного световода. Такие источники, как СЛД и все лазерные источники, принципиально необходимо использовать в ОКТ-системах на основе одномодовых волоконно-оптических интерферометров, поскольку наряду с малой временной когерентностью они имеют высокую степень пространственной когерентности, что позволяет эффективно вводить излучение в одномодовый световод. Именно такие волоконно-оптические системы находят наибольшее применение в биомедицинских исследованиях благодаря их компактности, помехозащищенности, удобного сопряжения с эндоскопическими системами и пр.

В литературе используются различные термины для обозначения этого метода исследований: двухлучевая когерентная интерферометрия или лазерная доплеровская интерферометрия, оптическая когерентная томография (ОКТ) или оптическая когерентная рефлектометрия. Томографическая схема отличается от интерферометрической дополнительным поперечным сканированием, которое позволяет получать оптические срезы различных слоев биоткани.

Методы интерферометрии и томографии биотканей и органов с использованием частично когерентного света интенсивно развиваются [1, 3, 12, 13, 16, 18, 19, 21, 22, 27, 29, 31, 33, 44, 78, 98, 101, 104–106, 111–113, 116, 117, 120, 121, 123, 125, 175, 176, 183, 199, 200, 432–438, 658–661, 663, 793–876]. Метод ОКТ был впервые продемонстрирован в 1991 г. [816]. Краткий исторический обзор и анализ основ низкокогерентной интерферометрии и томографии представлен Ферчером и сотрудниками [125, 183, 434], которые также обсудили офтальмологические приложения этих методов. Обзор ранних этапов развития оптической низкокогерентной рефлектометрии и некоторых недавних биомедицинских приложений дан Мастерсом [837]. Копии важнейших статей по ОСТ изданы в виде отдельного тома [794].

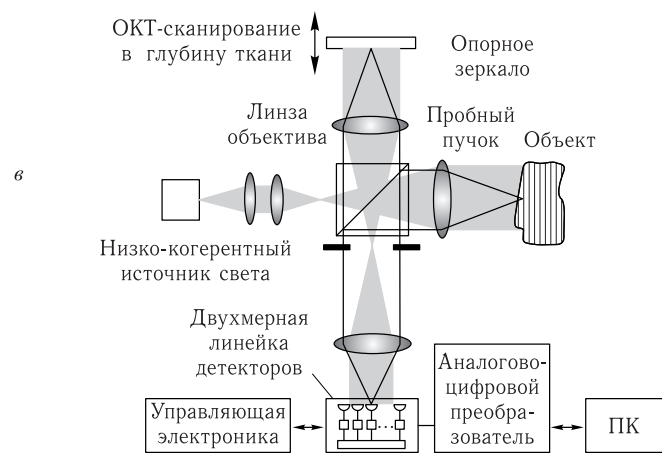
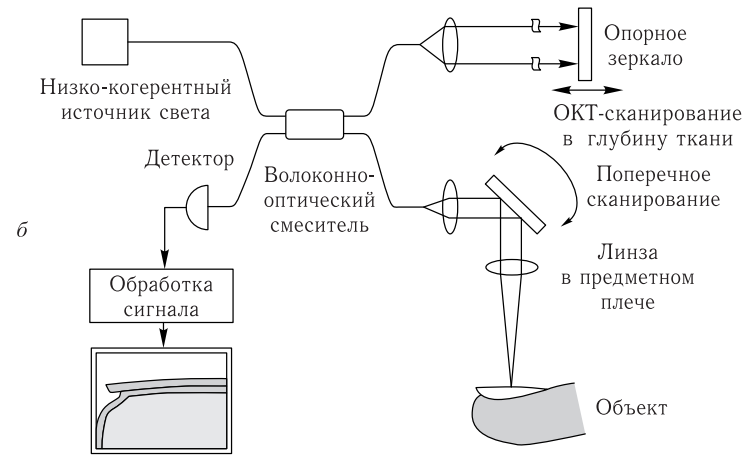
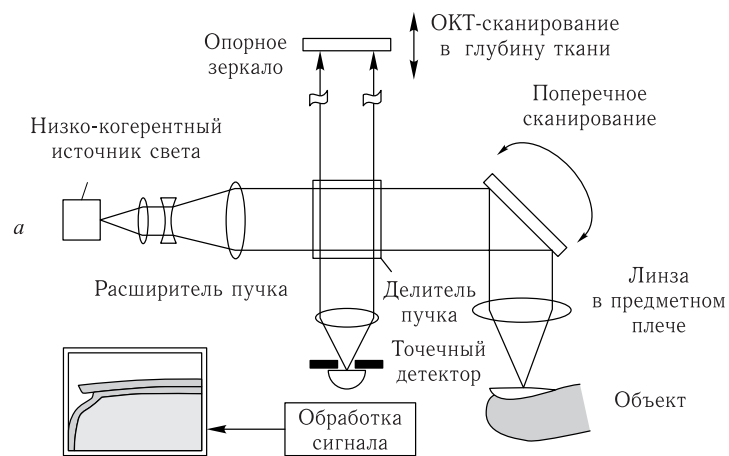


Рис. 2.38. ОКТ на основе открытого (воздушного) интерферометра Майкельсона (а); ОКТ на основе одномодового волоконно-оптического интерферометра (б); параллельная (полнопольная) система ОКТ на основе открытого интерферометра Майкельсона и двумерного КОМП детектора (58 × 58 пикселей), в котором каждый индивидуальный фотодетектор (пиксель) параллельно обеспечивает гетеродинное детектирование сигнала (в) [125]

Обычно ОКТ строится на основе открытого или волоконно-оптического интерферометра Майкельсона (рис. 2.38). Если длина пути света в опорном плече меняется с постоянной линейной скоростью v , то сигнал, возникающий из-за интерференции света, рассеянного назад (отраженного) от образца в предметном плече (поверхности и внутренние слои образца играют роль зеркала), и света в опорном плече, модулируется на доплеровской частоте

$$f_D = \frac{2v}{\lambda}. \quad (2.114)$$

Благодаря малой длине когерентности источника света, которая определяется соотношением

$$l_c = \frac{2 \ln 2}{\pi} \cdot \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda}, \quad (2.115)$$

где $\Delta\lambda$ — ширина полосы источника света с гауссовым профилем линии, доплеровский сигнал вызывается светом, рассеянным назад лишь в очень малой области (с размером порядка длины когерентности l_c), соответствующей текущему значению оптической длины пути в опорном плече (рис. 2.39).

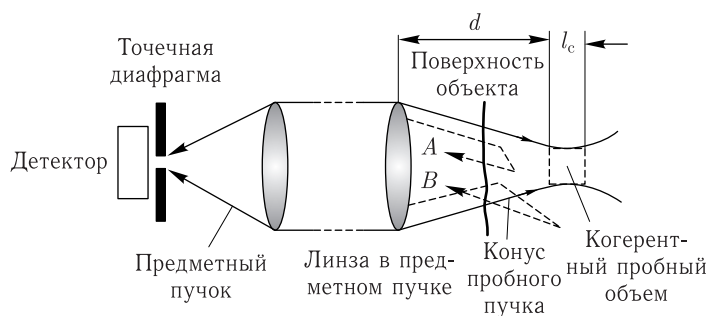


Рис. 2.39. Взаимное расположение объекта (биоткани) и пробного пучка (см. рис. 2.39); линза объектива находится на расстоянии d от когерентного пробного объема, в пределах которого отраженные от слоев ткани волны могут интерферировать с опорной волной интерферометра; длина этой области равна длине когерентности (см. соотношение (2.115)); показаны траектории фотонов (волн), которые испытывают двукратное рассеяние и не дают вклада в интерференцию по двум разным причинам; траектория движения фотона (волны) A находится вне «ворот когерентности», а траектория B , хотя и находится в пределах «ворот когерентности», но ее направление не совпадает с направлением оси системы, поэтому фотон не попадает в световод или точечную диафрагму фотоприемника (реализуется конфокальный принцип) [125]

При использовании многомодового диодного лазера или суперлюминесцентного диода (СЛД) с шириной полосы 15–60 нм ($\lambda \sim 800\text{--}860$ нм) продольное разрешение находится в интервале 5–20 мкм. Для титан-сапфирового лазера с длиной волны 820 нм ширина полосы может достигать 140 нм. Соответствующее продольное разрешение составляет 2,1 мкм [78, 183].

Сканирование объекта по глубине (z -направление) производится путем возвратно-поступательного движения отражателя в опорном плече интерферометра, при этом амплитуда детектируемого интерференционного сигнала пропорциональна локальному значению коэффициента отражения среды на глубине зондирования (см. рис. 2.38). В поперечном сечении медленное сканирование образца производится путем последовательного перемещения оси зондирующего пучка с помощью, например, электромеханической сканирующей системы (см. рис. 2.38, *а* и *б*).

Наличие в исследуемом объеме локальных областей с оптическими характеристиками, существенно отличающимися от средних значений, приводит к значительным изменениям амплитуды детектируемого сигнала. Таким образом, зависимость амплитуды детектируемого сигнала от времени в течение одного цикла продольного сканирования может быть использована для восстановления распределения локальных значений коэффициента отражения по глубине при заданном положении зондирующего пучка. На практике с целью увеличения отношения сигнал/шум осуществляется усреднение локальных значений коэффициента отражения, полученных по последовательности реализаций детектируемого сигнала в результате периодического сканирования данной области образца. На рис. 2.40 в качестве примера представлены ОКТ-изображения ($x-z$) прозрачной роговицы (рис. 2.40, *a*) и сильно рассеивающей склеры (белая ткань глазного яблока) (рис. 2.40, *б*) глаза кролика и соответствующие сигналы ОКТ (локальное отражение) от глубины сканирования в направлении z ; x — поперечная координата, z — продольная координата (глубина объекта — ткани) (рис. 2.40, *в* и *г*) [851, 852]. Для прозрачной роговицы на изображении хорошо видны

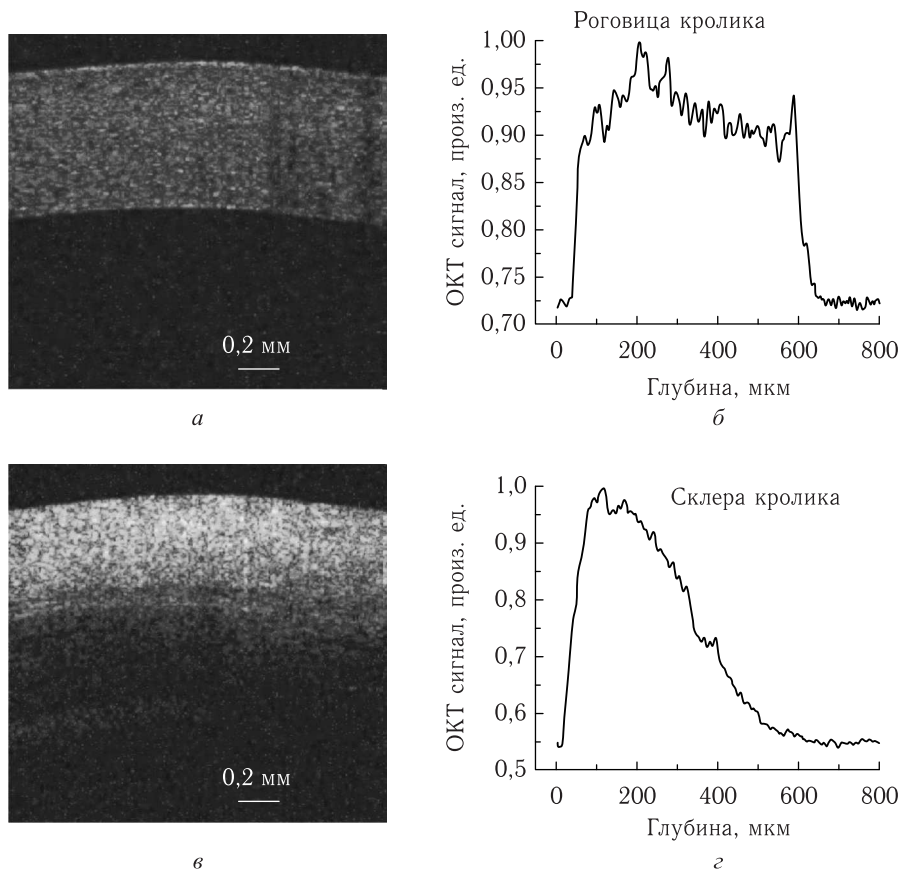


Рис. 2.40. ОКТ-изображения ($x-z$) прозрачной роговицы (*a*) и сильно рассеивающей склеры (белая ткань глазного яблока) (*б*) глаза кролика и соответствующие сигналы ОКТ (локальное отражение) от глубины сканирования в направлении z (*в*) и (*г*); x — поперечная координата, z — продольная координата (глубина объекта — ткани); размер бара на двумерной томограмме равен 0,2 мм [851, 852]

как передняя, так и задние границы ткани с примерно одинаковыми коэффициентами отражения. Видно также, что это неидеально прозрачная среда, а имеются вариации коэффициента отражения внутри ткани. Для сильно рассеивающей склеры сигнал сильно убывает по глубине, что обусловлено его ослаблением при проходе туда и обратно из-за рассеяния и поглощения, при этом задняя граница склеры практически не видна.

ОКТ-сигнал представляет собой зависимость отражательной способности объекта $R(z)$ от глубины z . Отражательная способность зависит от коэффициента отражения на заданной глубине $\alpha(z)$ и коэффициентов поглощения μ_a и рассеяния μ_s или полного коэффициента ослабления $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ среды, в которой распространяется свет. Связь между $R(z)$ и μ_t , однако, весьма сложна из-за сильного и анизотропного рассеяния в ткани. Но для оптических глубин менее 4 отраженная мощность может приближенно описываться моделью однократного рассеяния [838], т. е.

$$R(z) = P_0 \alpha(z) \exp(-2\mu_t z), \quad (2.116)$$

где P_0 — оптическая мощность в пучке, падающем на поверхность ткани. В отличие от закона Бугера–Бера (1.1), множитель 2 в показателе экспоненты учитывает тот факт, что свет дважды проходит через образец — сначала от томографа в ткань, а затем обратно при отражении назад. Оптическая глубина есть мера глубины, выраженная в средних длинах свободного пробега фотона $\sim 1/\mu_s$, т. е. $\mu_s z$. Величина $\alpha(z)$ определяется локальным показателем преломления и локальной способностью образца отражать (рассеивать) свет назад. Если предположить, что величина $\alpha(z)$ сохраняется постоянной в пределах некоторого интервала значений глубины Δz , то μ_t можно получить теоретически из измерений отражательной способности на двух различных глубинах z_1 и z_2 в пределах этого интервала:

$$\mu_t = \frac{1}{2(\Delta z)} \ln \frac{R(z_1)}{R(z_2)}, \quad (2.117)$$

где $\Delta z = |z_1 - z_2|$.

Итак, скорость убывания сигнала по глубине определяется распределением коэффициента затухания $\mu_t = \mu_s + \mu_a$. Предельная глубина зондирования рассеивающих сред невелика и сопоставима со значением транспортной длины l_{tr} , которая для биотканей определяется в основном коэффициентом рассеяния μ_s и имеет значение порядка миллиметра. Поэтому одна из главных областей применения ОКТ в медицине сегодня — это оптическая биопсия *in vivo* верхних слоев тканей (как правило, кожи и слизистых оболочек).

Широкой областью применений ОКТ является визуализация внутренней структуры глаза человека. Поскольку ткани глаза за исключением склеры и сетчатки характеризуются малыми коэффициентами экстинкции (затухания), то при зондировании глаза по всей глубине можно обеспечить высокое значение отношения сигнал/шум. Различным аспектам применения ОКТ в офтальмологии посвящено значительное количество работ [125, 183, 434, 795, 813, 814, 816, 826, 829, 837, 840, 847, 850–852, 857].

Важнейшим параметром ОКТ является разрешение по глубине, зависящее от ширины спектра источника, $\Delta z \equiv l_c$ (см. соотношение (2.115) и рис. 2.39). Улучшение разрешающей способности ОКТ систем достигается путем применения возможно более широкополосных источников и приемников излучения. В работе [856] представлено описание лабораторной ОКТ-системы с микронным разрешением. В качестве источника излучения был использован титан-сапфировый лазер, работающий в режиме синхронизации мод на керровской линзе (КЛМ-лазер) (рис. 2.41). Ширина спектра излучения такого лазера ~ 350 нм с центральной длиной волны генерации 800 нм.

Столь широкая спектральная полоса достигнута благодаря применению специально изготовленных зеркал резонатора и внутрирезонаторных компенсаторов дисперсии. Конструкция волоконно-оптического интерферометра также была оптимизирована за счет применения волоконно-оптических поляризационных элементов и фазовых компенсаторов дисперсионных искажений. В целом, измеренная полуширина функции импульсного отклика для подобной системы оказалась равной $\Delta z \cong 1,5$ мкм, что позволило визуализировать структуры биотканей с внутриклеточным разрешением. В частности, в работе приведены томографические изображения клеточных структур головастика африканской лягушки, полученные с разрешением 1×3 мкм и позволяющие идентифицировать различные органеллы внутри клеток, а также анализировать динамику развития клеточной структуры (на изображении были зафиксированы различные стадии митоза для нескольких клеток).

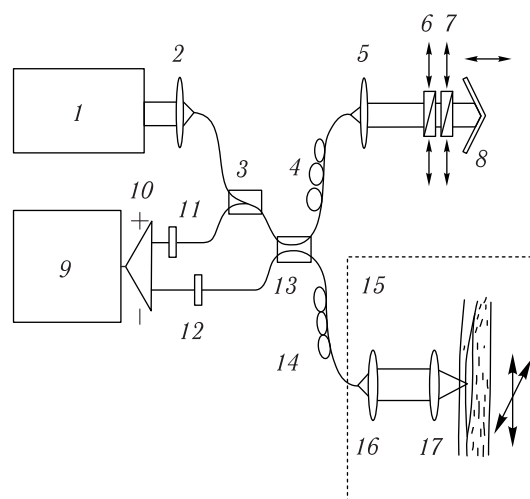


Рис. 2.41. ОКТ-система со сверхвысоким разрешением на основе титан-сапфирового лазера, работающего в режиме синхронизации мод на керровской линзе (КЛМ-лазер): 1 — лазер со средней длиной волны 800 нм и полосой ~ 350 нм; 2, 5, 16, 17 — линзы с компенсацией дисперсионных искажений; 3, 13 — волоконно-оптические разветвители; 4, 14 — волоконно-оптические поляризаторы; 6, 7 — компенсаторы дисперсионных искажений; 8 — опорное зеркало; 9 — блок обработки; 10 — усилитель; 11, 12 — детекторы; 15 — система поперечного сканирования образца [120, 856]

Использование дополнительных устройств, включая волоконно-оптические эндоскопы и катетеры, позволяет существенно расширить область применения ОКТ в биомедицинских исследованиях [16, 29, 437, 802]. В случае внутриартериального зондирования [437] поперечное сканирование исследуемого участка осуществляется путем осевого вращения световедущей системы одномодовое волокно-микропризма с помощью шагового двигателя через редуктор.

В работе [866] описаны различные варианты волоконно-оптических зондов для ОКТ-систем. Поперечное сканирование исследуемого участка в данном случае осуществляется с помощью пьезоэлектрического микросканера путем смещения выходного торца одномодового световода в предметной плоскости однолинзовой или двухлинзовой оптической системы. Размеры зоны сканирования при этом определяются используемым поперечным увеличением линзовой системы и могут меняться в зависимости от решаемых задач.

Широкие диагностические возможности ОКТ-систем в стоматологии, урологии, отоларингологии, гастроэнтерологии и других областях медицины продемонстрированы во многих книгах и обзорах [12, 13, 16, 19, 21, 25, 29, 33, 125]. Показаны также возможности ОКТ-мониторинга процессов лазерного воздействия на биоткани, включая лазерную хирургию, фотомодификацию и абляцию ткани [867–869].

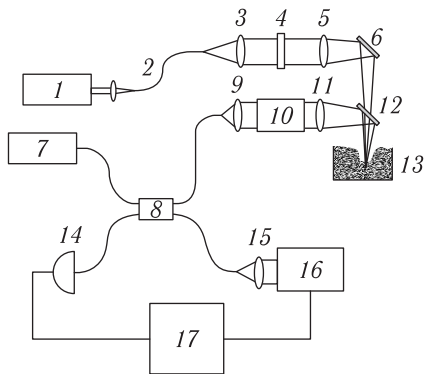


Рис. 2.42. Система лазерной абляции ткани с ОКТ-мониторингом [120, 869]: 1 — мощный аргоновый лазер для абляции ткани; 2 — волоконный световод для передачи излучения абляционного лазера; 3, 5, 9, 11, 15 — коллимирующие линзы; 4 — прерыватель пучка; 6 — поворотное зеркало; 7 — суперлюминесцентный диод; 8 — волоконно-оптический интерферометр; 10 — двухкоординатное сканирующее устройство; 12 — дихроичное зеркало; 13 — образец; 14 — детектор; 16 — оптическая линия задержки; 17 — блок обработки

Например, на рис. 2.42 приведена схема установки для лазерной абляции тканей с ОКТ-системой в качестве устройства обратной связи, позволяющей вести мониторинг процесса абляции в реальном времени [869]. Локальная абляция ткани обеспечивалась излучением аргонового лазера с мощностью 1–3 Вт с доставкой этого излучения к объекту с помощью световода и последующей фокусировкой до диаметра 0,8 мм на поверхности объекта. Ширина спектра СЛД с длиной волны 1,3 мкм, используемого в ОКТ-системе, соответствовала продольному разрешению 18 мкм (в свободном пространстве). Отношение сигнал/шум составляло 115 дБ при мощности СЛД, равной 5 мВт. Эксперименты по лазерной абляции проводились на мышечной ткани крысы при 10-секундном воздействии излучения аргонового лазера с мощностью 3 Вт. Для реконструкции трехмерного изображения зоны абляции использовалось 60 оптических сечений, полученных при сканировании образца с интервалом в 100 мкм между отдельными сечениями.

Развитие метода ОКТ привело к разработке новых модификаций ОКТ, обладающих дополнительными или новыми функциональными возможностями, в том числе спектральным сканированием по глубине (спектральная

ОКТ), визуализацией потоков (доплеровская ОКТ), получением поляризационных изображений (поляризационно-чувствительная ОКТ), высоким быстродействием при использовании лазерных источников со свипированием частоты и др. [12, 13, 16, 19, 27, 33, 41, 120, 125]. Потенциальные возможности ОКТ с двумя источниками излучения (830 нм и 1285 нм) для визуализации структуры биотканей *in vivo* рассматривались в работе [870]. В схеме были использованы 2 волоконно-оптических интерферометра Майкельсона, в опорных плечах которых стоял общий отражатель; пространственное совмещение зондирующих пучков осуществлялось с помощью дихроичной светоделительной пластинки. Двухволновая система была также использована в работе [871] для анализа локальных значений концентрации воды в модельных средах. В работе [872] рассмотрена возможность анализа ОКТ-изображений для различных длин волн в интервале 650–1000 нм с фемтосекундным титан-сапфировым лазером в качестве источника. В работе [873] описан метод детектирования в ОКТ системе с использованием спектральной селекции детектируемого излучения. Система детектирования рассеянного объектом излучения состоит из телескопа — расширителя пучка, диспергирующего элемента — дифракционной решетки и сопряженной с компьютером ПЗС-камеры. Камера регистрирует зави-

сящую от длины волны интенсивность интерференционной картины, формируемой в результате суперпозиции объектного и опорного пучков. Фурье-преобразование регистрируемых интерферограмм используется для получения томограмм. Это так называемая спектральная или фурье-ОКТ, которая не требует механического сканирования зеркала в опорном пучке. В настоящее время компания Thorlabs выпускает промышленные образцы таких томографов. На рис. 2.43 представлена оптическая схема и принцип действия такой спектральной системы ОКТ с выносным пробником для проведения исследований *in vivo*; центральная длина волны равна 930 нм, спектральная полоса на полувысоте ~ 100 нм, длина когерентности $l_c \sim 6,2$ мкм, выходная мощность ~ 2 мВт.

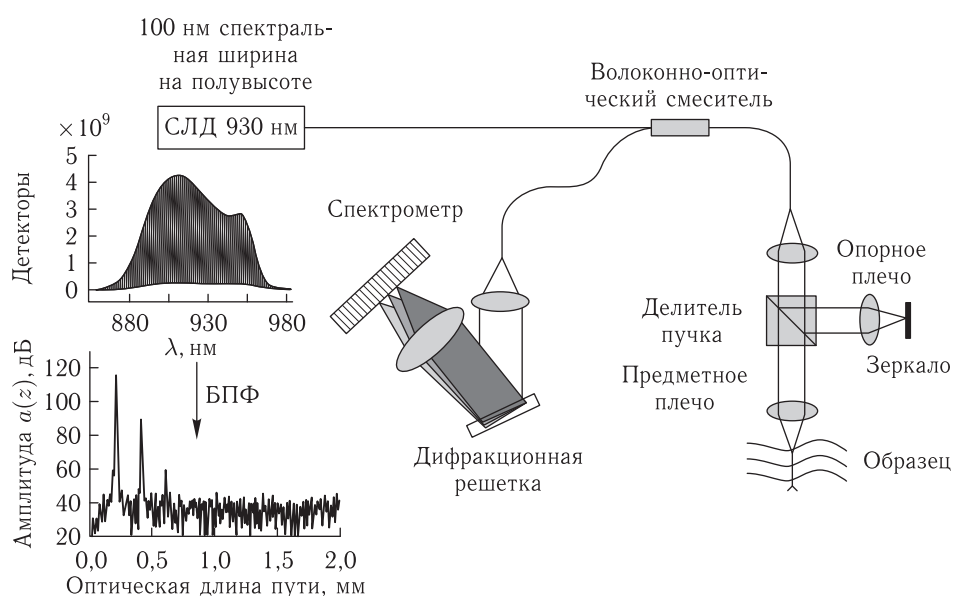


Рис. 2.43. Оптическая схема и принцип действия спектральной системы ОКТ с выносным пробником для проведения исследований *in vivo*, выпускаемой компанией Thorlabs (THORLABS Spectral Radar ОКТ); центральная длина волны суперлюминесцентного диода (СЛД) равна 930 нм, спектральная полоса ~ 100 нм, длина когерентности $l_c \sim 6,2$ мкм, выходная мощность ~ 2 мВт

Поляризационно-чувствительная ОКТ также обладает дополнительными возможностями по сравнению с классической ОКТ [19, 27, 33]. В работе [823] показано, что поляризационная селекция детектируемого излучения в низкокогерентном интерферометре, заключающаяся в формировании интерференционного сигнала с использованием ко-поляризованной либо кросс-поляризованной составляющей может быть успешно применена для дискриминации рассеивающих частиц по размерам при построении изображения объекта. Такая возможность обусловлена существенными различиями степени остаточной поляризации обратно рассеянного излучения для рассеивающих сред, состоящих из крупных и мелких частиц. В работе [796] с использованием поляризационно-чувствительной ОКТ обсуждается несколько иной подход к анализу структурных изменений кожи в результате ожога. Метод основан на анализе изменений двулучепреломления коллагена кожи в результате его термической денатурации. В системе использована модуляция поляризации излучения источника с центральной длиной волны 1310 нм и полушириной спектра 75 нм.

Детектирование интерференционных сигналов для ортогонально поляризованных составляющих детектируемого излучения при различных состояниях поляризации освещающего пучка позволяет определить параметры Стокса рассеянного объектом света и тем самым измерить оптическую анизотропию биоткани в зависимости от глубины сканирования. Визуализация структуры осуществляется путем реконструкции двумерных и трехмерных распределений разности фаз двух ортогонально поляризованных составляющих рассеянного объектом излучения. В результате анализ наклона зависимости разности фаз от глубины позволяет определить толщину пораженного ожогом слоя. В монографии [27] дан обзор результатов многих других исследований *in vitro* и *in vivo* биотканей (зубной эмали и дентина человека, свиной и куриной сердечной мышцы и др.) на основе измерений двулучепреломления на различных глубинах с помощью поляризационно-чувствительной ОКТ.

Объединение принципов ОКТ и лазерной доплеровской диагностики позволяет создать многофункциональные диагностические системы для анализа и визуализации как морфологические особенности биотканей, так и гемодинамики в биотканях на различных глубинах. К настоящему времени метод доплеровской ОКТ хорошо разработан и описан во многих статьях и монографиях [33, 438, 832, 833, 835, 836, 843]. Физические основы селективного по глубине зондирования нестационарных рассеивающих сред с динамикой рассеивающих центров, существенно различающейся на различных глубинах, с использованием частично когерентного излучения рассматривались в работе [835]. В работе [836] рассмотрена возможность доплеровской ОКТ биотканей на различных глубинах с использованием пикосекундных зондирующих импульсов лазерного излучения.

Оптическая томография со свипированием частоты излучения отличается от традиционной ОКТ использованием зондирующего излучения с длиной когерентности, существенно превышающей максимальную разность хода между интерферирующими опорным и объектным пучками [875]. Дискриминация рассеянного излучения по глубине достигается за счет непрерывной перестройки частоты зондирующего излучения по линейному закону в течение цикла сканирования. Обратное фурье-преобразование зависимости выходного сигнала детектора от мгновенной частоты зондирующего излучения позволяет получить автокорреляционную функцию распределения коэффициента отражения объекта по глубине. Свипирование частоты зондирующего излучения обеспечивается применением электрически управляемого лазерного диода (диапазон перестройки по длинам волн $\sim 0,8$ нм около 852 нм) или применением полупроводникового лазера с дифракционной решеткой в качестве внешнего зеркала резонатора (диапазон перестройки 771–791 нм) [875].

Построены более широкополосные лазерные свипируемые системы с довольно большой выходной мощностью, анализ которых дан в монографии [33]. Например, промышленно выпускаемая, построенная на базе свипируемого источника ОКТ-система OSM 1300SS Thorlabs имеет высокую скорость сканирования (получения изображений), порядка 16 кГц, выходную мощность ~ 10 мВт, среднюю длину волны 1325 нм и полосу на уровне 10 дБ больше 130 нм [33]. В работе [876] описана фазочувствительная ОКТ со свипируемым лазерным источником и ее применение для количественного определения параметров газовых пузырьков в жидкостях и моделях биотканей. При этом структурные изображения газовых пузырьков были получены с помощью обычной системы со свипированием, а для обеспечения фазовых измерений применялась система с общим оптическим путем. Система работала на средней длине волны 1315 нм с полосой ± 55 нм, фазовые измерения обеспечивали чувствительность на уровне 0,03 рад, глубина зондирования на воздухе до 6 мм и скорость сканирования для одного продольного скана (z - или A -скана) — 20 кГц. Если пространственное разрешение структурных изображений пузырьков

было порядка 10 мкм, то временной отклик фазы обеспечивал точность порядка 0,01 мкм. Метод имеет хорошее быстродействие и позволяет получать изображения движущихся пузырьков.

2.7.6. Цифровая голографическая и интерференционная микроскопия.

Еще одним примером применения лазеров и когерентных источников света в биологии и медицине является цифровая голографическая микроскопия, которая использует классический принцип голографии, но в которой в качестве регистрирующего элемента применяется цифровая камера, например ПЗС-камера [708–713]. Рис. 2.44 представляет концепцию построения инвертированного цифрового голографического микроскопа (ЦГМ), разработанного на основе промышленного исследовательского микроскопа для изучения прозрачных образцов, таких как живые клетки [713]. В качестве источника света используется лазер (вторая гармоника АИГ:Nd-лазера, $\lambda = 532$ нм), излучение которого делится на объектную волну (освещающую объект) и опорную волну. Для удобства транспортировки когерентного света используются одномодовые волоконные световоды (ВС) с сохранением поляризации. При этом для освещения объекта излучение направляется через конденсор микроскопа. Опорная волна направляется прямо в интерференционный блок, который сопряжен с одним из портов микроскопа, предназначенных для подключения камеры. Делитель пучка вносит небольшой относительный сдвиг между волновыми фронтами объектной и опорной волн. Формируемая за счет наложения этих волн голограмма регистрируется ПЗС-камерой и передается в систему обработки изображений для реконструкции цифровых голограмм и дальнейшей работы с ними. Время регистрации голограммы зависит от используемого матричного фотоприемника, которое для ПЗС-камеры обычно меньше или равно 1 мс.

В литературе описаны разнообразные методы для численной реконструкции цифровых голограмм (см., например, [877]). Голографический метод с пространственным фазовым сдвигом (ПФС) оказался вполне подходящим для использования при реконструкции цифровых голограмм, снятых в описанной выше геометрии для слегка несовпадающих волновых фронтов объектной и опорной волн [713]. Численный алгоритм ПФС позволяет устранять влияние интенсивности нулевого порядка и двойного изображения и обеспечивает компенсацию аберраций объектного волнового фронта по отношению к опорной волне. Метод ПФС в приложении к реконструкции цифровых голограмм был успешно применен для визуализации и исследования живых клеток [708, 711, 713]. Распределение интенсивности $I_{\text{НР}}(x, y, z_0)$ в плоскости голограммы НР, находящейся в плоскости $z = z_0$, формируется за счет интерференции объектной волны $O(x, y, z = z_0)$ и опорной волны $R(x, y, z = z_0)$ [713]:

$$\begin{aligned} I_{\text{НР}}(x, y, z_0) &= O(x, y, z_0)O^*(x, y, z_0) + R(x, y, z_0)R^*(x, y, z_0) + \\ &+ O(x, y, z_0)R^*(x, y, z_0) + R(x, y, z_0)O^*(x, y, z_0) = \\ &= I_O(x, y, z_0) + I_R(x, y, z_0) + \\ &+ 2\sqrt{I_O(x, y, z_0)I_R(x, y, z_0)} \cos \Delta\varphi_{\text{НР}}(x, y, z_0) \quad (2.118) \end{aligned}$$

где $I_O = OO^* = |O|^2$ и $I_R = RR^* = |R|^2$ (* обозначает комплексно-сопряженные величины). Параметр $\Delta\varphi_{\text{НР}}(x, y, z_0) = \varphi_R(x, y, z_0) - \varphi_O(x, y, z_0)$ представляет собой разность фаз между волнами O и R в плоскости $z = z_0$. При наличии объекта на оптическом пути волны O распределение фазы определяется соотношением $\varphi_O(x, y, z_0) = \varphi_{O_0}(x, y, z_0) + \Delta\varphi_S(x, y, z_0)$, где $\varphi_{O_0}(x, y, z_0)$ — фаза самой объект-

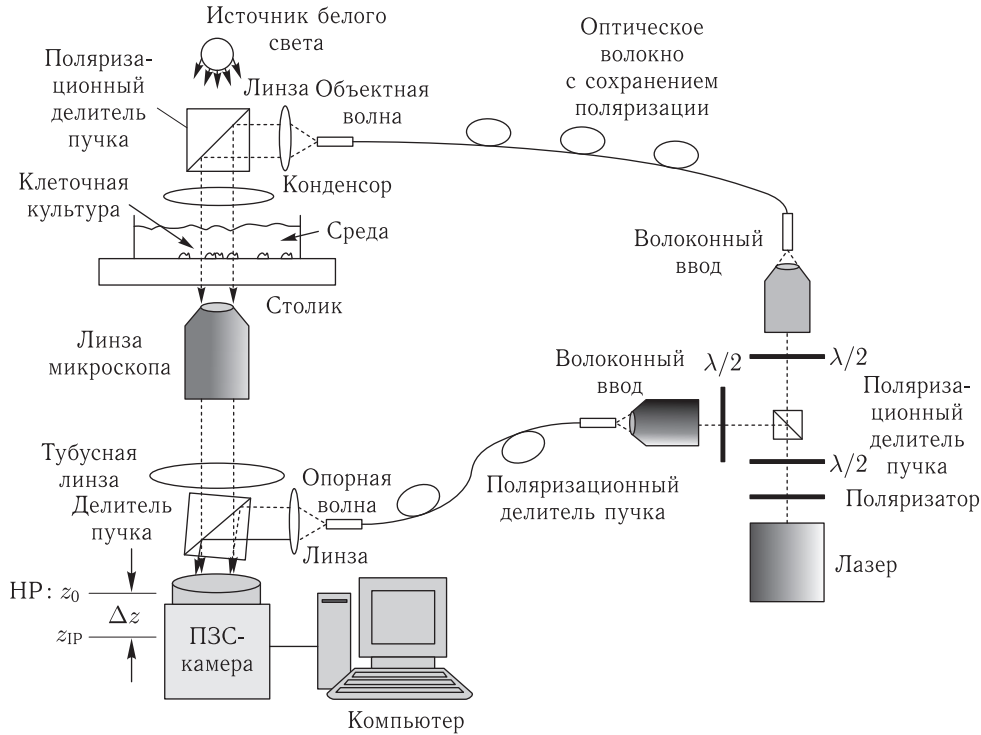


Рис. 2.44. Оптическая схема цифрового голографического микроскопа на основе инвертированного микроскопа; НР: плоскость голограммы (плоскость ПЗС) ($z = z_0$), z_{IP} – локализация изображения ($z = z_0 + \Delta z$) [713]

ной волны, а $\Delta\varphi_s(x, y, z_0)$ – изменение фазы за счет объекта. Для областей не занятых объектом $\Delta\varphi_{НР}(x, y, z_0)$ определяется математической моделью [713, 878]:

$$\begin{aligned} \Delta\varphi_{НР}(x, y, z_0) &= \varphi_R(x, y, z_0) - \varphi_{O_0}(x, y, z_0) = \\ &= 2\pi(K_x x^2 + K_y y^2 + L_x x + L_y y). \end{aligned} \quad (2.119)$$

Параметры K_x , K_y в уравнении (2.119) описывают расходимость объектной волны и свойства объективов микроскопа. Константы L_x , L_y определяют линейную разность фаз между O - и R -волнами за счет несоосной геометрии эксперимента. Для количественных фазовых измерений на основе измерений величины $I_{НР}(x, y, z_0)$ на первом этапе комплексная объектная волна $O(x, y, z = z_0)$ в плоскости голограммы определяется попиксельно путем решения системы уравнений, получающейся при подстановке уравнения (2.119) в уравнение (2.118). Для этого учитываются интенсивности соседних участков, например в пределах площади 5×5 пикселей вокруг данного голограммного пикселя, путем применения алгоритма для расчета пространственного фазового сдвига (см. [878]). Этот алгоритм основан на предположении, что только величина фазового сдвига между объектной $O(x, y, z_0)$ и опорной $R(x, y, z_0)$ волнами $\Delta\varphi_{НР}(x, y, z_0) = \varphi_R(x, y, z_0) - \varphi_{O_0}(x, y, z_0)$ быстро меняется в пространстве в области плоскости голограммы. В дополнение, интенсивность объектной волны предполагается постоянной в области вокруг заданной точки голограммы, для которой производится численная оценка. Это условие хорошо выполняется

в случае оптимального соотношения между увеличением микроскопа и используемым матричным приемником. По этой причине увеличение микроскопа выбирается из соображений, чтобы наименьшие изображаемые структуры объекта, размеры которых определяются разрешающей способностью оптической системы в соответствии с критерием Аббе, регистрировались ПЗС-камерой с некоторым запасом по занимаемой ими площади на детекторе.

Параметры K_x , K_y , L_x , L_y не могут быть получены с необходимой точностью непосредственно из анализа геометрии эксперимента, поэтому перед основными измерениями они определяются с помощью итерационной процедуры подгонки на основании предварительных исследований в отсутствие образца (см. [708]).

Также как и в случае обычного микроскопа с освещением белым светом, ЦГМ требует обеспечения условий получения резкого изображения. Однако в ЦГМ, если объект при получении голограммы не изображается резко в голографической плоскости НР, например вследствие механических или тепловых нестабильностей, можно сделать корректировку резкости изображения уже на втором этапе в процессе дальнейшего распространения объектной волны к плоскости изображений. В процессе распространения параметр Δz выбирается таким образом, чтобы голографическое амплитудное изображение было резким, в соответствии с микроскопическим изображением в белом свете. Следующим критерием для получения резкого изображения объекта является устранение влияния дифракционных эффектов при когерентном освещении, которые минимизируются алгоритмически. В результате применения этих алгоритмов и параметрической модели для разности фаз $\Delta\varphi_{\text{НР}}$ в уравнении (2.119) реконструированные голографические изображения уже не содержат вклада сигналов двойного изображения и нулевого порядка.

Из объектной волны $O(x, y, z_{\text{IP}})$, в дополнение к модулю амплитуды $|O(x, y, z_{\text{IP}})|$, который определяет обычное изображение объекта, одновременно реконструируется и фазовая информация $\Delta\varphi_S(x, y, z_{\text{IP}})$ об объекте:

$$\begin{aligned} \Delta\varphi_S(x, y, z_{\text{IP}}) &= \varphi_O(x, y, z_{\text{IP}}) - \varphi_{O_0}(x, y, z_{\text{IP}}) = \\ &= \operatorname{arctg} \frac{\operatorname{Im}\{O(x, y, z_{\text{IP}})\}}{\operatorname{Re}\{O(x, y, z_{\text{IP}})\}} \quad (\text{модуль } 2\pi). \end{aligned} \quad (2.120)$$

После устранения неопределенности, обусловленной фазой 2π [709], данные, полученные из уравнения (2.120), могут быть использованы в количественной фазово-контрастной микроскопии.

В режиме пропускания, как это показано на рис. 2.44, измеряемая фазовая информация полупрозрачного объекта определяется его толщиной и показателем преломления, а также показателем преломления окружающей среды. Для многих типов живых клеток информация о показателе преломления в литературе отсутствует, поэтому в последние годы разрабатываются новые интерферометрические и голографические методы измерения показателя преломления компонентов живых клеток и изучения связи рефракции с функциональным состоянием клетки [708–718, 879–882]. Например, методом ЦГМ были измерены интегральные значения показателя преломления нейронов [879]. В таких измерениях необходимо контролировать толщину образца [708]. Аналогичные проблемы с контролем толщины имеют место и в фазовой микроскопии на основе преобразования Гильберта при использовании микрожидкостного оборудования [880]. В работах [713, 881] были получены ЦГМ-изображения сферических клеток в суспензии и определен их радиус и интегральный показатель преломления. В работе [882] показатель преломления и размер клеток были измерены независимо с помощью двухволновой системы ЦГМ в комбинации с управлением дисперсией окружающей среды за счет добавления

внешнего красителя. В работе [710] описан метод ЦГМ-томографической рефрактометрии клеток путем регистрации множественных фазово-контрастных изображений вращающегося образца. Аналогичные результаты были получены с помощью фазовой фурье-микроскопии [714] и дифракционной микроскопии [883], когда плотный клеточный объект просвечивался в различных направлениях. Тем не менее, во всех этих случаях не было возможности провести независимые измерения толщины (размеров) и показателя преломления.

Для случая, когда клетки находятся в среде с показателем преломления n_0 , а интегральный показатель преломления клетки n_{cell} считается известным, геометрическая толщина клетки $H(x, y, z_{\text{IP}})$ может быть определена на основе измерений разницы значений оптической длины пути ($\Delta\varphi_{\text{cell}}$) при прохождении света через клетки и через окружающую клетки среду [708]:

$$H(x, y, z_{\text{IP}}) = \frac{\lambda \Delta\varphi_{\text{cell}}(x, y, z_{\text{IP}})}{2\pi} \cdot \frac{1}{n_{\text{cell}} - n_0}, \quad (2.121)$$

где λ — длина волны света. В принципе, по измеренному параметру d_{cell} можно оценить форму клеток. Тем не менее, уравнение (2.121) нужно использовать с осторожностью, поскольку, например, разнообразные токсины и осмотические реакции могут воздействовать как на размеры, так и показатель преломления клеток (см. [22, 708]).

Рисунок 2.45 иллюстрирует процесс обработки и представления зарегистрированных цифровых голограмм. Рисунки 2.45, *a* и *b* показывают цифровую голограмму живой клетки карциномы поджелудочной железы человека (Patu8988T), полученную с помощью инвертированного ЦГМ (рис. 2.44), работающего в режиме просвечивания (объектив микроскопа $40\times$, $\text{NA} = 0,65$), и реконструированное голографическое амплитудное изображение, которое соответствует изображению в микроскопе светлого поля при когерентном лазерном освещении. Рисунок 2.45, *b* представляет одновременно реконструированное изображение фазового контраста с учетом модуля 2π (уравнение (2.120)). Данные для непрерывного фазового распределения с исключенной 2π -неопределенностью, представляющие собой изменения оптической длины пути при прохождении света через клетку по сравнению с окружающей средой, представлены на рис. 2.45, *г*. Рисунок 2.45, *д* показывает псевдотрехмерное изображение клетки в шкале градаций серого. Рассчитанная на основании уравнения (2.121) толщина клетки вдоль отмеченной пунктирной линии на рис. 2.45, *г*, при $n_{\text{cell}} = 1,38$, $n_0 = 1,337$ и $\lambda = 532$ нм показана на рис. 2.45, *e*. Первая производная по координате x данных, представленных на рис. 2.45, *г*, определяет дифференциальное интерференционное фазово-контрастное ЦГМ. Этот метод сравним с хорошо известным методом дифференциального интерференционного фазового контраста Номарского, но с дополнительными достоинствами цифровой настройки фокуса и управления чувствительностью за счет цифровой подстройки сдвига.

Интерференционный фазовый микроскоп для высокоточных количественных исследований отдельных клеток представлен на рис. 2.46. Так же как и описанный выше голографический микроскоп, он построен на базе инвертированного микроскопа с одномодовыми волоконно-оптическими элементами и ПЗС-камерой в качестве детектора [884]. В качестве когерентного источника света применяется гелий-неоновый лазер с длиной волны 632,8 нм. Для обработки сигнала и получения значений оптической (или фазовой) толщины в этом микроскопе используется преобразование Гильберта — это так называемая гильбертова фазовая микроскопия (ГФМ). Концепция преобразования Гильберта в пространственном масштабе позволяет получать количественные фазовые изображения с использованием записи только одной пространственной интерферограммы. Благодаря одномоментной природе регистрации, ГФМ имеет малое время сбора данных, ограниченное только регистрирующей ап-

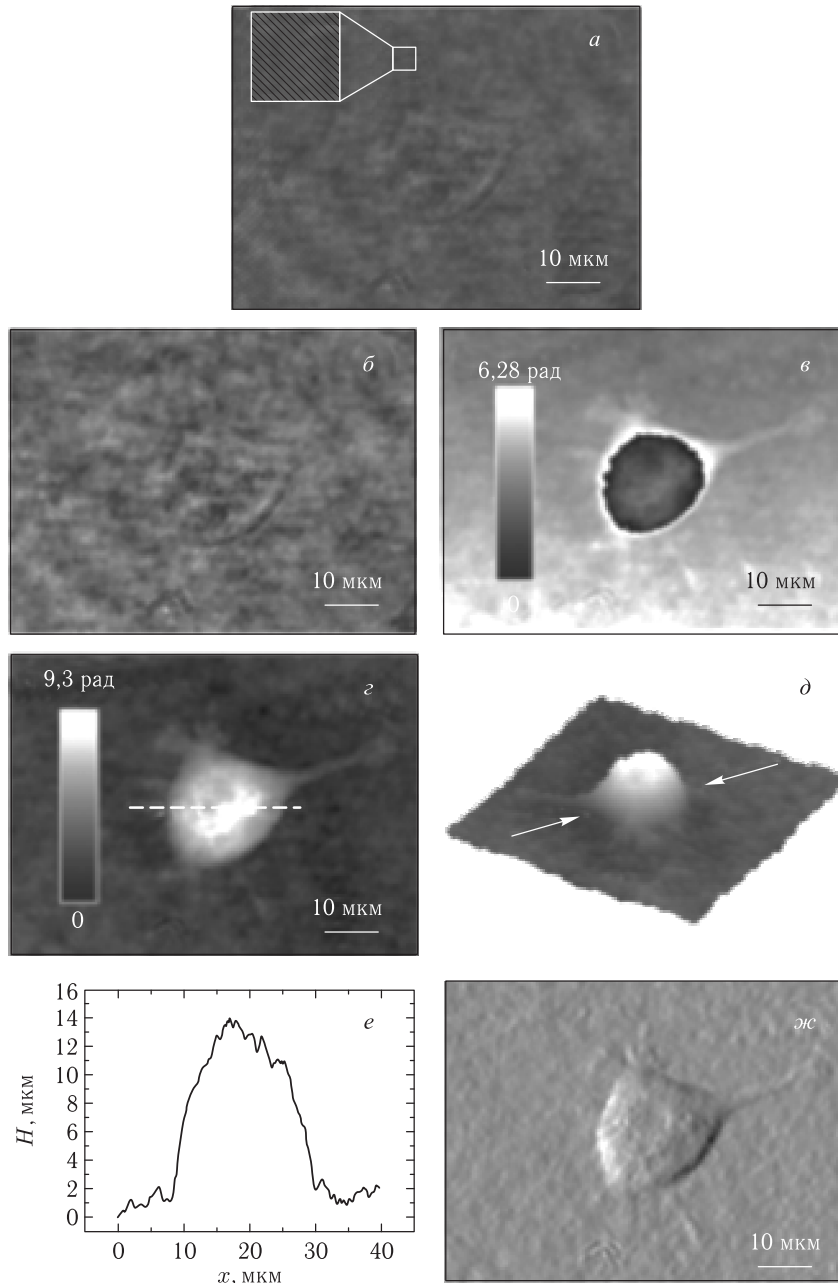


Рис. 2.45. Пример обработки и представления результатов цифровой голографической микроскопии (ЦГМ): *a* — цифровая голограмма клетки карциномы поджелудочной железы человека (Panc8988T); *б* — ее реконструированное голографическое амплитудное изображение; *в* — количественное фазово-контрастное изображение (модуль 2π); *г* — развернутое распределение фазы; *д* — псевдотрехмерное изображение развернутого фазового изображения в шкале граций серого; *е* — расчетная толщина клетки вдоль пунктирной линии изображения *г*; *ж* — дифференциальное интерференционное фазово-контрастное ЦГМ изображение клетки [713]

паратурой, и поэтому обеспечивает точные измерения сдвигов оптической (фазовой) длины на нанометровом уровне в миллисекундном или даже меньшем временном масштабе, характерных для многих биологических явлений.

В микроскопе с объективом 100× выходное поле одномодового ВС является полем освещения объекта. Все ВС зафиксированы механически, чтобы не создавать дополнительных фазовых шумов в системе. Линза настроена таким образом, чтобы изображение объекта, проходя через делительный кубик, формировалось в плоскости ПЗС-камеры. В опорном плече выходное поле другого одномодового ВС коллимируется и расширяется за счет телескопической системы, состоящей из другого объектива и той же линзы. Опорный пучок представляет собой плоскую волну, которая интерферирует с полем изображения. Опорное поле немного расстроено по направлению по отношению к объектному полю, так что однородные интерференционные полосы формируются под углом 45° по отношению к осям x и y . ПЗС-камера (С7770, Hamamatsu Photonics) имеет скорость регистрации 291 кадров/с при полном разрешении 640×480 пикселей при времени экспозиции 1–1,5 мс. Полосы регистрировались при использовании 6 пикселей на период. Пространственное распределение интенсивности, связанное с интерферограммой в одном направлении дается хорошо известным выражением:

$$I(x) = I_R + I_S(x) + 2[I_R I_S(x)]^{1/2} \cos[qx + \varphi(x)], \quad (2.122)$$

где I_R и I_S — соответственно распределения интенсивности опорного и объектного полей, q — пространственная частота модуляции полос, а $\varphi(x)$ — пространственно неоднородная фаза, обусловленная объектом, что является предметом исследования. При использовании фильтрации высоких пространственных частот и преобразования Гильберта, величина $\varphi(x)$ определяется в каждой точке одномоментного изображения. В качестве иллюстрации на рис. 2.46, б представлены динамические изображения эритроцита. Продемонстрирована возможность получения динамических изображений клеток для их морфометрии в нанометровом пространственном и миллисекундном временном масштабах. Динамический профиль геометрической толщины клетки может быть прямо получен из фазовых измерений, $H(x, y, t) = (\lambda/2\pi \Delta n)\varphi(x, y, t)$, где $\Delta n = (n_{\text{cell}} - n_0)$ — разность среднего показателя преломления клетки и окружения, которую называют контрастом показателя преломления [884] или рефракторностью [715]. Отсюда следует возможность определения мгновенного объема клетки из ГФМ-данных, $V(t) = \int H(x, y, t) dx dy$.

Таким образом, для исследования внутриклеточной динамики перспективными являются интерференционные и голографические методы и их новые модификации [708–718, 877–890]. Фундаментальное значение для диагностики функционального состояния является связь измеряемой интерференционным методом оптической разности хода с макроскопическим параметром среды — показателем преломления. Перспективность использования методов когерентной интерферометрии для исследования внутриклеточной динамики, детально обсуждается в обобщающих работах В. П. Тычинского [715–717]. Измерения рефрактерности клеток подтвердили диагностическое значение показателя преломления. Например, изменения рефрактерности при гипотоническом стрессе были обнаружены при исследованиях нейронов методом цифровой голографической микроскопии [879] (рис. 2.45). Методом гильбертовой фазовой микроскопии [884] были показаны пространственно-временные изменения фазовой толщины эритроцитов (рис. 2.46, цветная вклейка). В этой же работе при исследовании гемолиза отдельного эритроцита, было показано, что объем клетки при гемолизе снижается довольно медленно, на 50% за 4 с, что определяется ригидностью мембраны эритроцита, что также имеет диагностическую ценность.

Как мы уже обсуждали выше (см. соотношения (2.118)–(2.121)), эквивалентная модель биообъекта имеет принципиальное значение для применений интерференционных методов, для диагностики и интерпретации полученных результатов. Обычно оптически неоднородный реальный объект представляют однородной сферой с эквивалентным показателем преломления. В немногих случаях удается разделить структурные элементы и определить их рефрактерность. Вклад в оптическую разность хода (ОРХ) дают геометрическая толщина H и рефрактерность Δn , поэтому их разделение и точность определения показателя преломления объекта имеют существенное значение для обнаружения слабых эффектов. Для разделения вкладов в ОРХ геометрической толщины H и показателя преломления объекта можно, например, использовать две иммерсионные среды с известными показателями преломления [879]. Ячейка, в которой содержатся клетки, изготовленная из материала с известным показателем преломления, по сути является эталонным объектом, как по форме, так и показателю преломления. Такой подход, примененный в ГФМ с общим путем обеспечил высокую точность результатов измерений, малую чувствительность к вибрациям и миллисекундное временное разрешение [886].

Когерентные интерференционные методы из-за отсутствия необходимости использования маркеров являются существенно менее инвазивными, чем, например, флуоресцентные методы с применением красителей или наночастиц. Органеллы клеток легко различаются по фазовому контрасту. Размеры органелл, как правило, меньше или соизмеримы с длиной волны, поэтому для амплитудных оптических методов пространственное разрешение ограничено дифракцией на апертуре объектива, в то время как когерентные интерферометрические методы при исследовании фазовых объектов потенциально имеют пространственное сверхразрешение, существенно меньшее дифракционного предела [716, 890–892].

Исследования В. П. Тычинского с соавторами [715–717, 890–894] производились на разработанном ими когерентном фазовом микроскопе (КФМ) «Эйрискан», оптическая схема которого приведена на рис. 2.47. Микроскоп является модификацией микроинтерферометра Линника, в котором в качестве источника когерентного излучения используется гелий-неоновый лазер ($\lambda = 632,8$ нм). Для регистрации интерференционного сигнала и его преобразования в локальные значения фазы производилась линейно-периодическая модуляция фазы опорной волны. В качестве детектора использовался координатно-чувствительный фотоприемник (диссектор) и электронный блок с аналогово-цифровым преобразователем. Принципиальное отличие от других интерференционных методов получения фазовых изображений заключается в том, что измерения ОРХ производится последовательно в каждой точке изображения. Периодичность выборки и скорость ввода изображения определяется частотой модуляции 1 кГц (или 1 мс на пиксель), что ограничивало быстродействие системы. Полученные фазовые изображения имели высокое пространственное разрешение (до 100 нм) при получении статических фазовых изображений [715, 716, 890, 891] и до 25 нм — динамических [892]. Существенное достоинство метода состоит также в возможности произвольного доступа к точкам изображения. Рабочее поле микроскопа могло изменяться в пределах 5–50 мкм в зависимости от используемого объектива, максимальная размерность изображения по одной координате достигала 1024 пикселя. Ограниченная шумами чувствительность по оптической толщине была около $h_{\min} = 0,5$ нм.

Интерпретация фазовых изображений основана на представлении объекта в виде оптической пространственно неоднородной среды с показателем преломления $n(r, t)$ в ограниченной области пространства. Измеряемая величина — ОРХ в приближении эйконала [715] или геометрической оптики для тонкой, прозрачной и пространственно неоднородной среды (клетки) зависит от ее физической толщины H и от

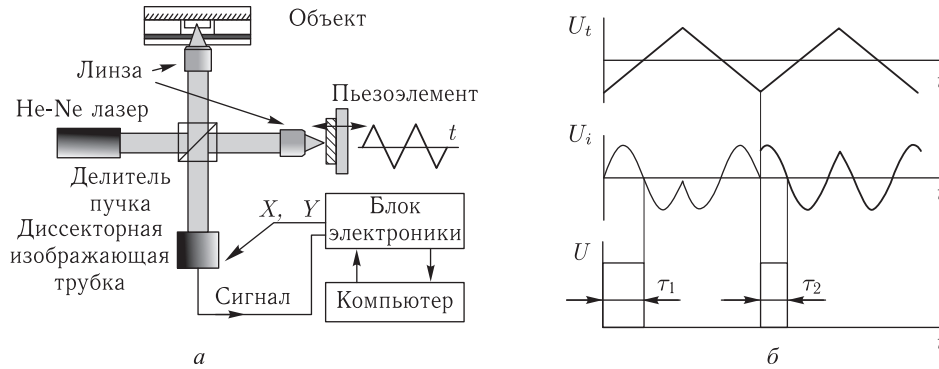


Рис. 2.47. Когерентная фазовая микроскопия [715]: *a* — когерентный фазовый микроскоп «Эйрискан» на основе интерферометра Линника и He–Ne-лазера ($\lambda = 633$ нм) с использованием линейно-периодической модуляции фазы опорной волны; фаза в каждом пикселе интерференционного изображения определяется при последовательном его сканировании координатно-чувствительным фотоприемником — диссектором ЛИ-620 («Электрон», СПб); *б* — представление сигналов модуляции и отклика интерферометра. При модуляции фазы опорной волны $U(t)$ происходит изменение интенсивности фототока $I(t)$ [$U_i(t)$]; локальное значение фазы определяется по длительности импульса τ (показаны два значения τ_1 и τ_2); периодичность выборки и скорость ввода изображения определяется частотой модуляции 1 кГц (или 1 мс на пиксель); ограниченная шумами чувствительность была около $h_{\min} = 0,5$ нм

рефрактерности — разности показателей преломления $n(r, t)$ и внешней среды n_0 (см. соотношение (2.121)). На рис. 2.48, *a* (цветная вклейка) показана модель клетки в виде локальной неоднородности с поперечными размерами d и H . Проходящая через клетку волна от когерентного источника испытывает искривление волнового фронта (пространственную модуляцию), которая в интерференционном микроскопе преобразуется в распределение ОРХ или фазовой толщины. Эта исходная информация в цифровом виде закодирована в топограмме (см. рис. 2.48, *б*). На рис. 2.48, *в, г* показаны топограмма и профиль фазовой толщины клетки культуры ткани человека НСТ 116 вдоль выбранной линии сечения. В топограмме (см. рис. 2.48, *в*) псевдоцветом выделены области различной оптической толщины, видно контрастное ядро и подчеркнута контурной линией граница клетки. В типичном сечении фазового изображения неокрашенной клетки (рис. 2.48, *г*) ядро и ядрышко хорошо различаются по оптической толщине (фазовой толщине). Цитоплазма клетки в профиле фазовой толщины имеет слабый, иногда даже отрицательный контраст, что связано с одновременным проецированием вкладов элементов многослойной структуры клетки и различных органелл в плоскость фазового изображения клетки. По этой же причине ширина области, прилегающей к границе клетки, значительно больше реальной толщины цитоплазматической мембраны.

Выше отмечалось, что фазовое изображение в плоскости (x, y) представляет собой двумерное распределение оптической разности хода $h(x, y, t) = \int (n(x, y, z, t) - n_0) dz$, которое зависит в основном от разности показателей преломления объекта $n(x, y, z, t)$ и внешней среды n_0 . Контраст фазовых изображений органелл растет с их рефрактерностью Δn , которая равна средней разности показателей объекта $\langle n(x, y, z, t) \rangle$ и n_0 иммерсионной среды. Однако это соотношение может быть использовано только в том случае, если есть априорная информация о размерах неоднородности и объеме, в котором определено среднее значение $\langle n(x, y, z, t) \rangle$. В том случае, когда усреднение предполагается по всему объему объекта, максимальная фазовая толщина Δh может быть представлена как $\Delta h = \Delta n H = (\langle n(x, y, z, t) \rangle - n_0) H$.

Во многих случаях приближение сферической или цилиндрической форм неоднородности вполне корректно и измеряемый в фазовом изображении поперечный размер d может использоваться в качестве «эквивалента» геометрической толщины H [879, 880]. Для определения рефрактерности как информационной величины, можно использовать приближение $H \cong d$ [715], для которого $\Delta n = \Delta h/H \cong \Delta h/d$, где Δh — максимальная фазовая толщина, d — поперечный размер в фазовых изображениях.

Интенсивные флуктуации регистрируемых сигналов во времени наблюдались обычно на крутых участках профиля фазовой толщины и были связаны с метаболической активностью клетки [715]. Регистрация во времени таких флуктуаций для определенной локальной области клетки является основой метода динамической фазовой микроскопии. Иллюстрация метода представлена на рис. 2.49 (цветная вклейка) [715]: на фазовом изображении (топограмме) производятся периодически в течение времени порядка десятков секунд измерения профиля фазовой толщины вдоль скан-линии с фиксированным интервалом (от единиц до сотен миллисекунд) и данные записываются в виде матрицы $h(x, t)$ (трек-диаграммы) в память компьютера. Как следует из данных рис. 2.49, например, в сечении трек-диаграммы наблюдаются характерные флуктуации в окрестности ядерной мембраны и в области ядрышка.

2.7.7. Генерация второй гармоники. Использование лазерного излучения принципиально для генерации второй гармоники (ГВГ) в биологических тканях и клеточных структурах. В настоящее время это один из новых высоко разрешающих нелинейно-оптических методов визуализации для изучения интактных тканей и клеточных структур [719–737, 895]. Так же как и в случае многофотонной флуориметрии, метод ГВГ имеет несколько важных преимуществ перед методами линейной спектроскопии и визуализации, поскольку возбуждающий свет лежит в ближнем инфракрасном диапазоне длин волн, который сравнительно мало рассеивается тканью, а генерация второй гармоники происходит уже в самой среде в локальной области сфокусированного лазерного пучка. Тем самым достигается высокое пространственное разрешение, приемлемая во многих случаях глубина зондирования и развязка сигнала возбуждения и детектирования. Жестко сфокусированные лазерные пучки с высокой плотностью мощности и с очень короткой длительностью импульса в диапазоне десятков и сотен фемтосекунд позволяют обеспечить генерацию гармоник в живой ткани практически без какого-либо ее повреждения, благодаря малому времени взаимодействия излучения с тканью и малой энергии, недостаточной для ионизации молекул (см. рис. 2.50, цветная вклейка).

ГВГ представляет собой нелинейный оптический процесс второго порядка, который может происходить только в средах, не имеющих центральной симметрии. Метод может использоваться для получения изображений высокоупорядоченных структурных белков без каких-либо экзогенных меток, а также для зондирования биологических мембран с высокой специфичностью к типу мембраны.

Коллаген, являющийся основным компонентом соединительных тканей, обладает заметной нелинейной восприимчивостью для ГВГ. Было показано, что в нелинейной восприимчивости второго порядка у коллагена доминирующей является компонента вдоль оси волокна. В таких многокомпонентных средах, как кожа, ГВГ происходит главным образом внутри дермы, а не в таких клеточных слоях, как эпидермис или подкожный жир.

В общем случае нелинейная поляризация среды выражается как [723]

$$P = \chi^{(1)}\mathbf{E} + \chi^{(2)}\mathbf{E}\mathbf{E} + \chi^{(3)}\mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E} + \dots, \quad (2.123)$$

где P — индуцированная поляризация среды, $\chi^{(n)}$ — нелинейная восприимчивость n -го порядка, \mathbf{E} — вектор напряженности электрического поля падающего света. Первый член описывает линейное поглощение и отражение света, второй — ГВГ, генерацию суммарных и разностных частот, а третий — двух- и трехфотонное поглощение и генерацию третьей гармоники.

В отличие от двухфотонной флуоресценции (см. подраздел 1.6.2) ГВГ не возникает в результате процесса поглощения. Вместо этого интенсивное поле лазера индуцирует нелинейную поляризацию второго порядка в ансамбле молекул, в результате чего получается когерентная волна точно на удвоенной частоте (или с половинной длиной волны) падающего света. Для ГВГ и спектральные, и временные характеристики зависят от лазерного источника: ширина полосы равна $1/\sqrt{2}$ от ширины полосы возбуждающего лазера и, благодаря когерентности процесса, импульс ГВГ во времени развивается синхронно с возбуждающим импульсом.

Упрощенное выражение для интенсивности сигнала ГВГ имеет вид [723]

$$I(2\omega) \propto \left[\chi^{(2)} \frac{E(\omega)}{\tau_p} \right]^2 \tau_p, \quad (2.124)$$

где $\chi^{(2)}$ — нелинейная восприимчивость второго порядка материала ткани или клетки, $E(\omega)$ и τ_p — энергия и длительность лазерного импульса соответственно. Сигнал квадратичен по пиковой мощности, и поскольку ГВГ — мгновенный процесс, сигнал генерируется только на протяжении лазерного импульса. Макроскопическое значение $\chi^{(2)}$ выражается через молекулярную гиперполяризуемость β как

$$\chi^{(2)} = \rho_M \langle \beta \rangle, \quad (2.125)$$

где ρ_M — плотность числа молекул, а угловые скобки означают усреднение по ориентациям. Поскольку $\langle \beta \rangle$ обнуляется для изотропного распределения дипольных моментов, то соотношение (2.125) отлично от нуля только в случае отсутствия центра симметрии в среде. Как следует из (2.124) и (2.125), сигнал ГВГ зависит от квадрата плотности числа молекул.

Одна из последних разработанных схем ГВГ-визуализации представлена на рис. 2.50. Она существенно отличается от известных схем возможностью возбуждения ГВГ-сигнала в произвольной точке по выбору оператора, тем самым возможностью осуществлять оптический мониторинг локальных быстропротекающих процессов, связанных с изменениями мембранных потенциалов, одновременно с наблюдениями в пределах большого поля зрения микроскопа. Система построена на базе фемтосекундного волоконного лазера и электронно-управляемых акустооптических дефлекторов лазерного пучка. Такой ГВГ-микроскоп позволяет регистрировать метаболические процессы с характерными длительностями порядка ~ 1 мс и получать сигналы потенциала активности нескольких нейронов одновременно в пределах широкого поля зрения (150×150 мкм) и с достаточно большой глубины срезов живого мозга.

2.7.8. Терагерцовая спектроскопия. Терагерцовый частотный диапазон, занимающий промежуточное положение между ИК и микроволновым диапазоном (1 ТГц $\rightarrow 1$ пс $\rightarrow 300$ мкм $\rightarrow 33$ см $^{-1}$ $\rightarrow 4,1$ мэВ $\rightarrow 47,6^\circ$ К) частот, сравнительно мало исследован во всей шкале электромагнитных волн, от радиочастотного до рентгеновского диапазона (см. рис. 1.2). Эффективные источники излучения появились только в последние два десятилетия, в основном благодаря развитию лазеров со сверхкороткими импульсами. Возбуждаемое лазерными импульсами терагерцовое (ТГ) излучение является перспективным для применений в биологии и медицине, поскольку: 1) многие колебательные переходы важных биомолекул находятся именно

в этом диапазоне; 2) неоднородности, характерные для биотканей и приводящие к сильному рассеянию электромагнитного излучения в видимой и ближней инфракрасной области, не дают значительного рассеяния; 3) рефракция компонентов биотканей сильно различается между собой; 4) возбуждение сверхкороткими импульсами позволяет исследовать широкий диапазон частот за одно измерение и обеспечивать высокое разрешение по времени [896–901]. Поэтому разработка спектроскопических методов исследования биологических тканей в ТГц-диапазоне частот, обеспечивающих детектирование и визуализацию метаболических и патологических процессов, вызывает в последние годы высокий интерес. Кроме того, ТГц-спектроскопия позволяет в одном измерении определять комплексный показатель преломления исследуемой среды, что важно для создания функционального ТГц-томографа с высокой чувствительностью к изменению концентрации метаболитов и точным маркированием границ патологического процесса.

Известно достаточно много методов генерации импульсного ТГц-излучения, в которых используют фотопроводящие антенны, поверхность полупроводника или нелинейные кристаллы в качестве преобразователя коротких импульсов лазерного излучения в ТГц-диапазон. В первых двух случаях генерация излучения обуславливается созданием нестационарной электронно-дырочной фотопроводимости полупроводника под действием импульсов света и всплеском фототока под действием внешнего или внутреннего электрического поля [898]. В последнем случае происходит генерация разностной частоты (оптическое выпрямление) в нелинейном кристалле [899]. Детектирование ТГц импульса (ТГИ) производится в аналогичной фотопроводящей антенне или на основе электрооптического эффекта в нелинейном кристалле [899]. Поле ТГИ наводит двулучепреломление в кристалле, при этом, изменение поляризации пробного лазерного импульса пропорционально амплитуде поля ТГИ в данный момент времени. В эксперименте измеряется разница в мощности ортогональных компонент поляризации пробного лазерного импульса либо ток, наведенный в антенне в зависимости от временной задержки между ТГц и пробным оптическим импульсом. Чувствительность детектора, так же как и эффективность генератора ТГИ, определяется параметрами фазового синхронизма, величиной нелинейной восприимчивости, длиной кристалла и длительностью лазерного импульса. При замене полупроводниковых устройств на нелинейно-оптические диапазон оптимальной работы спектрометра ($0,5 \pm 0,45$ ТГц) сдвигается в высокочастотную область ($2 \pm 1,5$ ТГц).

Одна из схем ТГц импульсного спектрометра представлена на рис. 2.51 [900]. Тип детектора и генератора ТГИ выбирались в зависимости от характера поглощения образца и интересующего диапазона частот [901]. Например, для измерений в диапазоне 2,5–3,5 ТГц использовалось излучение лазера на длине волны $\lambda = 790$ нм с длительностью импульса $\tau = 90$ фс, а в качестве генератора и детектора, соответственно, поверхность полупроводника, выращенная при низкой температуре LT-GaAs, и электро-оптический детектор на основе кристалла ZnTe (110) толщиной 0,3 мм. С помощью преобразования Фурье из измеренного временного профиля ТГИ вычисляется комплексный спектр, содержащий информацию о показателях преломления и поглощения среды, через которую прошел ТГИ. Например, в работе [897] использовалась временная выборка из 1024 точек, длительностью 50 пс, со временем накопления сигнала в каждой точке 300 мс. Это позволяло проводить измерения с соотношением сигнал/шум больше 10^2 для частот в спектральном диапазоне от 0,3 до 2,5 ТГц и со спектральным разрешением порядка 10 ГГц. Лазерные (и ТГц) импульсы следуют с интервалом 12 нс, при этом энергия ТГИ, который зондирует биологическую ткань, составляет порядка 10^{-13} Дж; такая малая энергия импульса не должна оказывать воздействия на ткань. Даже в случае резонансного поглощения малая доля спектральных компонент импульса поглощается в образце.

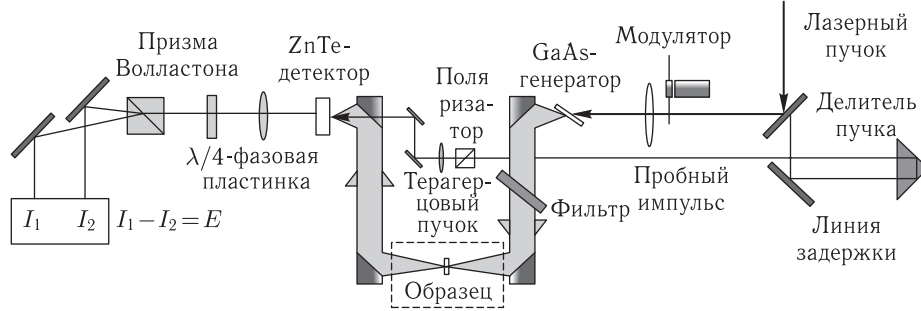


Рис. 2.51. Схема импульсного терагерцового спектрометра при возбуждении фемтосекундным излучением лазера [897]

Отличительной особенностью импульсной ТГ-спектроскопии является возможность непосредственного измерения величины и направления электромагнитного поля, что дает возможность получать информацию об амплитуде и фазе поля прошедшего импульса и далее вычислять показатели преломления, поглощения и дисперсию исследуемой среды. Чтобы вычислить оптические свойства ткани нужно провести реконструкцию оптических параметров по измеренным спектрам пропускания $T(\omega)$. Из эксперимента, после преобразования Фурье временных профилей импульсов получают амплитуду поля ТГИ, падающего на образец, $E_{\text{пад}}(\omega)$ и прошедшего через него, $E_{\text{пр}}(\omega)$, и рассчитывают спектральный коэффициент пропускания образца:

$$T(\omega) = \frac{E_{\text{пад}}}{E_{\text{пр}}} = T_0(\omega) \cdot \text{FP}(\omega) \cdot \text{RL}(\omega), \quad (2.126)$$

где $T_0(\omega)$ содержит основную информацию о среде, через которую прошел ТГИ (коэффициенты поглощения и преломления образца):

$$T_0(\omega) = \exp\{-i(n_{\text{обр}} - n_{\text{воз}})d\omega/c\}; \quad (2.127)$$

$\text{FP}(\omega)$ описывает импульсы переотражения в параллельной пластинке — моды Фабри–Перо:

$$\text{FP}(\omega) = \{1 - R(\omega)^2 \exp(-i2n_{\text{обр}}d\omega/c)\}^{-1}; \quad (2.128)$$

$\text{RL}(\omega)$ описывает потери на отражение на границах образца:

$$\text{RL}(\omega) = \frac{4n_{\text{обр}}n_{\text{воз}}}{(n_{\text{обр}} + n_{\text{воз}})^2} = 1 - R(\omega)^2. \quad (2.129)$$

Здесь использованы комплексные показатели преломления, обозначенные как $n(\omega) = n'(\omega) - i \cdot n''(\omega)$ для соответствующей среды, где поглощение учтено в мнимой части $n''(\omega) = \alpha(\omega) \cdot c/\omega$; $\omega = 2\pi f$ — циклическая частота, $R(\omega) = (n_{\text{обр}} - n_{\text{воз}})/(n_{\text{обр}} + n_{\text{воз}})$ — комплексный коэффициент отражения, c — скорость света, $n_{\text{обр}}$ и $n_{\text{воз}}$ — показатели преломления образца и воздуха, соответственно; $n_{\text{воз}} \approx 1$; α — показатель поглощения для поля, который вдвое меньше показателя поглощения для мощности.

В предположении, что $\text{RL}(\omega) \approx \text{const}$, $\text{FP}(\omega) \approx 1$, из уравнения (2.126) можно получить [897]

$$\alpha(\omega) = \frac{\ln|T(\omega)|}{d} + \frac{\ln[1 - (R_{\text{ср}})^2]}{d}, \quad (2.130)$$

где $R_{\text{ср}} = (n_{\text{ср}} - 1)/(n_{\text{ср}} + 1)$ — коэффициент отражения, для действительной части показателя преломления образца усредненной в диапазоне измеряемых частот.

Усредненный показатель преломления n_{cp} определяется по задержке импульса Δt при распространении через образец:

$$n_{\text{cp}} = 1 + \Delta t \cdot \frac{c}{d}, \quad (2.131)$$

а частотная зависимость показателя преломления $n'(\omega)$ рассчитывается из соотношения

$$n'(\omega) = \arg[T(\omega)] \cdot \frac{c}{\omega \cdot d} + 1. \quad (2.132)$$

В более строгом приближении необходимо учитывать переотражения на гранях образца — моды Фабри-Перо [900], это важно в случае большого показателя преломления и тонких пластинок исследуемых образцов, например при измерении спектров срезов зубов и спектров прессованных таблеток сахаров и других биологически важных веществ.

Для анализа характеристических линий поглощения веществ, содержащихся в биотканях или биожидкостях, можно привлечь простую модель для диэлектрической проницаемости в виде суммы лоренцевских осцилляторов [897]:

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_0 + \sum_j \frac{f_j \omega_j^2}{(\omega_j^2 - \omega^2) - i\gamma_j \omega}, \quad (2.133)$$

где ω_j , γ_j , f_j — суть собственные частоты, коэффициенты затухания и силы осцилляторов соответственно, ε_0 — диэлектрическая проницаемость вещества на низких частотах, j — номер резонанса в выбранном диапазоне частот.

Для ряда объектов спектроскопия пропускания плохо применима из-за сильного поглощения (например, ткани содержащие воду) или из-за больших размеров объекта (*in vivo*). В таком случае обычно используют спектроскопию отражения, когда измеряется комплексный коэффициент отражения $\tilde{R}_p(\omega)$, содержащий информацию о показателях поглощения и преломления среды:

$$\tilde{R}_p(\omega) = \frac{n^2(\omega) \cos(\vartheta) - \sqrt{n^2(\omega) - \sin^2(\vartheta)}}{n^2(\omega) \cos(\vartheta) + \sqrt{n^2(\omega) - \sin^2(\vartheta)}}, \quad (2.134)$$

характеризуемый амплитудой R и фазой φ ; $\tilde{R}_p = R \cdot e^{i\varphi}$, где индекс p обозначает поляризацию излучения в плоскости падения, ϑ — угол падения луча, отсчитанный от нормали. Здесь использованы формулы Френеля, с учетом комплексной составляющей показателя преломления.

При исследовании биотканей важна глубина зондирования и учет слоистости среды. Соотношение (2.134) позволяет получить информацию только о границе раздела (эффективная глубина, где формируется отраженный сигнал, — десятки микрон). Однако при исследовании слоистых тканей, таких как кожа, например, при толщинах слоев порядка 100 мкм и более можно разделять отраженные от разных поверхностей импульсы во времени. Далее можно применять соотношение (2.134) для каждого слоя со своим коэффициентом отражения и учетом объемных параметров среды (слоя) между поверхностями, через которую дважды проходит излучение. В видимом диапазоне частот такая методика развита, например, для трехслойной модели кожи [902], которая вполне может быть адаптирована для терагерцового диапазона.

Для исследования мягких тканей или водных растворов можно использовать спектроскопию отражения в условиях полного внутреннего отражения (ПВО), которая использует именно нарушение условий ПВО за счет взаимодействия с исследуемым веществом, поэтому метод называется «нарушенное ПВО» или НПВО.

В такой схеме можно обеспечить зондирование по глубине за счет изменения проникновения поля в вещество. Для реализации метода НПВО можно использовать призму Довэ, изготовленную из кремния с параметрами: основание $1,5 \times 2$ см, угол при вершине 90° [897]. Коэффициент преломления у кремния в терагерцовом диапазоне составляет 3,42, дисперсия и поглощение практически отсутствуют. Данная призма помещается в параллельный пучок терагерцового излучения, при этом она не меняет направления пучка. В качестве опорного сигнала используется отражение от чистого основания призмы, а в качестве измерительного — сигнал, полученный, когда исследуемый объект плотно соприкасается с основанием призмы. Основное преимущество метода НПВО перед отражательной спектроскопией заключается в простоте измерения опорного спектра (без вещества), кроме того амплитуда коэффициента отражения близка к единице. Основная сложность метода НПВО — это необходимость решения проблемы оптического контакта при исследовании твердых образцов, поскольку наличие прослойки воздуха всего в 10 мкм уже критично. Формулы Френеля, описывающие спектр отражения, остаются применимыми и для случая НПВО, только нужно учесть показатель преломления материала призмы $n_{пр}$, и заменить n на $n/n_{пр}$ в формуле (2.134).

На рис. 2.52 показаны спектры отражения кожи человека, снятые *in vivo* методом НПВО. Поскольку высокая чувствительность метода обеспечивается в поверхностном слое ткани до 10 мкм, то кожа зондируется только на глубину рогового слоя. В этом слое содержание воды минимально и равно 15% (вес/вес), а основное содержание составляют белки (70%) и липиды (15%) [189], поэтому спектр отражения кожи существенно отличается от спектра отражения воды.

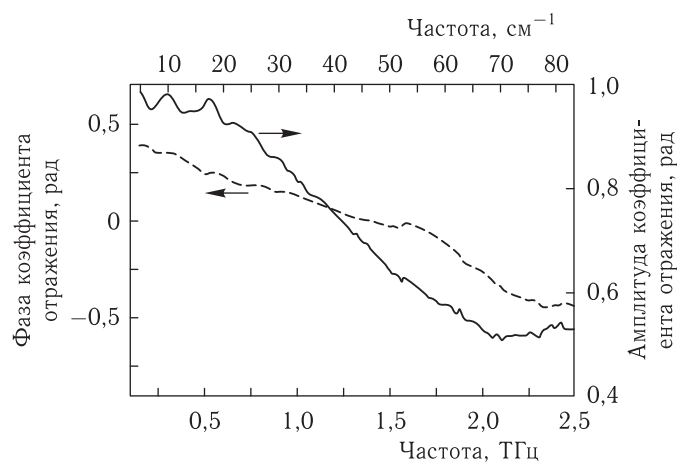
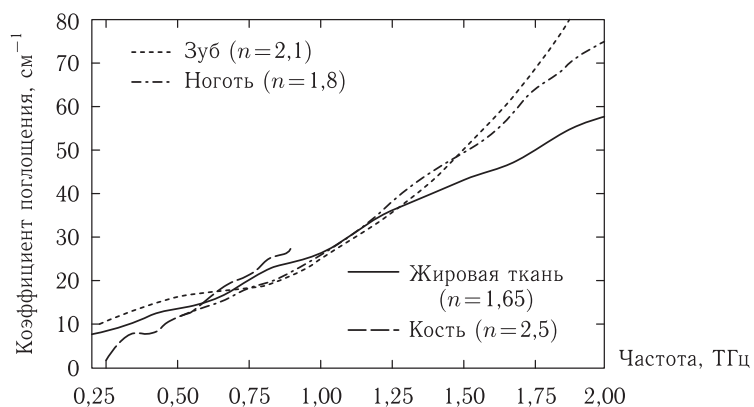
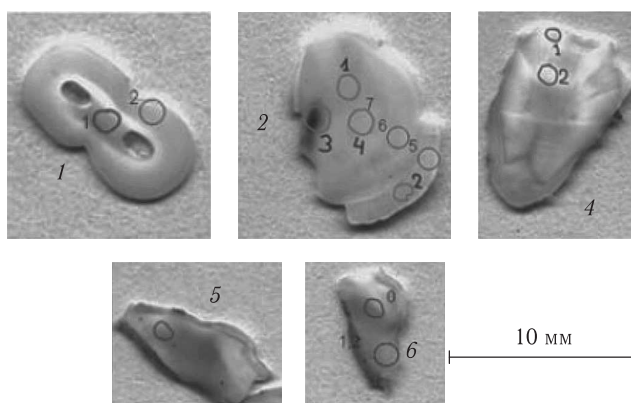
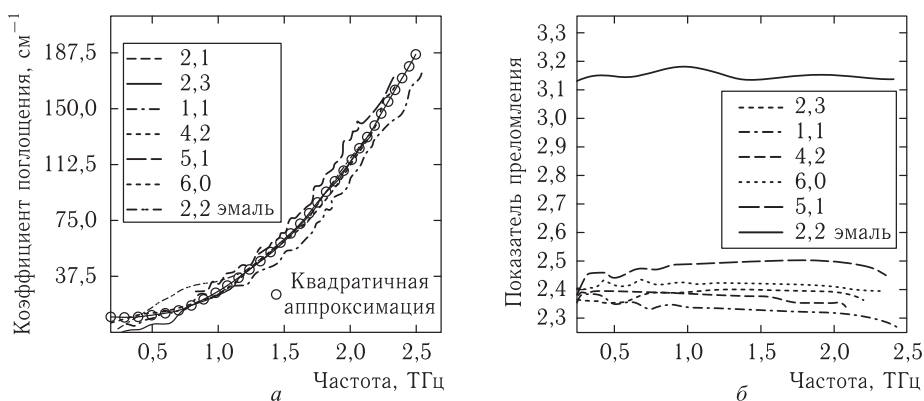


Рис. 2.52. Терагерцовые спектры для амплитуды и фазы коэффициента отражения кожи руки волонтера (мужчина, 32 года, белый, ладонь у основания большого пальца), измеренные методом НПВО [897]

Отметим хорошую прозрачность жиров, слабовыраженную дисперсию и характерные особенности в спектре поглощения в районе 2–2,5 ТГц. Отсюда следует, что с помощью импульсной ТГц-спектроскопии, по задержке ТГц-импульсов, отраженных от границ слоя, по-видимому, можно будет измерять толщину жирового слоя [897]. Исследования ряда биологических тканей (рис. 2.53) показали высокое и сравнимое между собой поглощение, но довольно значительное различие в показателе преломления в исследуемом диапазоне частот. Существенная дифференциация по

Рис. 2.53. Терагерцовые спектры поглощения некоторых биотканей, измеренные *in vitro* [897]

а

Рис. 2.54. Спектры поглощения (а) и показателя преломления (б) различных участков образцов зубов человека, рассчитанные на основе измерений спектров пропускания с использованием спектрометра, представленного на рис. 2.51; диаметр пучка ТГ-излучения в области образца порядка 2 мм. Первая цифра соответствует номеру образца, а вторая обозначенному на этом образце участку (в) [897]

показателю преломления различных тканей дает возможность измерять амплитуды импульсов отраженных от границ различных слоев, что важно как для идентификации сигналов, несущих спектроскопическую информацию, так и для построения томографических схем.

Мониторинг патологических изменений тканей зуба можно провести с помощью ТГ-спектроскопии. В качестве примера на рис. 2.54 приведены спектры поглощения и показателя преломления различных участков зуба образцов человека, рассчитанные на основе измерений спектров пропускания с использованием спектрометра, представленного на рис. 2.51. Усредненный (по измеряемым частотам) показатель преломления практически одинаков ($n = 2,4$) для всех участков дентина и существенно отличается для эмали ($n = 3,2$). При этом дисперсия показателя преломления [900] имеет небольшие отличия в разных областях зуба. Спектр поглощения может быть аппроксимирован квадратичной зависимостью $\alpha(f) = A + B_1 \cdot f + B_2 \cdot f^2$ (в диапазоне 0,2–2,5 ТГц). Усредненные величины коэффициентов A , B_1 , B_2 соответственно равны 13, -21 и 36, если f измеряется в ТГц, а α — в см^{-1} . Показатель преломления для многих приложений можно считать постоянным.

Глава 3

ИЗМЕРЕНИЕ И УПРАВЛЕНИЕ ОПТИЧЕСКИМИ СВОЙСТВАМИ БИОТКАНЕЙ

3.1. Методы измерения оптических параметров биотканей

Существует много разнообразных методов определения оптических параметров биотканей [1–3, 12, 13, 30–32, 73, 250, 682, 903–937]. Эти методы можно разделить на два больших класса: прямые и косвенные. К прямым методам относятся методы, в основе которых лежат базовые понятия и определения, например закон Бугера–Бера (см. (1.1)), фазовая функция однократного рассеяния (см. (2.5)) для тонких образцов или эффективная глубина проникновения света для объемных сред. Измеряемыми параметрами являются коллимированное пропускание и индикатриса рассеяния для тонких образцов или освещенность внутри объемной среды. Достоинства этих методов заключаются в чрезвычайной простоте аналитических выражений, используемых при обработке данных: соответственно формулы (1.1) и (2.5) при нахождении коэффициента экстинкции и фактора анизотропии рассеяния или формулы (2.20) и (2.21) при нахождении диффузионной длины свободного пробега фотона. Недостатки прямых методов связаны с необходимостью строгого выполнения условий эксперимента, соответствующих модели: однократности рассеяния для тонких образцов, исключения влияния поляризации света и преломления света на гранях кюветы и т. п.; для объемных сред с многократным рассеянием детектор, регистрирующий освещенность (обычно волоконный световод с изотропно-рассеивающим шариком на торце), должен быть расположен вдали от источника света и границ среды.

Косвенные методы предполагают решение обратной задачи рассеяния на основе использования той или иной теоретической модели распространения света в среде. В свою очередь, косвенные методы делятся на итерационные и неитерационные. Неитерационные методы используют уравнения, в которых оптические свойства определяются через параметры, непосредственно связанные с измеряемыми величинами. Модели Кубелки–Мунка, трех-, четырех- и семипотоковые [1–3, 12, 31, 73, 79, 89, 245, 426, 450, 474] лежат в основе косвенных неитерационных методов. В косвенных итерационных методах оптические свойства выражаются неявно через измеряемые параметры. Величины, определяющие оптические свойства рассеивающей среды, перебираются до тех пор, пока расчетные значения отражения и пропускания не будут с заданной точностью совпадать с измеренными. Эти методы являются громоздкими, однако используемые оптические модели могут быть существенно более сложными, чем в случае неитерационных методов, примерами являются диффузионная теория [1–3, 12, 13, 31, 73, 245, 907], инверсный метод добавления–удвоения (adding–doubling) [905] или инверсный метод Монте-Карло [214, 426–429, 474, 906, 910, 911].

Для измерений оптических параметров биотканей (μ_a , μ_s и g) используют различные методы. Наибольшее распространение при измерениях параметров образцов биотканей *in vitro* имеет метод двух интегрирующих сфер в сочетании с измерениями коллимированного пропускания [90, 903–907, 911]. Схематически метод измерения представлен на рис. 3.1, он заключается в последовательном или одновременном

измерении трех параметров: коллимированного пропускания T_c , определяемого соотношением (1.1), полного пропускания $T = T_c + T_d$ (T_d — диффузное пропускание) и диффузного отражения R_d . Для определения оптических параметров ткани из этих измерений можно использовать различные теоретические соотношения или численные методы (двух- и многопоточковые модели, инверсные методы Монте-Карло), устанавливающие связь μ_a , μ_s и g с измеряемыми параметрами. В простейшем случае берут двухпоточковую модель Кубелки–Мунка, которая базируется на следующих соотношениях [70, 73]:

$$S = \frac{1}{bd} \ln \left[\frac{1 - R_d(a - b)}{T_d} \right];$$

$$K = S(a - 1); \quad a = \frac{1 - T_d^2 + R_d^2}{2R_d}; \quad b = \sqrt{a^2 - 1}; \quad (3.1)$$

$$K = 2\mu_a; \quad S = \frac{3}{4}\mu_s(1 - g) - \frac{1}{4}\mu_a;$$

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s; \quad \mu'_s = \mu_s(1 - g) > \mu_a.$$

Определение μ_t из измерений коллимированного пропускания на основании соотношения (1.1) позволяет с помощью экспериментальных данных для T_d и R_d найти все три параметра ткани: μ_a , μ_s и g .

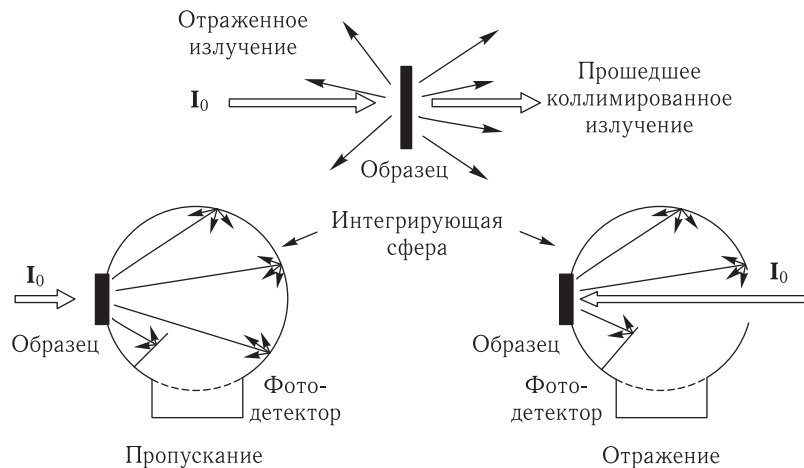


Рис. 3.1. Схематическое представление метода интегрирующих сфер для измерения параметров биотканей *in vitro* [90]

Любые три измерения из последующих пяти вариантов достаточны для определения всех трех оптических параметров [73]:

- 1) полное (или диффузное) пропускание для коллимированного или диффузного облучения,
- 2) полное (или диффузное) отражение для коллимированного или диффузного облучения,
- 3) поглощение образца, помещенного внутри интегрирующей сферы,
- 4) коллимированное пропускание (нерассеянного света),
- 5) угловое распределение рассеянного образцом излучения.

Итерационные методы обычно включают учет несогласованности показателей преломления на границах образца и многослойности самого образца. Источниками

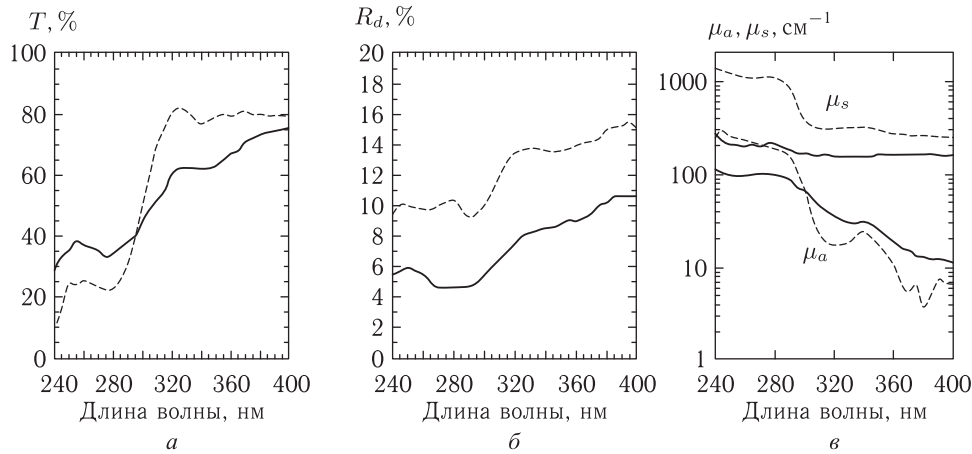


Рис. 3.2. Экспериментальные спектры полного пропускания (а) и диффузного отражения (б) отрывков эпидермиса человека и соответствующие спектральные зависимости коэффициентов поглощения (μ_a) и рассеяния (μ_s), рассчитанные с использованием четырехпоточковой модели. Сплошные линии — кожа в норме, пунктирные линии — псориагическая кожа [426, 474]

погрешностей при подсчете значений оптических коэффициентов являются следующие причины, которые необходимо иметь в виду при сравнительном анализе значений оптических параметров, полученных различными авторами [73]:

- физиологическое состояние биологических образцов: уровень гидратации, гомогенность, видовая вариантность, замороженное — незамороженное состояние, *in vivo* — *in vitro* измерения, фиксированный — нефиксированный образец, гладкость его поверхности;
- геометрия облучения;
- согласованность — несогласованность показателя преломления на границах;
- ориентация регистрирующих волоконных световодов внутри образца по отношению к световоду — источнику;
- значения числовой апертуры регистрирующих световодов;
- угловое разрешение фотодетекторов;
- отделение рассеянного вперед излучения от нерассеянного;
- теория, используемая для решения обратной задачи.

Проиллюстрируем на примере определения оптических параметров эпидермиса кожи человека некоторые из обсуждаемых методов измерений. Исследования оптических параметров кожи представляют большой интерес с точки зрения совершенствования методов фото- и фотохимиотерапии кожных заболеваний, а также для развития методов диффузной оптической томографии и диафаноскопии. Для получения воспроизводимых результатов в дозиметрии и диагностике необходимо иметь надежные данные для всего набора оптических параметров кожи (μ_a , μ_s , g), для всех слоев кожи, в том числе и эпидермиса. Возможности получения надежных данных определяются не только выбранной методикой измерений, но также технологией приготовления образцов ткани, адекватных решаемой задаче. Технология изготовления образцов эпидермиса (вид биопсии ткани) на основе отрывов эпидермиса с использованием специальных медицинских клеев и стеклянных или кварцевых подложек разработана С.Р. Утцем [426, 474]. Эта технология позволяет получать высококачественные образцы верхних слоев эпидермиса толщиной 20–50 мкм, удобные для спектрофотометрических, нефелометрических, флуоресцентных и других

оптических измерений в широком диапазоне длин волн, от УФ до ИК. Технология позволяет осуществлять до 7 последовательных отрывов кожи с одного и того же места у добровольца с нормальной кожей без ухудшения качества образцов.

Измеренные с помощью спектрофотометра с интегрирующей сферой спектры пропускания и отражения образцов в диапазоне 240–400 нм были использованы для расчета спектров коэффициентов поглощения $\mu_a(\lambda)$ и рассеяния $\mu_s(\lambda)$ в приближении четырехпоточковой модели, учитывающей коллимированное отражение на границах образца [426, 474] (рис. 3.1, табл. 3.1). Были исследованы образцы, полученные с внутренней поверхности предплечья здорового незагоревшего человека, а также с участков кожи дерматологического больного той же локализации, содержащих псориазные очаги в прогрессирующей стадии. Эпидермальные отрывы позволяют послойно изучать воздействие различных веществ (лекарственных препаратов, кремов и пр.) на оптические свойства эпидермиса. УФ-спектры поглощения верхних слоев эпидермиса подобны спектрам поглощения растворов белков. Наибольший вклад в УФ-спектры поглощения (240–300 нм) эпидермиса дают нуклеиновые кислоты, аминокислоты (триптофан, тирозин, фенилаланин) и уроганиновая кислота (см. рис. 1.8). Кроме того, некоторые липиды, содержащиеся в клеточных мембранах, также имеют значительное поглощение. Различия в поглощении в рассматриваемом диапазоне длин волн эпидермиса здорового человека и образцов, включающих псориазные очаги, обусловлены различиями в метаболическом гомеостазе кожи. Для образцов эпидермиса псориазной кожи за счет возрастания оптической неоднородности, вызванной нарушениями структуры эпидермиса в псориазных очагах, появлением заполненных воздухом микрообластей между паракератотическими чешуйками, коэффициент диффузного отражения возрастает до 10–15 % (6–10 % для отрывов эпидермиса нормальной кожи в том же диапазоне длин волн, т. е. 240–400 нм), что связано с довольно сильным влиянием обратного рассеяния от всего объема образца.

Достаточно быстрым и точным методом решения обратных задач рассеяния является инверсный метод добавления–удвоения (ИДУ) [905], который основан на предложенном Хюлстом общем методе решения транспортного уравнения для плоскопараллельного слоя [594]. Достоинства метода ИДУ применительно к задачам оптики биотканей заключаются в его быстродействии, позволяющим получать итерационные решения на современных микрокомпьютерах, и необходимой гибкости, допускающей учет анизотропии рассеяния и внутренних отражений на границах.

Метод ИДУ содержит следующие шаги:

- 1) задание предполагаемых оптических параметров;
- 2) подсчет отражения и пропускания с использованием метода добавления–удвоения;
- 3) сравнение рассчитанных значений отражения и пропускания с измеренными;
- 4) повторение процедуры до получения согласованных данных с заданной точностью.

Метод в принципе дает любую точность по всем определяемым оптическим параметрам в зависимости от затрат компьютерного времени. Разумной считается ошибка, не превышающая 3 % [905]. Метод допускает непосредственную коррекцию экспериментальных данных, полученных с помощью интегрирующих сфер.

Метод ИДУ обычно используется при следующих предположениях: распределение света не зависит от времени; образцы имеют однородные оптические свойства; геометрия образцов представляет собой бесконечный плоскопараллельный слой конечной толщины; ткань имеет однородный показатель преломления; внутреннее отражение на границах подчиняется закону Френеля; свет не поляризован. Непогло-

Таблица 3.1. Оптические характеристики биотканей человека, измеренные *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo* (в круглых скобках дана средне-квадратичная ошибка (\pm) измерений)

| Биоткань | λ , нм | μ_a , см ⁻¹ | μ_s , см ⁻¹ | μ'_s , см ⁻¹ | g | Примечания |
|---------------------------|----------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------|---|
| Измерения <i>in vitro</i> | | | | | | |
| Кожа: роговой слой | 193 | 6000 | — | — | — | Криосрезы, данные из [73] |
| | 250 | 1150 | 2600 | 260 | 0,9 | |
| | 308 | 600 | 2400 | 240 | 0,9 | |
| | 337 | 330 | 2300 | 230 | 0,9 | |
| | 351 | 300 | 2200 | 220 | 0,9 | |
| | 400 | 230 | 2000 | 200 | 0,9 | |
| эпидермис | 250 | 1000 | 2000 | 616 | 0,69 | Данные из [70], значения взяты с графика, g рассчитано по формуле (3.2) |
| | 308 | 300 | 1400 | 407 | 0,71 | |
| | 337 | 120 | 1200 | 338 | 0,72 | |
| | 351 | 100 | 1100 | 306 | 0,72 | |
| | 415 | 66 | 800 | 206 | 0,74 | |
| | 488 | 50 | 600 | 143 | 0,76 | |
| | 514 | 44 | 600 | 139 | 0,77 | |
| | 800 | 40 | 420 | 62 | 0,85 | |
| дерма | 250 | 26 | 833 | 257 | 0,69 | Данные из [70], значения приведены в соответствии с результатами для $\lambda = 633$ нм [925], обескровленная ткань, гидратация — 85%, g рассчитано по формуле (3.2) |
| | 308 | 8,7 | 583 | 170 | 0,71 | |
| | 337 | 6,1 | 500 | 141 | 0,72 | |
| | 351 | 5,2 | 458 | 127 | 0,72 | |
| | 415 | 3,5 | 320 | 82 | 0,74 | |
| | 488 | 2,6 | 250 | 60 | 0,76 | |
| | 514 | 2,2 | 250 | 58 | 0,77 | |
| | 585 | 2,2 | 196 | 41 | 0,79 | |
| | 633 | 2,0 | 187,5 | 37 | 0,80 | |
| | 800 | 1,7 | 175 | 30 | 0,85 | |

| Биоткань | λ , нм | μ_a , см^{-1} | μ_s , см^{-1} | μ'_s , см^{-1} | g | Примечания |
|--|----------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------|---|
| Кожа: эпидермис дерма кровь | 577 | 19 | 480 | — | 0,787 | Усреднено по данным Verkruijsse и др., (1993) и van Gemert и др., (1992), оксигенированная кровь, данные из [480] |
| | 585 | 19 | 470 | — | 0,790 | |
| | 590 | 19 | 460 | — | 0,800 | |
| | 595 | 19 | 460 | — | 0,800 | |
| | 600 | 19 | 460 | — | 0,800 | |
| | 517 | 2,2 | 210 | — | 0,787 | |
| | 585 | 2,2 | 205 | — | 0,790 | |
| | 590 | 2,2 | 200 | — | 0,800 | |
| | 595 | 2,2 | 200 | — | 0,800 | |
| | 600 | 2,2 | 200 | — | 0,800 | |
| | 517 | 354 | 468 | — | 0,995 | |
| | 585 | 191 | 467 | — | 0,995 | |
| | 590 | 69 | 466 | — | 0,995 | |
| | 595 | 43 | 465 | — | 0,995 | |
| | 600 | 25 | 464 | — | 0,995 | |
| Дерма в области ноги | 635 | 1,8 (0,2) | 244 (21) | 78 | 0,68 | Криосрезы, данные из [924] |
| Кожа и подкожные ткани, включая стенку вены (нога) | 633 | 3,1 | 70,7 | 11,4 | 0,8 | Срезы тканей, данные из [530] |
| Соединительная ткань легких | 515 | 25,5 (3,0) | 356 (39) | — | — | Криосрезы, данные из [2] |
| | 635 | 8,1 (2,8) | 324 (46) | 81 | 0,75 | |
| | 1064 | 2,8 | 39 | — | 0,91 | |
| Мышечная ткань | 515 | 11,2 (1,8) | 530 (44) | — | — | Криосрезы, данные из [924] |
| | 1064 | 2,0 | 215 | — | 0,96 | Криосрезы, данные из [2] |
| Мышечная ткань внутренней стенки матки | 635 | 0,35 (0,1) | 394 (91) | 122 | 0,69 | Криосрезы, [924] |
| Аорта | 633 | 0,52 | 316 | 41,0 | 0,87 | Биоптаты, в физиологическом растворе (ФР), данные из [73] |

Продолжение табл. 3.1

| Биоткань | λ , нм | μ_a , см^{-1} | μ_s , см^{-1} | μ'_s , см^{-1} | g | Примечания | |
|-----------------------|----------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------|--|---------------------------------|
| Аорта | 470 | 5,3 (0,9) | — | 42,6 (6,0) | — | Тонкие срезы (250 мкм, интима и медиа), ФР, данные из [530]. В оригинале статьи графики и таблицы содержат ошибки, здесь приведена часть исправленных результатов [3], остальные предоставляются авторами [530] | |
| | 476 | 5,1 (0,9) | — | 41,9 (5,9) | — | | |
| | 488 | 4,5 (0,9) | — | 39,9 (5,6) | — | | |
| | 514,5 | 3,7 (0,9) | — | 36,9 (5,4) | — | | |
| | 580 | 2,8 (0,9) | — | 31,1 (4,9) | — | | |
| | 600 | 2,6 (0,9) | — | 29,6 (4,7) | — | | |
| | 633 | 2,6 (0,9) | — | 27,4 (4,4) | — | | |
| | 1064 | 2,7 (0,5) | — | 15,5 (2,8) | — | | |
| Слой аорты: интима | 476 | 14,8 | 237 | 45,0 | 0,81 | Криосрезы, данные из [462, 463] | |
| | 580 | 8,9 | 183 | 34,8 | 0,81 | | |
| | 600 | 4,0 | 178 | 33,8 | 0,81 | | |
| | 633 | 3,6 | 171 | 25,7 | 0,85 | | |
| | медиа | 1064 | 2,3 | 165 | — | 0,97 | Криосрезы, данные из [2] |
| | | 476 | 7,3 | 410 | 45,1 | 0,89 | Криосрезы, данные из [462, 463] |
| | | 580 | 4,8 | 331 | 33,1 | 0,90 | |
| | | 600 | 2,5 | 323 | 35,5 | 0,89 | |
| | | 633 | 2,3 | 310 | 31,0 | 0,90 | |
| | | адвентиция | 1064 | 1,0 | 634 | — | 0,96 |
| 476 | 18,1 | | 267 | 69,4 | 0,74 | Криосрезы, данные из [462, 463] | |
| 580 | 11,3 | | 217 | 49,9 | 0,77 | | |
| 600 | 6,1 | | 211 | 46,4 | 0,78 | | |
| 633 | 5,8 | | 195 | 37,1 | 0,81 | | |
| 1064 | 2,0 | | 484 | — | 0,97 | Криосрезы, данные из [2] | |

Продолжение табл. 3.1

| Биоткань | λ , нм | μ_a , см^{-1} | μ_s , см^{-1} | μ'_s , см^{-1} | g | Примечания |
|-------------------|----------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------|------------------------------|
| Мочевой пузырь: | | | | | | |
| интегрально | 633 | 1,40 | 88,0 | 3,52 | 0,96 | Биоптаты, ФР, данные из [73] |
| интегрально | 633 | 1,40 | 29,3 | 2,64 | 0,91 | |
| слизистая | 1064 | 0,7 | 7,5 | — | 0,85 | Биоптаты, ФР, данные из [2] |
| стенка | 1064 | 0,9 | 54,3 | — | 0,85 | |
| интегрально | 1064 | 0,4 | 116 | — | 0,90 | |
| Сердце: | | | | | | |
| эндокард | 1060 | 0,07 | 136 | — | 0,97 | Биоптаты, ФР, данные из [73] |
| эпикард | 1060 | 0,35 | 167 | — | 0,98 | |
| миокард | 1060 | 0,3 | 177,5 | — | 0,96 | Биоптаты, ФР, данные из [2] |
| эпикард | 1060 | 0,21 | 127,1 | — | 0,93 | |
| аневризм | 1060 | 0,4 | 137 | — | 0,98 | |
| трабекула | 1064 | 1,4 | 424 | — | 0,97 | |
| миокард | 1064 | 1,4 | 324 | — | 0,96 | |
| миокард | 1060 | 0,52 | — | 4,48 | — | Данные из [214] |
| Почка: | | | | | | |
| pars convoluta | 1064 | 2,4 | 72 | — | 0,86 | Данные из [2] |
| мозговое вещество | 1064 | 2,1 | 77 | — | 0,87 | |
| Вена бедренная | 1064 | 3,2 | 487 | — | 0,97 | Данные из [2] |
| Печень | 515 | 18,9 (1,7) | 285 (20) | — | — | Криосрезы, данные из [924] |
| | 630 | 3,2 | 414 | — | 0,95 | Данные из [214] |
| | 635 | 2,3 (1,0) | 313 (136) | 100 | 0,68 | Криосрезы, данные из [924] |
| | 1064 | 0,7 | 356 | — | 0,95 | |

Продолжение табл. 3.1

| Биоткань | λ , нм | μ_a , см^{-1} | μ_s , см^{-1} | μ'_s , см^{-1} | g | Примечания | |
|--|----------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|------|--|--|
| Молочная железа: жировая ткань в норме ($n = 23$) фиброзная ткань в норме ($n = 35$) инфильтрирующая карцинома ($n = 48$) муциновая карцинома ($n = 3$) карцинома протоков <i>in situ</i> ($n = 5$) железистая ткань жировая ткань фиброзная киста фиброаденома карцинома | 749 | 0,18 (0,16) | 8,48 (3,43) | — | — | Биоптаты, ФР, 37°C, данные из [473] | |
| | 789 | 0,08 (0,10) | 7,67 (2,57) | — | — | | |
| | 836 | 0,11 (0,10) | 7,27 (2,40) | — | — | | |
| | 749 | 0,13 (0,19) | 9,75 (2,27) | — | — | | |
| | 789 | 0,06 (0,12) | 8,94 (2,45) | — | — | | |
| | 836 | 0,05 (0,08) | 8,10 (2,21) | — | — | | |
| | 749 | 0,15 (0,14) | 10,91 (5,59) | — | — | | |
| | 789 | 0,04 (0,08) | 10,12 (5,05) | — | — | | |
| | 836 | 0,10 (0,19) | 9,10 (4,54) | — | — | | |
| | 749 | 0,26 (0,20) | — | 6,15 (2,44) | — | | |
| | 789 | 0,016 (0,072) | — | 5,09 (2,42) | — | | |
| | 836 | 0,023 (0,108) | — | 4,78 (3,67) | — | | |
| | 749 | 0,076 (0,068) | — | 13,10 (2,85) | — | | |
| | 789 | 0,023 (0,034) | — | 12,21 (2,45) | — | | |
| | 836 | 0,039 (0,068) | — | 10,46 (2,65) | — | | |
| | 700 | 0,47 | 284 | — | 0,95 | | Гомогенизированная ткань, данные из [928] |
| | 900 | 0,62 | 198 | — | 0,95 | | |
| | 700 | 0,70 | 172 | — | 0,95 | | |
| 900 | 0,75 | 158 | — | 0,95 | | | |
| 700 | 0,22 | 268 | — | 0,95 | | | |
| 900 | 0,27 | 190 | — | 0,95 | | | |
| 700 | 0,52 | 144 | — | 0,95 | | | |
| 900 | 0,72 | 106 | — | 0,95 | | | |
| 700 | 0,45 | 236 | — | 0,95 | | | |
| 900 | 0,50 | 178 | — | 0,95 | | | |

| Биоткань | λ , нм | μ_a , см^{-1} | μ_s , см^{-1} | μ'_s , см^{-1} | g | Примечания | |
|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------|--|---------------|
| Молочная железа: карцинома | 580 | 4,5 (0,8) | — | — | — | Биоптаты толщиной 5–5,3 мм, данные из [923] | |
| | 850 | 0,4 (0,5) | — | — | — | | |
| | 1300 | 0,5 (0,8) | — | — | — | | |
| | окружающая здоровая ткань | 580 | 2,6 (1,1) | — | — | | — |
| | | 850 | 0,3 (0,2) | — | — | | — |
| | | 1300 | 0,8 (0,6) | — | — | | — |
| | жировая ткань | 700 | — | — | 13 (5) | | 0,95 (0,02) |
| | фиброзно- железистая ткань | 700 | — | — | 12 (5) | | 0,92 (0,03) |
| | карцинома (центральная часть) | 700 | — | — | 18 (5) | | 0,88 (0,03) |
| | жировая ткань | 625 | 0,06 (0,02) | — | 14,3 (2,1) | | — |
| доброкачественная опухоль | 625 | 0,33 (0,06) | — | 3,8 (0,3) | — | | |
| Прямая кишка: | мышечная ткань | 1064 | 3,3 | 238 | — | 0,93 | Данные из [2] |
| | подслизистая | 1064 | 2,3 | 117 | — | 0,91 | |
| | слизистая | 1064 | 2,7 | 39 | — | 0,91 | |
| | интегрально | 1064 | 0,4 | 261 | — | 0,94 | |
| Пищевод (слизистая) | 1064 | 1,1 | 83 | — | 0,86 | Данные из [2] | |
| Жировая ткань: | кожа | 1064 | 2,6 | 29 | — | 0,91 | Данные из [2] |
| | брюшина | 1064 | 3,0 | 37 | — | 0,91 | |
| Простата | 850 | 0,6 (0,2) | 100 (20) | — | 0,94 (0,02) | Измерения через час после резекции, данные из [2] | |
| | 980 | 0,4 (0,2) | 90 (20) | — | 0,95 (0,02) | | |
| | 1064 | 0,3 (0,2) | 80 (20) | — | 0,95 (0,02) | | |

Продолжение табл. 3.1

| Биоткань | λ , нм | μ_a , см^{-1} | μ_s , см^{-1} | μ'_s , см^{-1} | g | Примечания | |
|---|--|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------------|-------------------------------------|---------------------------|
| Коагулированная простата | 850 | 7,0 (0,2) | 230 (30) | — | 0,94 (0,02) | ФР (70°C, 10 мин), данные из [2] | |
| | 980 | 5,0 (0,2) | 190 (30) | — | 0,95 (0,02) | | |
| | 1064 | 4,0 (0,2) | 180 (30) | — | 0,95 (0,02) | | |
| Селезенка | 1064 | 6,0 | 137 | — | 0,90 | Данные из [2] | |
| Желудок: мышечная ткань | 1064 | 3,3 | 29,5 | — | 0,87 | Данные из [2] | |
| | 1064 | 2,8 | 732 | — | 0,91 | | |
| | 1064 | 0,8 | 128 | — | 0,91 | | |
| Мозг: белое вещество (женщина, 32 г., 24 ч после смерти) | 415 | 2,1 | — | 24 | — | Данные с графиков из [72] | |
| | 488 | 1,0 | — | 60 | — | | |
| | 630 | 0,2 | — | 32 | — | | |
| | 800–1100 | 0,2–0,3 | — | 40–20 | — | | |
| | белое вещество (женщина, 63 г., 30 ч после смерти) | 488 | 2,7 | — | 25 | — | Данные с графиков из [72] |
| | | 630 | 0,9 | — | 22 | — | |
| | | 800–1100 | 1,0–1,5 | — | 20–10 | — | |
| | серое вещество (мужчина, 71 г., 24 ч после смерти) | 514 | 19,5 | — | 85 | — | Данные с графиков из [72] |
| | | 585 | 14,5 | — | 63 | — | |
| | | 630 | 4,3 | — | 52 | — | |
| | | 800–1100 | $\approx 1,0$ | — | 45–20 | — | |
| | глиома (мужчина, 65 л., 4 ч после смерти) | 415 | 16,6 | — | 6 | — | Данные с графиков из [72] |
| 488 | | 12,5 | — | 3 | — | | |
| 630 | | 3,0 | — | 3 | — | | |
| 800–1100 | | $\approx 1,0$ | — | $> 1-2$ | — | | |
| меланома (мужчина, 71 г., 24 ч после смерти) | 585 | 2 | — | 158 | — | Данные с графиков из [72] | |
| | 630 | 20,0 | — | 75 | — | | |
| | 800 | 8,0 | — | 40 | — | | |
| | 900 | 4,0 | — | 30 | — | | |
| | 1100 | 2,0 | — | 25 | — | | |
| Белое вещество мозга | 633 | 1,58 | 51,0 | 2,04 | 0,96 | Биоптаты, ФР, данные из [73] | |
| Серое вещество мозга | 633 | 2,63 | 60,2 | 7,22 | 0,88 | | |

| Биоткань | λ , нм | μ_a , см^{-1} | μ_s , см^{-1} | μ'_s , см^{-1} | g | Примечания |
|--|----------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|-------|---|
| Ткани головы взрослого человека: | | | | | | |
| кожа и череп | 800 | 0,4 | — | 20 | — | Данные из [472] |
| спинномозговая жидкость | 800 | 0,01 | — | 0,1 | — | |
| серое вещество | 800 | 0,25 | — | 25 | — | |
| белое вещество | 800 | 0,05 | — | 60 | — | |
| Склера | 650 | 0,08 | — | 25 | — | |
| Цельная кровь: | | | | | | |
| HbO ₂ (гематокрит, $H = 0,41$) | 960 | 2,84 | 505 | 3,84 | 0,992 | Данные из [2] |
| HbO ₂ ($H = 0,4$) | 810 | 4,5 | — | 6,6 | — | |
| | 1064 | 3,0 | — | 3,4 | — | |
| Hb ($H = 0,41$) | 960 | 16,8 | 668 | 5,08 | 0,992 | |
| Hb ($H = 0,4$) | 810 | 4,5 | — | 3,9 | — | |
| | 1064 | 0,3 | — | 6,6 | — | |
| Кровь в потоке HbO ₂ (> 98%) ($H = 0,4$) | 633 | $\approx 7,0$ | ≈ 850 | ≈ 17 | 0,98 | Скорость потока близка к физиологической, A. Roggan et al. SPIE, 3195–09, 1997 |
| Камни желчного пузыря: | | | | | | |
| пигментные | 351 | 102 (16) | — | — | — | Обезвоженные, запрессованные в пластик и нарезанные на пластинки в 1 мм толщиной, метод импульсной фототепловой радиометрии, данные из [73] |
| | 488 | 179 (28) | — | — | — | |
| | 580 | 125 (29) | — | — | — | |
| | 630 | 85 (11) | — | — | — | |
| | 1060 | 121 (12) | — | — | — | |
| холестириновые | 351 | 88 (7) | — | — | — | |
| | 488 | 62 (15) | — | — | — | |
| | 580 | 36 (7) | — | — | — | |
| | 630 | 44 (10) | — | — | — | |
| | 1060 | 60 (9) | — | — | — | |

Продолжение табл. 3.1

| Биоткань | λ , нм | μ_a , см^{-1} | μ_s , см^{-1} | μ'_s , см^{-1} | g | Примечания |
|---|-------------------|---|----------------------------|-----------------------------|-------------|---|
| Измерения <i>ex vivo</i> | | | | | | |
| Матка: | | | | | | |
| после менопаузы | 630 | 0,515 (0,054) | — | 9,1 (1,7) | — | Фазовый модуляционный метод, интактные матки после удаления, в процессе измерений (3–4 ч) образцы увлажнялись, данные из [548] |
| до менопаузы | 630 | 0,193 (0,013) | — | 7,3 (0,9) | — | |
| | 630 | 0,314 (0,030) | — | 8,9 (1,5) | — | |
| | 630 | 0,213 (0,024) | — | 6,0 (0,8) | — | |
| | 630 | 0,197 (0,030) | — | 7,3 (1,5) | — | |
| фиброид | 630 | 0,0824 (0,0075) | — | 7,2 (0,9) | — | |
| Измерения <i>in vivo</i> | | | | | | |
| Молочная железа в норме (30 японских женщин, значения усреднены по всем возрастным группам) | 753 | 0,046 (0,014) | — | 8,9 (1,3) | — | Импульсный метод, μ_a (см^{-1}) $\approx 0,087-8,31 \cdot 10^{-4}x$, μ'_s (см^{-1}) $\approx 13-0,08 \cdot x$, где x — возраст (20–80 лет), данные из [507] |
| Молочная железа в норме (6 женщин, 26–43 года) | 800 | 0,017–0,045 | — | 7,2–13,5 | — | Импульсный метод, μ'_s (см^{-1}) $\approx 16,7-7,9 \cdot 10^{-3}\lambda$, (нм) $\lambda = 500 \div 1060$ нм, данные из [506] |
| Молочная железа в норме (6 добровольцев, толщина ткани 33–49 мм при легкой компрессии) | 580 780 850 | 0,70 (0,12) 0,23 (0,02) 0,27 (0,03) | — — — | — — — | — — — | Измерение пропускания, данные из [923], $g \approx 0,92-0,95$, $\mu'_s = 12-13 \text{ см}^{-1}$ |
| Рак груди (5 пациентов) | 630 | 0,305 (0,16) | — | 9,41 (7,35) | — | Обратное отражение с пространственным разрешением, рецидивный рак, подкожные и поверхностные узлы, предварительная сенсibilизация ПГП (72 ч), данные из [927] |

| Биоткань | λ , нм | μ_a , см^{-1} | μ_s , см^{-1} | μ'_s , см^{-1} | g | Примечания |
|--|-------------------|---|----------------------------|------------------------------|----------------------|--|
| Предплечье: эпидермис | 633 | 8^Δ | — | 17,5* | 0,9 $^\Delta$ | Обратное отражение с пространственным разрешением, (+) измерения <i>ex vivo</i> , ($^\Delta$) литературные данные, (*) восстановлено из измерений <i>in vivo</i> , данные из [480] |
| дерма | 633 | 0,15* | — | 17,5* | 0,9 $^\Delta$ | |
| жировая ткань | 633 | 0,026 ⁺ | — | 12,0 ⁺ | 0,9 $^\Delta$ | |
| мышечная ткань | 633 | 0,96 ⁺ | — | 5,3 ⁺ | 0,9 $^\Delta$ | |
| Предплечье (5 человек, 14 измерений) | 800 | 0,23 (0,04) | — | 6,8 (0,8) | — | Импульсный метод, титан-сапфировый лазер, μ'_s (см^{-1}) $\approx 11-5,1 \cdot 10^{-3} \lambda$ (нм), $\lambda = 760-900$ нм, данные из [493] |
| Голова (7 человек, 10 измерений) | 800 | 0,16 (0,01) | — | 9,4 (0,7) | — | μ'_s (см^{-1}) $\approx 14,5-6,5 \cdot 10^{-3} \lambda$ (нм), $\lambda = 760-900$ нм, данные из [493] |
| Икра ноги (11 человек, 14 измерений) | 800 | 0,17 (0,05) | — | 9,4 (0,7) | — | μ'_s (см^{-1}) $\approx 16-8,9 \cdot 10^{-3} \lambda$ (нм), $\lambda = 760-900$ нм, данные из [493] |
| Кора головного мозга в норме (височная и фронтальная доли) | 674 849 956 | > 0,2 > 0,2 > 0,2 | — — — | 10 (1) 9,2 (1) 8,5 (1) | 0,92 0,92 0,92 | Метод с пространственным разрешением, измерения в процессе хирургической операции, данные из [910] |
| Оптический нерв в норме | 674 849 956 | 0,60 (0,25) 0,75 (0,25) 0,65 (0,25) | — — — | 18 (1) 17 (1) 16 (1) | 0,92 0,92 0,92 | Данные из [910] |
| Астроцитомы оптического нерва | 674 849 950 | 1,6 (1) 1,1 (1) 1,8 (1) | — — — | 14 (1) 8,5 (1) 8,5 (1) | 0,92 0,92 0,92 | Данные из [910] |

щающий слой с другим показателем преломления может присутствовать на границах образца (окна кюветы) [905].

Термин «удвоение» в методике расчетов означает, что предполагаемые известными отражение и пропускание одного слоя для некоторого угла падения и выхода света из образца могут быть использованы для нахождения отражения и пропускания слоя вдвое большей толщины путем наложения друг на друга двух идентичных слоев и сложения вкладов в отражение и пропускание от каждого из слоев. Отражение и пропускание слоя произвольной толщины рассчитывается последовательно, сначала для тонкого слоя с теми же оптическими характеристиками (однократное рассеяние), а затем путем последовательного удвоения толщины рассчитываются характеристики слоя желаемой толщины. Термин «добавление» означает распространение методики удвоения на разнородные слои, что позволяет моделировать многослойные биоткани или учитывать внутренние отражения за счет скачков показателя преломления [905].

Метод ИДУ был успешно использован Пралом при нахождении оптических параметров дермы кожи человека (см. [426, 476]).

Тем не менее, при определении оптических параметров биотканей необходимо учитывать реальную геометрию эксперимента, которая может быть достаточно сложной, структуру биоткани (многослойность, локальные макронеоднородности и т. п.), а также разнообразное угловое распределение пучка света (коллимированный, расходящийся, сфокусированный или точечный), его диаметр, точку ввода излучения и угол падения. Это можно сделать только при использовании инверсного метода Монте-Карло (ИМК) [214, 426–429, 906, 910]. Так, в [426, 428, 429, 906] представлены близкие по решаемым задачам алгоритмы, предназначенные для определения всех трех оптических параметров биоткани (μ_a , μ_s и g) на основе измерений *in vitro* полного пропускания, диффузного отражения и коллимированного пропускания (для оптически тонких образцов) с помощью спектрофотометра с интегрирующими сферами. В качестве начального приближения (для ускорения процедуры) была использована теория Кубелки–Мунка, авторы [426, 428] использовали четырехпоточковый вариант теории. Оба описываемых алгоритма учитывают боковые потери фотонов, существенные для достаточно толстых образцов.

Представленные в [476] экспериментальные данные, полученные Пралом для дермы кожи на $\lambda = 633$ нм (полное пропускание $T = 0,43$, полное отражение $R = 0,43$, коллимированное пропускание $T_c = 0,038$, толщина образца 0,36 мм, показатель преломления ткани $n = 1,4$) были использованы для апробирования алгоритма [426, 428]. Получены следующие данные: для рассмотренного выше метода ИДУ — $\mu_a = 1,5$ см⁻¹, $\mu_s = 88,0$ см⁻¹, $g = 0,43$, а для метода ИМК — $\mu_a = 1,13$ см⁻¹, $\mu_s = 87,4$ см⁻¹, $g = 0,38$. Близкие результаты были получены и при обработке экспериментальных данных Прала методом конденсированного ИМК [427, 476]. Этот метод отличается своей экономичностью, так как основывается на использовании результатов моделирования для заданного альбеда при нахождении параметров для любого другого значения альбеда среды, достаточно лишь сохранить число взаимодействий каждого фотона со средой.

Значения μ_a , μ_s и g для мозга человека, простаты собаки и печени свиньи на длинах волн 800 и 1064 нм, а также спектры μ_a , μ_s (350–1050 нм) для некоторых сильно рассеивающих тканей глаза, таких как склера, ретина, рассчитанные с помощью метода ИМК на основе измерений отражения и пропускания *in vitro*, представлены в [429, 906]. Отметим, что для стабильной работы алгоритма было необходимо генерировать 10^5 – $5 \cdot 10^5$ фотонов на каждую итерацию. Для получения заданной точности в определении оптических параметров, порядка 2%, было необходимо обычно от двух до пяти итераций.

Помимо использования метода конденсированного ИМК сокращения затрат компьютерного времени можно достичь применением графических решений обратной задачи на основе предварительного моделирования методом Монте-Карло [214].

Решение обратной задачи методом Монте-Карло может быть построено на основе других измерительных схем, не использующих интегрирующей сферы. Так, в [910] измерялись значения и полуширина распределения интенсивности прошедшего через биоткань излучения, а в [476] метод конденсированного ИМК применялся для обработки измерений *in vivo* отраженного от биоткани излучения, проведенных с помощью специального датчика, содержащего два светодиода (660 и 940 нм) и три пространственно разделенных фотодетектора. Следует отметить, что сравнительные исследования оптических параметров кожи человека при измерениях *in vitro* и *in vivo* показали, что коэффициент поглощения и редуцированный коэффициент рассеяния для измерений *in vivo* существенно меньше их значений, полученных на основе измерений *in vitro*, соответственно в 10 и 2 раза [476]. Согласно обсуждению в [476], такие расхождения для μ_a следует искать в малой чувствительности метода интегрирующих сфер к малым значениям поглощения на фоне значительного рассеяния ($\mu_a \ll \mu_s$), а для μ'_s — в сильной зависимости от изменения относительного показателя преломления рассеивателей и основного вещества ткани n , $\mu'_s \sim (n-1)^m$, $m \geq 2$ [929].

Прямые измерения фазовой функции рассеяния $p(\vartheta)$ очень важны для выбора адекватной модели исследуемой биоткани, что в сочетании с методом двух интегрирующих сфер дает возможность получать полную и надежную информацию о коэффициентах поглощения и рассеяния [930]. Обычно фазовая функция рассеяния определяется на основе гониофотометрических измерений для сравнительно тонких образцов биотканей [70, 89, 201, 204, 426, 471, 473–476, 913, 924–926, 930, 931]. Измеренная индикатриса рассеяния (с учетом геометрии образца и экспериментальной установки) аппроксимируется либо функцией Хеньи–Гринштейна (ХГ) (2.5) [64, 426, 913, 926, 930], либо набором функций ХГ, каждая из которых отражает тип рассеивателей, со своим удельным вкладом в индикатрису [913, 924]; в предельном случае двухкомпонентной модели среды с крупными и мелкими, по сравнению с длиной волны, рассеивателями индикатриса представляется в виде анизотропной и изотропной частей [89, 476, 925]. Используются и другие аппроксимирующие функции, например полученные на основе приближения Рэлея–Ганса [476] или следующие из точной теории Ми [908, 909]. Такая аппроксимация, в частности, позволила найти зависимость фактора анизотропии рассеяния g дермы и эпидермиса от длины волны в диапазоне 300–1300 нм, которая в предположении 10%-го вклада изотропного рассеяния хорошо совпадает, по крайней мере в диапазоне 300–630 нм, с эмпирической формулой, представленной в [70]:

$$g_e \sim g_d \sim 0,62 + \lambda \cdot 0,29 \cdot 10^{-3} [\lambda, \text{нм}]. \quad (3.2)$$

Детальные исследования индикатрис рассеяния последовательных отрывов эпидермиса нормальной кожи и кожи, предварительно обработанной кремами и растворами красителей, показали, что на длине волны 633 нм среднее по всем пяти слоям эпидермиса значение $g = 0,89 \pm 0,02$, обработка кожи кремом с псораленом (используется при фототерапии псориаза и других кожных заболеваний) или вазелином уменьшает g соответственно до $0,86 \pm 0,01$ и $0,85 \pm 0,01$, в то же время 1%-й метиленовый синий не изменяет значение параметра [426, 926].

Наряду с описанными выше традиционными для оптики рассеивающих сред методами исследований [245, 529, 570, 594, 659, 932], требующими зачастую длительных измерений и расчетов искомым параметров, в оптике биотканей важны также менее точные, но оперативные методы измерений, позволяющие делать оценки

оптических параметров биоткани в реальном масштабе времени. Мы уже упоминали о быстрых алгоритмах решения обратной задачи [73, 214, 427, 476, 905] и более простых измерительных схемах [476, 910]. В качестве еще одного примера простой и быстрой измерительной схемы следует отметить схему зондирования биоткани лазерным пучком, наклонно падающим на исследуемый объект [933, 934]. В этом случае простая аналитическая формула для линейного смещения центра максимума диффузного отражения Δx позволяет легко находить оптические параметры среды и глубину проникновения света в биоткань,

$$\Delta x = \frac{\sin \alpha_i}{\bar{n}(\mu'_s + 0,35\mu_a)}, \quad (3.3)$$

где α_i — угол падения лазерного пучка; \bar{n} — средний показатель преломления рассеивающей среды (предполагается, что ткань находится в воздухе); $\mu'_s \gg \mu_a$.

Временные и фазовые методы измерения оптических параметров биотканей, несмотря на их относительную сложность, являются перспективными именно для измерений *in vivo*, поскольку допускают раздельное определение μ_a и μ'_s в одном эксперименте при исследовании обратного отражения (рассеяния) от объекта [1–3, 12, 31, 64] (см. главу 2).

Результаты измерений *in vitro* и *in vivo* оптических параметров биотканей человека, выполненные различными методами, представлены в табл. 3.1. В дополнение к этим данным приведем значения параметров для некоторых биотканей, измеренные в широком диапазоне длин волн и выраженные в виде аппроксимирующих формул.

Кожа европейца ($n = 21$); метод измерения — интегрирующие сферы (ИС), метод решения обратной задачи — инверсный добавления–удвоения (ИДУ); образцы — цельная кожа толщиной 1–6 мм, менее 24 ч после смерти, хранение при 20 °С в физиологическом растворе; измерения при комнатной температуре в спектральном диапазоне 400–2000 нм [917]:

$$\mu'_s = 1,1 \cdot 10^{12} \lambda^{-4} + 73,7 \lambda^{-0,22} [\lambda, \text{нм}].$$

Подкожная жировая клетчатка человека ($n = 6$); метод измерения — интегрирующие сферы (ИС), метод решения обратной задачи — инверсный добавления–удвоения (ИДУ); образцы — срезы ткани толщиной 1–3 мм, менее 6 ч после хирургической операции, хранение при 20 °С в физиологическом растворе; измерения при комнатной температуре в спектральном диапазоне 600–1500 нм [917]:

$$\mu'_s = 1,05 \cdot 10^3 \lambda^{-0,68} [\lambda, \text{нм}].$$

Склера глаза человека ($n = 10$); метод измерения — интегрирующие сферы (ИС), метод решения обратной задачи — инверсный добавления–удвоения (ИДУ); образцы склеры хранились короткое время при 20 °С в физиологическом растворе; измерения при комнатной температуре в спектральном диапазоне 370–1800 нм [922]:

$$\mu'_s = 2,411 \cdot 10^5 \lambda^{-1,325} [\lambda, \text{нм}].$$

Кость черепа человека ($n = 10$); метод измерения — интегрирующие сферы (ИС), метод решения обратной задачи — инверсный добавления–удвоения (ИДУ); измерения при комнатной температуре в спектральном диапазоне 800–2000 нм [919]:

$$\mu'_s = 1533,02 \lambda^{-0,65} [\lambda, \text{нм}].$$

Твердая мозговая оболочка человека ($n = 10$); метод измерения — интегрирующие сферы (ИС), метод решения обратной задачи — инверсный добавления–удвоения (ИДУ); образцы ткани хранились короткое время при 20 °С в физиологическом рас-

творе; измерения при комнатной температуре в спектральном диапазоне 400–700 нм [916]:

$$\mu'_s = 2,887 \cdot 10^4 \lambda^{-1,164} [\lambda, \text{нм}].$$

Белое вещество мозга человека ($n = 7$); метод измерения — интегрирующие сферы (ИС), метод решения обратной задачи — инверсный Монте-Карло (ИМК); данные с графиков работы [914], аппроксимация представлена в работе [911]:

$$\begin{aligned} \mu_s &= 1,67 \cdot 10^6 \lambda^{-1,375} + 702,8 \lambda^{-0,192} [\lambda, \text{нм}] (700\text{--}1100 \text{ нм}); \\ g &= 0,8 + 0,099(1 - \exp(-(\lambda - 484,7)/216,18)) [\lambda, \text{нм}] (360\text{--}1100 \text{ нм}). \end{aligned}$$

Коагулированное белое вещество мозга человека ($n = 7$); метод измерения — интегрирующие сферы (ИС), метод решения обратной задачи — инверсный Монте-Карло (ИМК); данные с графиков работы [914], аппроксимация представлена в работе [911]:

$$\begin{aligned} \mu_s &= 1,92 \cdot 10^6 \lambda^{-1,434} + 846,94 \lambda^{-0,168} [\lambda, \text{нм}] (600\text{--}1100 \text{ нм}); \\ g &= 0,859 + 0,082(1 - \exp(-(\lambda - 468,2)/200,3)) [\lambda, \text{нм}] (360\text{--}1100 \text{ нм}). \end{aligned}$$

Слизистая оболочка гайморовой пазухи человека ($n = 15$); метод измерения — интегрирующие сферы (ИС), метод решения обратной задачи — инверсный добавления-удвоения (ИДУ); образцы ткани хранились короткое время при 20 °С в физиологическом растворе; измерения при комнатной температуре в спектральном диапазоне 400–2000 нм [915]:

$$\mu'_s = 443742,6 \lambda^{-1,62} [\lambda, \text{нм}].$$

Слизистая оболочка стенки желудка человека ($n = 15$); метод измерения — интегрирующие сферы (ИС), метод решения обратной задачи — инверсный Монте-Карло (ИМК); образцы ткани хранились короткое время при 20 °С в физиологическом растворе; измерения при комнатной температуре в спектральном диапазоне 400–2000 нм [920]:

$$\begin{aligned} \mu'_s &= 1,027 \cdot 10^{12} \lambda^{-4} + 164,3 \lambda^{-0,446} [\lambda, \text{нм}]; \\ g &= 0,498 + 0,319(1 - \exp(-(\lambda - 533,7)/138,7)) [\lambda, \text{нм}]. \end{aligned}$$

Из (3.3) следует также необходимость независимых измерений как среднего показателя преломления биоткани (\bar{n}), так и показателей преломления рассеивающих центров (n_s) и базового вещества (n_0), в котором они распределены, поскольку отношение $n_s/n_0 \equiv m$ определяет величину коэффициента рассеяния. Например, в простейшей монодисперсной модели ткани как ансамбля невзаимодействующих рассеивающих диэлектрических шаров [929]

$$\mu'_s = 3,28 \pi a^2 \rho (2\pi a/\lambda)^{0,37} (m - 1)^{2,09}, \quad (3.4)$$

где a — радиус шара; ρ — объемная плотность шаров; m — относительный показатель преломления материала шара; λ — длина волны излучения.

Формула (3.4) справедлива для невзаимодействующих рассеивателей Ми при $g > 0,9$; $5 < 2\pi a/\lambda < 50$; $1 < m < 1,1$. Из (3.3) следует, что при изменении показателя преломления базового вещества всего на 5% ($n_0 = 1,35 \rightarrow 1,42$) при показателе преломления рассеивающих центров $n_s = 1,47$, μ'_s уменьшается в 7 раз. В пределе выравнивания показателей преломления $m = 1$, $\mu'_s \rightarrow 0$ (см. рис. 1.16). Представленные значения показателей преломления являются типичными для роговицы и склеры глаза животных и человека [12].

Измерение показателей преломления биотканей и отдельных ее компонентов является одной из актуальных задач оптики биотканей. Такие исследования ведутся сравнительно давно [204], однако нельзя сказать, что в литературе можно найти достаточно полную информацию даже о среднем значении показателя преломления отдельных биотканей \bar{n} . Согласно данным [87], значения \bar{n} для многих биотканей лежат в диапазоне 1,335–1,620 для видимого света например, для рогового слоя кожи $\bar{n} = 1,55$, для эмали зуба 1,62, а для поверхности хрусталика — 1,386. Следует отметить, что результаты измерений \bar{n} *in vitro* и *in vivo* могут существенно отличаться например, для брыжейки крысы измерения *in vitro* дают $\bar{n} = 1,52$, а *in vivo* только 1,38 [204]. Это означает, что, согласно (3.4), рассеивающие свойства живой и препарированной ткани могут существенно различаться, причем увеличение среднего значения \bar{n} препарированной ткани говорит о повышении показателя преломления базового вещества n_0 , при этом показатель преломления рассеивателей n_s должен сохраняться прежним, следовательно коэффициент рассеяния при измерениях *in vitro* должен быть существенно ниже, чем при измерениях на живой ткани. Для многих биотканей оптические свойства, в том числе и показатель преломления, определяются содержащейся в биоткани водой. Значения показателя преломления воды в широком диапазоне длин волн 0,2–200 мкм представлены в [204] например, для $\lambda = 0,2$ мкм $\bar{n} = 1,396$; $\lambda = 0,5$ мкм — 1,335; $\lambda = 2,8$ мкм — 1,142; $\lambda = 3,5$ мкм — 1,400; $\lambda = 10$ мкм — 1,218; $\lambda = 200$ мкм — 2,130.

Для отдельных частей клетки значения показателей преломления на $\lambda = 900$ нм могут быть оценены как следующие: среда вне клетки — $n = 1,35$, цитоплазма — $n = 1,37$, мембрана клетки — $n = 1,46$, ядро — $n = 1,39$, меланин — $n = 1,7$ [201].

Измерения показателя преломления некоторых сильно рассеивающих биотканей на $\lambda = 633$ нм с помощью волоконно-оптического рефрактометра были проведены авторами [935]. Согласно этой работе, наибольшее значение \bar{n} из исследованных тканей имеет жировая ткань (1,455), наименьшее — ткань легких (1,380) и печень (1,368), а среднее — кровь и селезенка (1,400), мышечная ткань (1,410) и почки (1,418). Оказалось, что гомогенизация ткани мало влияет на результаты измерений (изменения не превышают ошибки измерений, равной 0,006), коагулированная ткань имеет более высокий показатель преломления, чем нативная (например, для яичного белка n изменяется от 1,321 до 1,388 при коагуляции), имеется тенденция к снижению показателя преломления при увеличении длины волны света от 400 до 700 нм (например, для мышечной ткани быка в пределах 1,42–1,39), что характерно для большинства родственных материалов.

Значения показателя преломления некоторых биотканей, измеренные на отдельных длинах волн, представлены в табл. 3.2. Спектральные зависимости для показателя преломления окси- и дезоксигемоглобина в диапазоне 450–820 нм можно найти в работе [936].

Оригинальная методика измерения показателя преломления базового вещества дентина, основанная на трубчатой структуре дентина и проявлении этой тканью волноводных свойств, представлена в [937]: в белом свете n_0 для недавно прорезавшихся зубов составил $1,553 \pm 0,001$.

Измерение временного сдвига сверхкороткого импульса, формируемого группой прошедших биоткань баллистических фотонов, по отношению к импульсу, прошедшему до детектора по воздуху, также позволяет определять показатель преломления биоткани. Например, для двух образцов нормальной и патологической (раковая опухоль) ткани груди показатели преломления оказались равными соответственно 1,403 и 1,431 на длине волны 625 нм [64].

Отметим, что существующие в слоистых биологических средах локальные изменения показателя преломления приводят к существенному изменению хода лучей

Таблица 3.2. Экспериментальные значения показателя преломления некоторых биотканей человека и животных

| Биоткань | λ , нм | n | Примечание |
|--------------------------|----------------|-------|------------|
| Аорта человека | | | |
| в норме: | | | |
| интима | 456–1064 | 1,39 | [2] |
| медиа | 456–1064 | 1,38 | [2] |
| адвентиция | 456–1064 | 1,36 | [2] |
| кальцинированная: | | | |
| интима | 456–1064 | 1,39 | [2] |
| медиа | 456–1064 | 1,53 | [2] |
| Мочевой пузырь человека: | | | |
| слизистая | 456–1064 | 1,37 | [2] |
| стенка | 456–1064 | 1,40 | [2] |
| интегрально | 456–1064 | 1,38 | [2] |
| Мозг человека: | | | |
| серое вещество | 456–1064 | 1,36 | [2] |
| белое вещество | 456–1064 | 1,38 | [2] |
| белое и серое | 456–1064 | 1,37 | [2] |
| Прямая кишка человека: | | | |
| мышечная ткань | 456–1064 | 1,36 | [2] |
| подслизистая | 456–1064 | 1,36 | [2] |
| слизистая | 456–1064 | 1,38 | [2] |
| интегрально | 456–1064 | 1,36 | [2] |
| Пищевод человека: | | | |
| слизистая | 456–1064 | 1,37 | [2] |
| Жировая ткань человека: | | | |
| кожа | 456–1064 | 1,44 | [2] |
| брюшина | 456–1064 | 1,46 | [2] |
| Жировая ткань быка | 633 | 1,455 | [935] |
| Сердце человека: | | | |
| трабекула | 456–1064 | 1,40 | [2] |
| миокард | 456–1064 | 1,38 | [2] |
| Бедренная вена человека | 456–1064 | 1,39 | [2] |
| Почка: | | | |
| человек | 456–1064 | 1,37 | [2] |
| человек | 633 | 1,417 | [935] |
| собака | 633 | 1,400 | [935] |
| свинья | 633 | 1,390 | [935] |
| бык | 633 | 1,390 | [935] |
| Печень: | | | |
| человек | 456–1064 | 1,38 | [935] |
| человек | 633 | 1,367 | [2] |
| собака | 633 | 1,380 | [935] |
| свинья | 633 | 1,390 | [935] |
| бык | 633 | 1,390 | [935] |

Окончание табл. 3.2

| Биоткань | λ , нм | n | Примечание |
|----------------------------------|----------------|---------------|------------|
| Ткань легких: | | | |
| человек | 456–1064 | 1,38 | [2] |
| собака | 633 | 1,38 | [935] |
| свинья | 633 | 1,38 | [935] |
| Мышечная ткань: | | | |
| человек | 456–1064 | 1,37 | [2] |
| собака | 633 | 1,400 | [935] |
| бык | 633 | 1,410 | [935] |
| Кожа: | | | |
| человек (роговой слой) | 400–700 | 1,55 | [204] |
| крыса | 456–1064 | 1,42 | [2] |
| мышь | 456–1064 | 1,40 | [2] |
| Селезенка: | | | |
| человек | 456–1064 | 1,37 | [2] |
| собака | 633 | 1,400 | [935] |
| свинья | 633 | 1,400 | [165] |
| Желудок человека: | | | |
| мышечная ткань | 456–1064 | 1,39 | [2] |
| слизистая | 456–1064 | 1,38 | [2] |
| интегрально | 456–1064 | 1,38 | [2] |
| Спинномозговая жидкость человека | 400–700 | 1,335 | [204] |
| Кровь человека | 633 | 1,400 | [935] |
| Брызжейка крысы: | | | |
| <i>in vitro</i> | 400–700 | 1,52 (0,01) | [204] |
| <i>in vivo</i> | 400–700 | 1,38 (0,1) | [204] |
| Цитоплазма | 400–700 | 1,350–1,367 | [204] |
| Глаз человека: | | | |
| влага передней камеры | 400–700 | 1,336 | [204] |
| роговица: | | | |
| интегрально | 400–700 | 1,376 | [204] |
| фибриллы | 400–700 | 1,47 | [204] |
| базовое вещество | 400–700 | 1,35 | [204] |
| хрусталик: | | | |
| поверхность | 400–700 | 1,386 | [204] |
| центр | 400–700 | 1,406 | [204] |
| склера | 442–1064 | 1,47–1,36 | [2] |
| стекловидное тело | 400–700 | 1,336 | [204] |
| слезная жидкость | 400–700 | 1,3361–1,3379 | [204] |
| Зуб человека: | | | |
| эмаль | 220 | 1,73 | [204] |
| | 400–700 | 1,62 | [204] |
| апатит | 400–700 | > 1,623 | [204] |

света на коротких расстояниях, поскольку изменение n на 10% на длине в 10 мкм соответствует радиусу кривизны эквивалентной оптической системы (эквивалентная локальная линза) порядка 0,1 мм [62, с.114].

3.2. Управление оптическими свойствами биотканей

Характер отражения, поглощения и рассеяния света биотканями и кровью можно достаточно эффективно изменять с помощью различных средств [12, 13, 22, 27, 31, 57, 85, 149, 152–154, 156, 222–224, 250, 430, 431, 792, 803, 838, 846–848, 850, 852, 853, 938–969]. Окрашивание (сенсбилизация) биологических материалов широко используется для изучения механизмов взаимодействия света с их отдельными компонентами, а также в практической медицине для диагностики и селективной фотодеструкции компонентов живой ткани. Диагностика и фотодинамическая терапия раковых опухолей, а также УФА-фотохимиотерапия псориаза и других пролиферативных заболеваний основана на этих принципах (см. главу 1).

Можно существенно (до 40 раз) увеличить пропускание мягких кровенаполненных тканей за счет их сдавливания [958]. Прокалывание и растягивание биоткани дает аналогичные эффекты [85]. «Просветление» живой ткани в этом случае связано с увеличением ее оптической однородности за счет уплотнения рассеивающих центров (например, коллагеновых волокон мышечной ткани) и удаления крови и межтканевой жидкости (воды) из сдавливаемой области, что ведет к увеличению показателя преломления базового вещества, который становится сравнимым с показателем преломления коллагеновых волокон, что в свою очередь уменьшает рассеяние [22, 959]. Конечно, определенную роль играет и изменение характера поглощения за счет ухода крови из области надавливания. Теоретическое описание эффектов «просветления» биотканей при компрессии можно найти в [22, 166, 959, 960]. Локальное сдавливание и растягивание биотканей давно и успешно используется в лазерной хирургии [85], а также в лазерной терапии при чрезкожном облучении внутренних органов и крови [9, 10]. Следует однако помнить, что эффект просветления при надавливании некровенаполненных тканей, таких как склера глаза, имеет достаточно большую инерционность (несколько минут) за счет сравнительно медленной диффузии воды из области надавливания [961, 962].

Другим методом существенного уменьшения рассеяния является согласование показателей преломления рассеивающих центров и базового вещества за счет введения в ткань соответствующих препаратов, так называемых иммерсионных агентов. Качественно эти эффекты описываются соотношением (3.4). Экспериментальное наблюдение значительного просветления склеры глаза человека в видимой области спектра под действием *верографина*, *тразографа*, *глюкозы* и других препаратов описано в [10, 13, 22, 31, 34, 57, 222–224, 227, 430, 431, 846–854, 944, 955, 963–966] (см. также рис. 2.22 и 2.23). Физиологические концентрации глюкозы в биоткани незначительно изменяют ее коэффициент рассеяния, однако эти изменения оказываются вполне регистрируемыми с помощью современных оптических методов, из которых наиболее перспективен метод ОКТ [34, 564–566, 846–854, 955]. Аналогичное согласование преломляющих свойств многокомпонентных биотканей, обладающих поляризационной анизотропией формы (например, роговицы), приводит к уменьшению анизотропии ткани [5, 10, 22, 31].

Изменение характеристик рассеяния и пропускания суспензий α -кристаллинов, выделенных из хрусталиков глаза теленка, в зависимости от концентрации α -кристаллинов связывается авторами [964] с осмотическими явлениями в таких суспензиях. Сильно влияние осмотических и диффузионных процессов при просветлении склеры растворами *верографина*, *тразографа*, *глюкозы* и *полиэтиленгли-*

коля [224]. Осмотические явления оказываются также важными при воздействии растворов сахаров, спиртов и электролитов на оптические свойства биологических материалов (клеток и тканей), что может затруднить определение степени насыщения гемоглобина кислородом или обнаружение таких поглотителей, как цитохромоксидаза, в ткани оптическими методами [967, 968].

Собственные физиологические изменения в тканях и клетках также приводят к изменениям оптических свойств, что является как раз мерой таких изменений. Например, близкая к параболической зависимость коэффициента рассеяния от величины гематокрита Hct тонких слоев крови представлена в [247] (см. соотношение (1.39)), в этой же работе даны оптические характеристики крови в зависимости от степени насыщения гемоглобина кислородом.

Экспериментальные данные по просветлению патологической кожи, а также по управлению спектрами отражения и пропускания кожи под действием воды, солнцезащитных кремов и медицинских препаратов представлены в [22, 90, 969]. Эти эффекты связаны с вымыванием или, наоборот, внедрением дополнительных рассеивателей или поглотителей в ткань, а также с иммерсией показателей преломления рассеивателей и базового вещества.

УФ-облучение кожи приводит к возникновению эритемы (покраснению), образованию меланина, а при сильных воздействиях — к отеку и избыточному росту ткани [83, 87, 250, 567, 568, 970–972]. Все эти фотобиологические эффекты существенно изменяют оптические свойства кожи, что необходимо учитывать при фототерапии.

Под действием УФ-света, в том числе лазерного излучения, происходит радиационное окрашивание хрусталика глаза человека [484] и агрегация кристаллинов, приводящая к существенному возрастанию рассеяния света и, соответственно, уменьшению пропускания хрусталика [973, 974]. Уменьшение температуры хрусталика (до 12°C) может приводить к возникновению так называемой холодной катаракты, т. е. помутнению хрусталика (резкому увеличению коэффициента рассеяния за счет образования конгломератов протеинов) [386, 975]. Этот процесс обратим, и при увеличении температуры прозрачность хрусталика восстанавливается.

В процессе лазерной абляции или коагуляции биоткань меняет свои оптические свойства по сравнению с нормальной, что должно учитываться при лазерных хирургических вмешательствах [240, 976]. Например, при абляции ткани аорты эксимерным лазером (308 нм) оптическая плотность увеличивается в 2,3–3,7 раза по сравнению с нормальной тканью [240]. При коагуляции ткани аорты (100 °C, 300 с) ее коэффициент поглощения μ_a (в диапазоне длин волн 350–1750 нм) меняется незначительно (как правило, уменьшается не более чем на 21,4%, 630 нм), в то же время редуцированный коэффициент рассеяния μ'_s увеличивается весьма значительно, до 148,6% [240].

Детально исследования по оптическому просветлению биологических тканей, обсуждение физических механизмов просветления, методы и приложения представлены в монографиях [10, 22, 31, 854], а также в обзоре [977].

ЛАЗЕРЫ ДЛЯ БИМЕДИЦИНЫ

4.1. Принцип работы лазера и свойства лазерного излучения

Лазер представляет собой генератор оптических колебаний, использующий энергию индуцированно излучающих атомов или молекул в средах с инверсной заселенностью уровней энергии, которые обладают свойством усиливать свет определенных длин волн [978]. В качестве обратной связи в лазерах используют зеркала, которые образуют оптический резонатор. Зеркала имеют необходимый коэффициент отражения, обычно выходное зеркало в пределах 75–99 %, а «глухое» — 98 %, и обеспечивают достаточное число проходов пучка света через усиливающую среду (50–300), чтобы все потери света в системе были скомпенсированы за счет усиления активной среды и возникла генерация излучения. Населенность верхнего и нижнего уровней энергии атомов и молекул пропорциональны скорости накачки Λ_a , Λ_b и обратно пропорциональны скоростям релаксации уровней γ_a , γ_b (обратным временам жизни уровней) (рис. 4.1). Следовательно, разность заселенностей уровней

$$N_a - N_b = \frac{\Lambda_a}{\gamma_b} - \frac{\Lambda_b}{\gamma_a}.$$

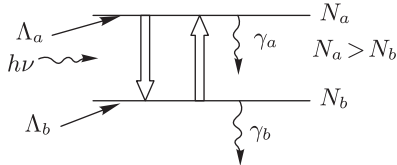


Рис. 4.1. Двухуровневая схема создания инверсии активной среды ($N_{a,b}$ — населенности верхнего и нижнего возбужденных уровней энергии молекул активной среды; $\Lambda_{a,b}$ — соответствующие скорости накачки уровней; $\gamma_{a,b}$ — скорости релаксации уровней; $h\nu$ — энергия кванта света (жирными стрелками показаны индуцированные переходы))

Усиление света в системе возможно в том случае, если в ней создана инверсная заселенность ($N_a - N_b > 0$), обеспечивающая преобладание актов индуцированного излучения (см. рис. 4.1, прямая стрелка вниз) над актами индуцированного поглощения (прямая стрелка вверх) и спонтанного разрушения верхнего уровня (волнистая стрелка вниз, γ_a). Инверсия может быть создана, если $\Lambda_a > \Lambda_b$ (при $\gamma_a \approx \gamma_b$) или $\gamma_b \gg \gamma_a$ (при $\Lambda_a \leq \Lambda_b$). В зависимости от рабочего вещества и способа его возбуждения (накачки) инверсия может существовать непрерывно или в течение некоторого времени, поэтому лазеры делятся на непрерывные и импульсные. В качестве рабочих можно использовать вещества во всех агрегатных состояниях: газы, жидкости, твердые тела. По этим признакам лазеры делятся на газовые, жидкостные, твердотельные. Лазеры также различают по способу накачки (создания инверсии): с оптической накачкой, газоразрядные, химические, инжекционные.

Принципиальная схема лазера показана на рис. 4.2. Возможны и более сложные схемы лазеров: с многозеркальными резонаторами, с внутррезонаторными оптическими элементами, с расположением зеркал внутри активного элемента. Основной вклад в излучение обычного (теплого) источника света дают спонтанные переходы

с верхнего возбужденного уровня a на нижний b (см. рис. 4.1), т.е. в системе отсутствуют инверсия и оптическая обратная связь, приводящие к существенным различиям в свойствах лазерных и нелазерных источников света. Лазерные источники обладают высокими монохроматичностью (временной когерентностью), пространственной когерентностью, направленностью, поляризованностью; значительными интенсивностью и яркостью излучения, сверхкороткой длительностью импульсов генерации и перестраиваемостью длины волны [7, 14, 17, 25, 35, 36, 39, 205, 978–1112].

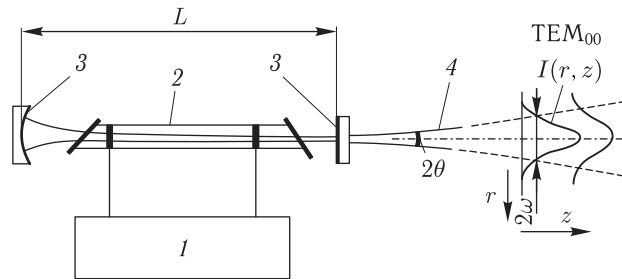


Рис. 4.2. Принципиальная схема лазера (L — длина резонатора; z, r — продольная и поперечная координаты; $I(r, z)$ — интенсивность излучения в точке (r, z) ; 1 — накачка; 2 — активный элемент; 3 — зеркала; 4 — лазерный пучок)

Монохроматичность (временная когерентность). Монохроматичность, или высокая спектральная плотность мощности (интенсивности) излучения, или значительная временная когерентность лазерного излучения, обеспечивает, во-первых, проведение спектрального анализа с разрешением, на много порядков превышающим разрешение традиционных спектрометров; во-вторых, высокую степень селективности возбуждения определенного сорта молекул в их смеси, что очень важно именно в биологии; в-третьих, реализацию голографических, дифрактометрических и интерферометрических методов диагностики биообъектов.

Степень монохроматичности одномодового лазера определяется шириной линии генерации возбужденной моды $\delta\nu_{\Gamma}$. Теоретический предел для $\delta\nu_{\Gamma}$, определяемый квантовыми флуктуациями, чрезвычайно мал и для различных лазеров непрерывного действия лежит в пределах от долей герца до десятков килогерц. В реальных лабораторных условиях линия генерации дополнительно уширяется за счет вибраций, акустических шумов, плазменных колебаний в активной среде и составляет величину от десятков герц до десятков мегагерц. Для импульсных лазеров ширина линии ограничена длительностью импульса $\tau_{\text{и}}$:

$$\delta\nu_{\Gamma} \approx 1/\tau_{\text{и}},$$

и может составлять довольно значительные величины для лазеров с короткой длительностью импульсов (для $\tau_{\text{и}} \approx 1$ нс $\delta\nu_{\Gamma} \approx 1$ ГГц).

Для лазеров, работающих на многих продольных модах, ситуация усложняется. В зависимости от решаемых задач и конкретных условий измерений можно обеспечить различную степень монохроматичности. С одной стороны, отдельная мода практически сохраняет свою высокую монохроматичность (узкая ширина линии $\delta\nu_{\Gamma}$), а с другой — мод становится много и их спектр занимает уже ширину $\Delta\nu_{\Gamma} \approx N(c/2nL)$, где N — число мод, $c/2nL$ — частотное расстояние между модами, определяемое оптической длиной резонатора nL (рис. 4.3). Поэтому если исследуемого объекта имеет спектральную структуру, сравнимую с $\delta\nu_{\Gamma}$, и в схеме измерений обеспечено выделение отдельной моды, то монохроматичность лазера

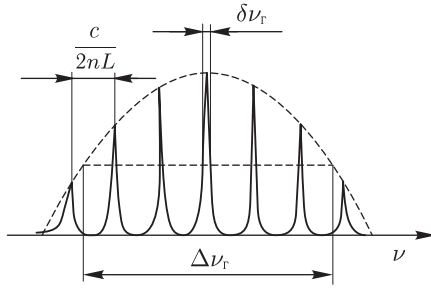


Рис. 4.3. Спектр продольных мод лазера ($\Delta\nu_g$ — ширина области генерации лазера; $\delta\nu_g$ — ширина линии генерации отдельной моды; $c/2nL$ — частотное расстояние между соседними продольными модами; c — скорость света; n — показатель преломления среды внутри резонатора)

может быть использована в полном объеме. В противном случае монохроматичность будет определяться полной шириной спектра $\Delta\nu_g$. Более того, в ряде задач, например при получении периодической последовательности сверхкоротких импульсов, необходимо возбуждать как можно больше мод, чтобы расширить полосу и образовать последовательность очень коротких импульсов света за счет фазовой синхронизации мод, $\tau_i \approx 1/\Delta\nu_g$.

Высокая монохроматичность определяет и высокую спектральную плотность излучения. Например, для типичного лазера с выходной мощностью 1 Вт, шириной линии 1 МГц, диаметром пучка 2 мм и $\lambda = 500$ нм спектральная плотность мощности на единице поверхности равна $2,6 \cdot 10^7$ Вт/(см² × нм). Для сравнения аналогичная величина для солнечного излучения равна примерно $1,3 \cdot 10^{-4}$ Вт/(см² · нм) (см. рис. 1.3).

Очевидно, что изменения в степени монохроматичности находят отражение и во временной когерентности такого источника, т.е. его способности образовать четкую ин-

терференционную картину при соответствующей временной задержке складываемых пучков. Удобно временную когерентность характеризовать длиной когерентности:

$$l_k = c\tau_k; \quad \tau_k \approx 1/\delta\nu_g; \quad l_k \approx c/\delta\nu_g.$$

Для гауссовой формы линии источника излучения

$$l_k = (2 \ln(2)/\pi)(\lambda^2/\Delta\lambda),$$

где λ — центральная длина волны излучения, $\Delta\lambda$ — ширина линии излучения на полувысоте.

Таким образом, для одномодовых лазеров непрерывного действия длина когерентности, т.е. допустимая длина разности хода интерферирующих пучков, может быть чрезвычайно большой, $3 \cdot 10^8$ – $3 \cdot 10^2$ см ($\delta\nu_g \approx 100$ Гц — 100 МГц), что, вообще говоря, превосходит типичные потребности биологических и медицинских исследований.

Для импульсных лазеров длина когерентности определяется длительностью импульса, $l_k \approx c\tau_i$ ($l_k \approx 30$ см при $\tau_i = 1$ нс). Для многомодовых лазеров с непрерывной накачкой степень когерентности в зависимости от расстояния носит осциллирующий характер: сначала она падает от единицы до нуля на длине $l_k \approx c/\Delta\nu_g$, а затем снова восстанавливается на длине, равной двум, четырем и так далее длинам резонатора. Полная потеря когерентности произойдет лишь на длине $c/\delta\nu_g$. Таким образом, при использовании многомодовых лазеров в интерференционных и голографических измерениях необходимо обращать внимание на это обстоятельство. Конечно, в биологических опытах практическое значение имеют не слишком большие задержки, поэтому целесообразно работать при длинах, соответствующих первому максимуму степени когерентности, т.е. для $l < l_k \approx c/\Delta\nu_g \approx 2nL/N$. Для He-Ne-лазера ($\lambda = 632,8$ нм) $\Delta\nu_g \approx 2$ ГГц, а $l_k \approx 15$ см.

Тепловые источники, например натриевая лампа (одна линия), имеют время когерентности порядка 100 пс, т.е. $l_k \approx 3$ см. Заметим, что лазеры с субнаносекундной длительностью импульсов или с шириной полосы генерации в несколько гигагерц

имеют такую же малую длину когерентности. В то же время маломодовые или одномодовые лазеры могут иметь чрезвычайно большую длину когерентности. Значения длины когерентности некоторых источников света, наиболее часто употребляемых в биологии и медицине, представлены в табл. 4.1.

Таблица 4.1. Длина когерентности излучения некоторых источников света

| Источник света | λ , нм | $\Delta\lambda$, нм | l_k , см |
|--|----------------|----------------------|---------------------|
| He-Ne-лазер: | | | |
| одночастотный | 632,8 | $4 \cdot 10^{-6}$ | 10^4 |
| многомодовый | 632,8 | 0,0013 | 30 |
| Многомодовый Аг-лазер | 488/514 | 0,013 | 2,0 |
| Лазер на красителях: | | | |
| с накачкой от Аг-лазера | 610–720 | 2,0 | 0,02 |
| с оптическим клином | 610–720 | 0,3 | 0,14 |
| с оптическим клином и эталоном | 610–720 | 0,05 | 0,85 |
| Полупроводниковый лазер на AlGaAs: | | | |
| одночастотный | 780–905 | $2,4 \cdot 10^{-4}$ | $3 \cdot 10^2$ |
| многомодовый | 780–905 | 1,0 | 0,08 |
| Многомодовый АИГ:Nd-лазер | 1064 | 0,11 | 1,0 |
| Титан-сапфировый лазер с синхронизацией мод по методу керровской линзы | 700–1100 | 140 | $2,1 \cdot 10^{-4}$ |
| Суперлюминесцентный диод | 830 | 26 | $1,2 \cdot 10^{-3}$ |
| Натриевая лампа (желтый дублет) | 589 | 0,59 | 0,06 |
| Видимое солнечное излучение | 550 | 300 | 10^{-4} |

Пространственная когерентность и направленность лазерных пучков. Пространственная когерентность излучения лазеров дает возможность получать пучки света с высокой степенью их направленности (коллимированности) и позволяет фокусировать их на объекте до чрезвычайно малых размеров, что в отличие от тепловых источников обеспечивает дистанционность анализа изучаемых объектов, локальность исследований и эффективность транспортировки излучения по волоконным световодам.

Лазеры, как правило, излучают пространственно-когерентные гауссовы пучки (TEM₀₀-мода), т. е. пучки, в которых интенсивность поперек пучка (по координате r) описывается гауссовой функцией (см. рис. 4.2):

$$I(r, z) = I(0, z) \exp\left\{-2\frac{r^2}{w(z)}\right\}, \quad (4.1)$$

здесь $I(0, z)$ — интенсивность в центре пучка ($r = 0$); $w(z)$ — радиус пучка лазера; z — продольная координата.

Угол расходимости гауссова пучка [985]

$$\vartheta = \frac{\lambda}{\pi w(0)}, \quad (4.2)$$

где λ — длина волны излучения; $w(0)$ — радиус пучка в перетяжке при $z = 0$ (наиболее узкой части пучка, которая обычно находится внутри резонатора лазера или на выходном зеркале). Параметры $w(0)$ и ϑ являются важными характеристиками

лазеров и задаются в основном параметрами резонатора. При достаточном удалении от лазера, $z \gg \pi w^2(0)/\lambda$, размер пучка лазера определяется соотношением

$$w(z) = \frac{\lambda z}{\pi w(0)} = z\vartheta. \quad (4.3)$$

Заметим, что расширение пучка с помощью соответствующей оптической системы позволяет уменьшить расходимость [982]:

$$\vartheta_2 = \vartheta_1 \frac{w_1}{w_2}, \quad (4.4)$$

т. е. при увеличении размера пучка в 10 раз во столько же раз уменьшается расходимость.

Гауссов пучок имеет минимально возможную расходимость. Лазерные пучки в режиме поперечной моды наименьшего порядка (TEM_{00})¹⁾ характеризуются чрезвычайно высокой пространственной когерентностью, близкой к предельной, обусловленной квантовыми флуктуациями, и только примесь поперечных мод высших порядков может существенно ее уменьшить.

Мерой пространственной когерентности является видность (контраст) интерференционной картины, образованной двумя пучками света от пространственно разделенных расстоянием s участков площадки излучения источника света:

$$v(s) = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}}, \quad (4.5)$$

где I_{\max} , I_{\min} — интенсивности света в максимуме и минимуме интерференционной картины; $v = 1$ — соответствует полной когерентности, $v = 0$ — полной некогерентности; площадь πs_k^2 , в пределах которой видность выше 0,7, называется площадью когерентности.

Для большинства лазеров расходимость составляет несколько тысячных радиана (миллирадиан, мрад). Такой пучок можно сфокусировать до очень малых размеров. Диаметр пучка в фокусе линзы с фокусным расстоянием f [985]

$$d \approx \frac{\lambda f}{\pi w(0)} = f\vartheta.$$

Для очень короткофокусных оптических систем (микроскопов и пр.) $f \leq \pi w(0)$, следовательно, пучок можно сфокусировать до размеров порядка длины волны. Однако для сильно расходящихся пучков, например в случае полупроводниковых лазеров, такие возможности ограничены, так как требуются слишком малые значения f , не достижимые на практике.

Существует возможность уменьшения расходимости излучения самого лазера разнообразными приемами, например применением телескопических резонаторов или ВРМБ-зеркал (ВРМБ-зеркало работает на принципе обращения волнового фронта при вынужденном рассеянии Мандельштама–Бриллюэна) [983]. Такими способами удается снизить расходимость более чем на порядок.

Важно отметить, что в ряде биологических приложений сфокусированный «рабочий пучок» оказывается существенно меньше размеров длины волны и составляет около 0,01 мкм, поскольку действие светового излучения в зависимости от интенсивности носит пороговый характер. Действительно, если при облучении объекта интенсивность пучка подобрать так, чтобы пороговые условия, соответствующие определенному виду воздействия, например коагуляция белка, на конкретный исследуемый объект, выполнялись только в самом центре пучка, то воздействующая

¹⁾ Эквивалентно употребленному выше термину — продольные моды.

на биообъект часть пучка будет существенно меньше его размеров. Таким способом можно, например, проводить тонкую внутриклеточную «хирургию», оперируя фактически с помощью самой «горячей» точечной области в центре сфокусированного пучка лазера.

Важной характеристикой при биологических исследованиях является глубина резкости фокусировки, которая лежит в основе лазерной микрохирургии и определяет продольный размер объема сфокусированного пучка [982]:

$$\Delta = \pm \frac{d^2}{\lambda}. \quad (4.6)$$

При $d \approx \lambda$, $\Delta \approx d \approx \lambda$. При $d > \lambda$ глубина резкости больше размера пучка в фокусе.

Роль расходимости излучения можно представить себе, если сравнить интенсивности излучения, полученные от теплового и лазерного источников одинаковой мощности P , расположенных на расстоянии z от биообъекта [982]:

$$I_{\text{тепл}} = \frac{P}{4\pi z^2}; \quad I_{\text{лаз}} \approx \frac{P}{\pi w^2} = \frac{P}{\pi z^2 \vartheta^2}. \quad (4.7)$$

Следовательно, $I_{\text{лаз}}/I_{\text{тепл}} = 4/\vartheta^2$. А поскольку расходимость $\vartheta \approx 10^{-3}$, то $I_{\text{лаз}} \approx 10^6 I_{\text{тепл}}$.

Поляризованность. Лазеры характеризуются высокой степенью поляризованности излучения, что является следствием когерентности их излучения. Однако вид поляризации (линейная, круговая, эллиптическая) у разных лазеров может быть различен. В большинстве случаев тип поляризации связан со свойствами оптического резонатора, а иногда с особенностями активной среды (среда во внешнем магнитном поле). Резонаторы с очень сильной амплитудной анизотропией, создаваемой брестеровскими окошками газоразрядной трубки или внутренними призмами, имеют устойчивую линейную поляризацию. Для промышленных лазеров с линейной поляризацией степень поляризованности, т. е. отношение интенсивностей света при взаимноортогональных положениях поляризационного анализатора, $I_{\parallel} : I_{\perp} = 500 : 1$. Для лазеров с малым усилением квантовые и технические флуктуации практически не приводят к деполаризации излучения; для лазеров, имеющих значительный коэффициент усиления активной среды, например He–Ne с $\lambda = 3,39$ мкм, внешнее магнитное поле существенно влияет на характер поляризации.

Другой класс часто используемых резонаторов лазеров — изотропные резонаторы. Промышленность выпускает лазеры с внутренними зеркалами. Высокое качество зеркал таких лазеров обеспечивает идеальную круговую поляризацию излучения, $I_{\parallel} : I_{\perp} = 1 : 1$. Но степень поляризации (азимут и эллиптичность) оказывается более чувствительной к возмущениям, чем в случае сильно анизотропных резонаторов. В многомодовых лазерах с изотропными резонаторами (или со слабой анизотропией) поляризация отдельных мод изменяется сложным образом в зависимости от изменения параметров лазеров, и для некоторых промышленных лазеров это служит причиной скачков и медленных изменений поляризации, а следовательно, значительной нестабильности оптической мощности в измерительном тракте, содержащем оптические элементы.

Передача лазерного излучения по волоконным световодам круглого сечения приводит к деполаризации излучения за счет возбуждения многих волноводных мод. В зависимости от качества световода длина, на которой происходит полная деполаризация излучения, изменяется от нескольких сантиметров до нескольких метров. Сравнительно широкие медицинские световоды с диаметром сердцевины 400–1000 мкм имеют малую длину деполаризации (несколько сантиметров). Разработаны специальные одномодовые анизотропные световоды, которые сохраняют состояние поляризации, но

поперечный размер их сердцевин чрезвычайно мал, 5–7 мкм, поэтому существует проблема ввода излучения в такие световоды (см. гл. 5).

Интенсивность и яркость. Высокая интенсивность лазерного излучения позволяет сконцентрировать в малом объеме значительную световую энергию, тем самым вызвать многофотонные и другие нелинейные процессы в биологической среде, локальный тепловой нагрев, быстрое испарение, гидродинамический взрыв и т. д. Во многих случаях важна высокая спектральная плотность интенсивности излучения, которая при равных мощностях, приходящихся на одинаковые площади поверхности, оказывается существенно выше у лазерного источника, чем у теплового. Разница появляется из-за более узкой спектральной линии лазера, по сравнению с тепловым источником, и составляет от нескольких до десятков порядков. Учет разной расходимости лазерных и нелазерных источников света показывает (см. (4.7)), что интенсивность лазерных источников оказывается значительно выше, в 10^2 – 10^6 раз, чем нелазерных, при равной мощности их излучения.

К важнейшим параметрам источника света относится не только мощность и интенсивность, но и яркость. Яркость определяется как мощность на единицу площади и единицу телесного угла, или интенсивность в телесном угле. Для пучка круглого сечения радиусом $w(0)$, расходимостью ϑ и полной мощностью P имеем [982]

$$B = \frac{P}{\pi^2 w^2(0) \vartheta^2} \quad (4.8)$$

или, с учетом (4.2), для лазерных пучков

$$B = \frac{P}{\lambda^2}, \frac{\text{Вт}}{\text{см}^2 \cdot \text{ср}}. \quad (4.9)$$

Интенсивность, которую получают в фокусе линзы, оказывается тем больше, чем больше яркость пучка. Оптическая обработка пучка с помощью системы линз и других оптических элементов, как правило, не увеличивает яркость, поскольку сжатие пучка всегда сопровождается увеличением его расходимости (см. (4.2) и (4.8)).

Так же как и спектральная плотность интенсивности, важным параметром является спектральная плотность яркости $B_\nu = B/\Delta\nu$ или $B_\lambda = B/\Delta\lambda$, где $\Delta\nu$ или $\Delta\lambda$ — ширина линии источника, $\Delta\nu = c(\Delta\lambda/\lambda^2)$.

Интересно сравнить яркость часто используемой в биологических исследованиях дуговой лампы, например ксеноновой, лампы киловаттной мощности и аргонового лазера мощностью 1 Вт ($\lambda = 488,0$ нм). Для дуговой лампы $B = 10^3$ Вт/(см² × ср), $B_\nu = 10^{-10}$ Вт/(см² · ср · Гц) [982], а для лазера $B = 4 \cdot 10^8$ Вт/(см² · ср), $B_\nu = 10^{-1}$ Вт/(см² · ср · Гц) (многомодовый режим генерации).

Для сравнения приведем параметры другого хорошо известного в фотобиологии источника — ртутной лампы высокого давления с выходной мощностью 100 Вт, яркостью 95 Вт/(см² · ср) и спектральной плотностью яркости $B_\lambda = 9,5$ Вт/(см² × ср · нм) ($\lambda = 546$ нм и $\Delta\lambda = 10$ нм) — и одного из наименее интенсивных лазерных источников, He–Ne-лазера, мощностью 1 мВт ($\lambda = 632,8$ нм, $\Delta\lambda \approx 6 \cdot 10^{-10}$ нм), для которого $B = 2,5 \cdot 10^5$ Вт/(см² · ср), а $B_\lambda \approx 4,2 \cdot 10^{14}$ Вт/(см² · ср · нм) [5, 985].

Сверхкороткая длительность. Одним из замечательных свойств лазеров является возможность получения импульсов пикосекундной и фемтосекундной длительности. В видимой области удалось вплотную подойти к теоретическому пределу по длительности (два-три периода световых колебаний) и сформировать импульсы длительностью 6 фс, что составляет всего три световых колебания. Это дает возможность изучать очень быстрые первичные фотопроцессы в биологии прямыми, а не косвенными методами, а также многоступенчато возбуждать высокие энергетические

состояния молекул за время значительно меньшее, чем скорость релаксации любого промежуточного состояния [294].

Для изучения большинства быстрых фотопроцессов в биологии достаточной оказывается длительность импульсов в несколько пикосекунд, но для изучения ультрабыстрых стадий преобразования энергии некоторыми биомолекулами необходимы и субпикосекундные источники (около 100 фс) [294]. Однако чем короче импульс, тем шире его спектр, $\Delta\nu \cdot \tau_{\text{и}} \approx 1$ или $\Delta\lambda \cdot \tau_{\text{и}} \approx \lambda^2/c$, т. е. при $\tau_{\text{и}} = 100$ фс и $\lambda = 500$ нм, $\Delta\lambda \approx 8$ нм, а в случае приближения к теоретическому пределу $\tau_{\text{и}} \approx 2$ фс, $\Delta\lambda \approx 400$ нм, что перекрывает всю видимую область, т. е. лазер излучает белый свет, при этом длина когерентности его излучения не превышает 1 мкм. Для создания лазеров с ультракороткой длительностью импульсов используют режим фазовой синхронизации многих продольных мод.

Перестраиваемость длины волны. Свойство лазеров перестраивать длину волны в совокупности с чрезвычайной монохроматичностью излучения позволяет использовать лазеры в качестве спектрометров ультравысокого разрешения. Любой лазер допускает перестройку частоты (длины волны). Правда, для одних лазеров она может быть только дискретной с очень узким диапазоном перестройки вблизи дискретных длин волн, а для других — непрерывной в довольно широком диапазоне длин волн. Наличие перестраиваемых лазеров во всем диапазоне от УФ до ИК позволяет селективно возбуждать практически любые состояния биомолекулы и отдельных ее фрагментов.

Образование спеклов. Одним из важных для применения лазеров свойств является способность формировать спекл-картину при отражении когерентного света от шероховатой поверхности (см. главу 2). Рассеянный поверхностью свет состоит из хаотического скопления темных и светлых пятен (спеклов). Спекл-картина формируется за счет сложной интерференции вторичных волн от рассеивающих центров, расположенных на поверхности объекта и в приповерхностном слое, куда проникает свет. Поскольку биообъекты в большинстве своем шероховаты, оптически прозрачны и неоднородны, то они всегда должны формировать спекл-картину и тем самым вносить некоторые искажения в результаты исследований. С другой стороны, спекл-поле несет информацию о свойствах поверхности и приповерхностного слоя, что используется, например, в диагностических целях.

Если спекл-картина наблюдается на достаточно удаленном от объекта экране, то средний диаметр зерна (спекла) определяется соотношением

$$d_{\text{с}} = \frac{\lambda l}{w}, \quad (4.10)$$

где l — расстояние от объекта до экрана, w — радиус лазерного пучка на объекте, $l > 2d_{\text{с}}w/\lambda$.

4.2. Газовые лазеры

Рассмотрение принципов работы и параметров излучения наиболее интересных для биологии лазеров и лазерных систем [978–1112] (на рис. 4.4 и 4.5 показаны примерные уровни их мощности и энергии, а также спектральные диапазоны перестройки) начнем с газовых лазеров.

Наиболее простым и доступным среди газовых лазеров, да и среди всех остальных, является *гелий-неоновый* (He–Ne) лазер, работающий на возбужденных атомах неона. Накачка осуществляется с помощью тлеющего разряда, возбуждаемого в узком капилляре (1–5 мм), заполненном гелием и неоном в соотношении (5–10) : 1 при общем давлении (1–5) · 133 Па. Лазер может работать на многих линиях в видимой и

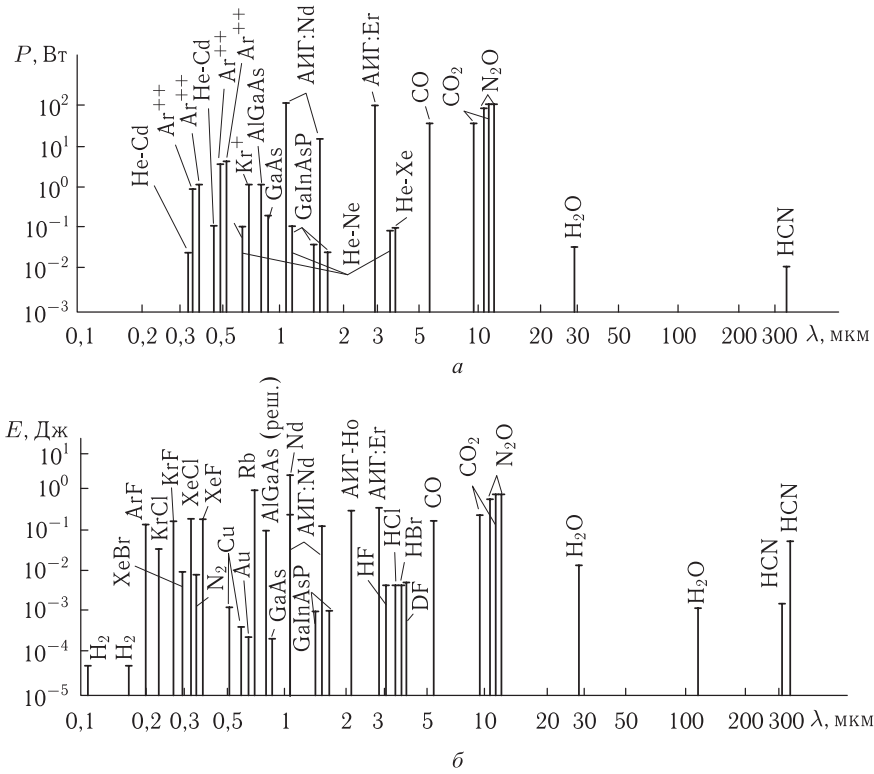


Рис. 4.4. Длины волн и энергетические параметры наиболее распространенных лазеров: а — непрерывных; б — импульсных

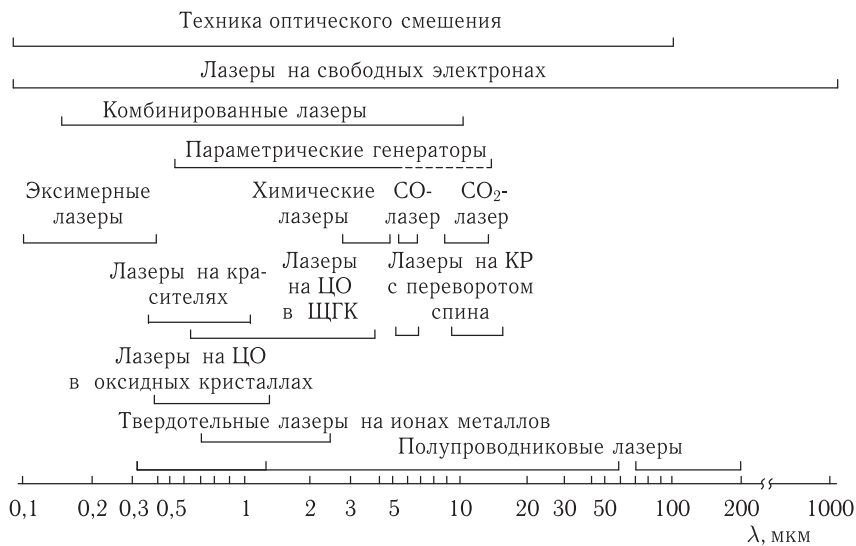


Рис. 4.5. Спектральные диапазоны различных перестраиваемых источников когерентного излучения

ближней ИК-области спектра (всего более 200 линий). Однако наиболее интенсивными являются линии с длинами волн $\lambda = 632,8, 1152,3$ и $3391,2$ нм. Уровень выходной мощности в зависимости от конструкции (в основном, длины активного элемента) составляет от долей до сотен милливатт. Для линии 632,8 нм удельная мощность с единицы активного элемента равна 50 мВт/м при удельной мощности разряда 50 Вт/м. Для получения такого значения удельной мощности и стабильной генерации лазера необходимо подавлять сопутствующую генерацию на $\lambda = 3391,2$ нм, для чего разработаны разнообразные средства, широко применяемые в коммерческих и лабораторных образцах лазеров.

Наиболее простым и надежным средством, позволяющим получить высокую стабильность параметров излучения, является применение специальной технологии интерференционных покрытий зеркал лазера, обеспечивающих высокое отражение на рабочей длине волны и малое — на длине волны конкурирующего перехода. Такой путь открывает возможность создания целой гаммы стабильных и надежных He–Ne-лазеров с достаточной мощностью и широким набором длин волн, удовлетворяющих потребностям многих задач диагностики и терапии. Ряд зарубежных фирм выпускает He–Ne-лазеры с «новыми», нетрадиционными, длинами волн.

Фирма PMS Electro-Optics выпускает около 100 различных типов He–Ne-лазеров, параметры некоторых из них представлены в табл. 4.2. В зависимости от модификации лазеры могут работать в режиме только продольных мод (TEM_{00}) или многих мод (TEM_{mn}), иметь линейную или случайную поляризацию, излучать на одной, двух длинах волн или перестраиваться по длинам волн. Кроме указанных в табл. 4.2 лазеров фирма производит лазеры с $\lambda = 730$ и 2396 нм.

Данные табл. 4.2 иллюстрируют возможности дискретной перестройки длины волн He–Ne-лазера путем замены зеркал, оптимизированных на генерацию конкретной линии излучения. Для получения генерации на линиях с малым усилением зеркала должны быть просветлены (иметь малый коэффициент отражения) на линиях с большим коэффициентом усиления с $\lambda = 632,8$ и $3391,2$ нм [1004]. Заменой зеркал легко произвести перестройку серийных лазеров, работающих на $\lambda = 632,8$ нм, на любую другую длину волны. Например, в [1004] описан ряд созданных на базе промышленных конструкций лазеров, в том числе лазер типа ЛГН-208, перестроенный на $\lambda = 612,0$ нм. При активной длине разряда 150 мм и диаметре капилляра $d = 1$ мм мощность излучения лазера достигает 0,5 мВт. Отечественная промышленность выпускает двух- и трехцветные лазеры типа ЛГН-215 с длинами волн 632,8 нм (55 мВт) и 730,5 нм (1–3 мВт) и типа ЛГН-113 с $\lambda = 632,8$ нм (10 мВт), 1152,3 нм (3 мВт) и 3391,2 нм (3 мВт). Перестройка длины волны осуществляется заменой зеркал, в последнем случае сменные выходные зеркала располагаются на турели, что дает возможность быстрой перенастройки лазера.

Конечно, перестройка длин волн путем замены зеркал не всегда удобна, поэтому часто в лабораторных условиях используют более широкополосные зеркала, допускающие одновременную генерацию на нескольких линиях, а перестройку осуществляют поворотом дисперсионного элемента внутри резонатора (призмы). Таким способом можно без изменений наполнения активного элемента лазера типа ЛГН-215 получить одновременную генерацию на пяти длинах волн вблизи $\lambda = 632,8$ нм с общей мощностью 4,8 мВт при соотношении мощностей $P_{633} : P_{612} : P_{640} : P_{629} : P_{635} = 1 : 0,5 : 0,4 : 0,1 : 0,1$ [1004]. Серия промышленных перестраиваемых лазеров с другим набором длин волн представлена в табл. 4.2. Использование поворачивающихся призм внутри резонатора дает последовательную генерацию на восьми длинах волн в диапазоне 543,3–730,5 нм с мощностью до 30 мВт, на $\lambda = 632,8$ нм и 10 мВт на $\lambda = 611,8$ нм, а также вблизи $\lambda = 1152,3$ нм (1079,8; 1084,4; 1140,9; 1160,1; 1161,4; 1176,7; 1198,6) с мощностью от долей до

Таблица 4.2. Параметры He-Ne-лазеров фирмы PMS Electro-Optics (длина резонатора $L \approx 34$ см)

| Цвет излучения | Длина волны, λ , нм | Мощность излучения, P , мВт | Модовый состав | Диаметр пучка, $2w$, мм | Расходимость, 2θ , мрад |
|------------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|-------------------|--------------------------|--------------------------------|
| Зеленый | 543 | 0,20–1,0 | TEM ₀₀ | 0,76 | 0,88 |
| | 543 | 0,35–1,5 | TEM _{mn} | 0,90 | 1,20 |
| Желтый | 594 | 0,20–1,5 | TEM ₀₀ | 0,76 | 0,88 |
| | 594 | 0,35–7,0 | TEM _{mn} | 0,9–1,2 | 1,2–2,0 |
| Оранжевый | 612 | 0,20–3,0 | TEM ₀₀ | 0,76 | 0,88 |
| | 612 | 0,35–7,0 | TEM _{mn} | 0,9–1,2 | 1,2–2,0 |
| Красный | 633 | 4,0–5,0 | TEM ₀₀ | 0,83 | 0,90 |
| | 633 | 5,0–15,0 | TEM _{mn} | 1,2–1,4 | 2,0–3,5 |
| Желто-оранжевый | 594/612 | 0,2–0,5 | TEM ₀₀ | 0,76 | 0,88 |
| | 594/612 | 0,3–0,6 | TEM _{mn} | 0,90 | 1,20 |
| Оранжево-красный | 612/633 | 0,5–1,0 | TEM ₀₀ | 0,76 | 0,88 |
| | 612/633 | 0,6–1,0 | TEM _{mn} | 0,90 | 1,20 |
| Перестраиваемое по цвету излучение | 543 | 0,1–0,3 | TEM ₀₀ | 0,76 | 0,90 |
| | 594 | 0,2–0,6 | TEM ₀₀ | 0,76 | 0,90 |
| | 604 | 0,2–0,5 | TEM ₀₀ | 0,76 | 0,90 |
| | 612 | 0,5–2,5 | TEM ₀₀ | 0,76 | 0,90 |
| | 633 | 2,0–4,0 | TEM ₀₀ | 0,76 | 0,90 |
| Инфракрасный | 1152 | 1,0 | TEM ₀₀ | 0,83 | 1,6 |
| | 1152 | 1,0–2,0 | TEM _{mn} | 1,40 | 3,5 |
| | 1523 | 0,5–1,0 | TEM ₀₀ | 0,83 | 1,6 |
| | 3391 | 1,0 | TEM ₀₀ | 0,83 | 1,6 |
| | 3391 | 1,0 | TEM _{mn} | 1,40 | 3,5 |

нескольких милливатт на каждой линии [1004–1008]. Перестройку длин волн можно осуществлять и более простым способом — путем изменения длины резонатора, однако при этом необходим контроль выходной мощности лазера [982, 993, 1008, 1009]. В [1009] описан лазер с быстрым переключением следующих длин волн: 632,8 нм (0,6 мВт), 3391,2 нм (1,5 мВт), 4218,3 нм (0,6 мВт). Гелий-неоновые лазеры могут работать и на более длинных волнах. В [1010] описан лазер с длиной волны 5404,8 нм (0,1 мВт). Вообще He-Ne-лазеры генерируют излучение вплоть до 57 мкм [979]. Гелий-неоновые лазеры характеризуются высокой стабильностью параметров излучения и значительным сроком службы (до 100 тыс. ч). Кратковременные флуктуации выходной мощности серийных лазеров и ее долговременные уходы составляют обычно несколько процентов [982, 993, 1011]. В качестве примера в табл. 4.3 приведены параметры двух промышленных отечественных лазеров, которые представляют интерес для применения в биомедицине. Лазеры выпускаются с внешними или внутренними зеркалами. В первом случае для герметизации активного элемента используются окна Брюстера и излучение лазера становится линейно поляризованным с высокой степенью поляризации, $I_{\parallel}/I_{\perp} = 500 : 1$. Во втором случае удается несколько повысить выходную мощность, а поляризация излучения оказывается круговой с равным соотношением интенсивностей для двух взаимно перпендикулярных направлений поляризации $I_{\parallel}/I_{\perp} = 1 : 1$.

Таблица 4.3. Малогабаритные He-Ne-лазеры ($\lambda = 632,8$ нм) [1012]

| Параметры | ЛГН-207А | ЛГН-208А |
|---|---------------------|---------------------|
| Выходная мощность, мВт | 1,5 | 2,0 |
| Модовый состав | TEM ₀₀ | TEM ₀₀ |
| Степень поляризации, I_{\parallel}/I_{\perp} | 500 : 1 | 1 : 1 |
| Расходимость излучения, мрад | 2,2 | 2,2 |
| Нестабильность оси диаграммы направленности, мрад | | |
| за 8 ч | $2,5 \cdot 10^{-2}$ | $2,5 \cdot 10^{-2}$ |
| за 1 мин | $5 \cdot 10^{-4}$ | $5 \cdot 10^{-4}$ |
| Медленный дрейф мощности, % | 5 | 5 |
| Кратковременные флуктуации мощности в полосе 20 Гц – 200 кГц, % | 0,5 | 0,5 |
| Конструктивные особенности | Окна Брюстера | Внутренние зеркала |

Для большинства современных конструкций He-Ne-лазеров характерным является режим работы на наименее поперечной моде TEM₀₀, имеющей гауссово распределение интенсивности поперек пучка без провалов интенсивности. Диаметр пучка для лазера с $\lambda = 632,8$ нм обычно составляет 0,5–0,8 мм для маломощных и 2 мм для более мощных. Типичные схемы He-Ne-лазеров показаны на рис. 4.6, а–г.

Характеристики другого атомарного лазера, He-He, очень похожи на характеристики He-Ne-лазера с $\lambda = 3391,2$ нм. Гелий-ксеноновый лазер работает в ИК-области спектра на длинах волн 2026,2, 3508,0, 3869,7 и 5575,4 нм, обладает чрезвычайно

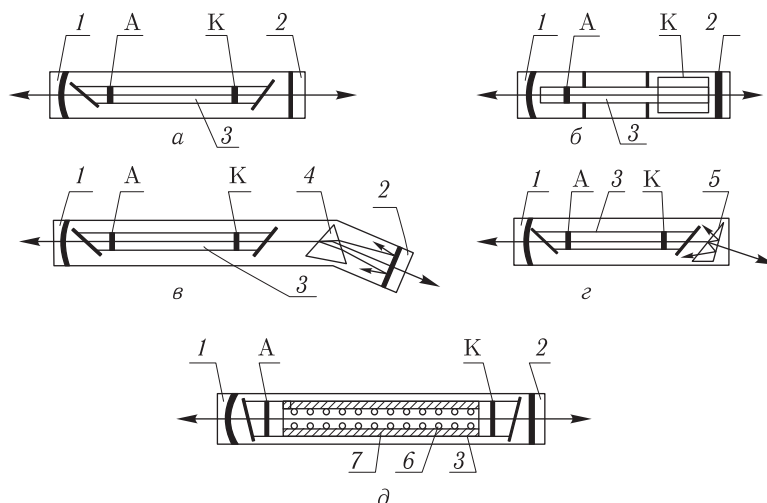


Рис. 4.6. Типичные схемы атомарных лазеров: а – He-Ne с внешними зеркалами; б – He-Ne с внутренними зеркалами; в, г – He-Ne с призмными резонаторами; д – импульсный лазер на парах меди или золота (1, 2 – зеркала; 3 – активный элемент или рабочий капилляр; 4 – призма Брюстера; 5 – призма Литтлова; 6 – кусочки металла; 7 – теплоизолирующий порошок; А – анод; К – катод)

высоким усилением, узкой линией генерации и сравнительно малой мощностью (не более 10 мВт на $\lambda = 3508$ нм при длине лазера $L \approx 0,5$ м) [1011].

При всех достоинствах He-Ne- и He-Xe-лазеров они имеют ряд существенных недостатков, к которым можно отнести малый коэффициент полезного действия (КПД), около 0,1%, и малый уровень выходной мощности. Более значительными КПД и уровнями средней мощности обладают импульсные атомарные лазеры, использующие пары изолированных атомов в качестве рабочей среды — это лазеры на так называемых самоограниченных переходах [978]. Интересными для биомедицинских применений являются *лазеры на парах меди и золота*, генерирующие интенсивное излучение в видимом диапазоне на зеленой, желтой и красной линиях [1094]. Наиболее интенсивной (около 70% от общей интенсивности) является зеленая линия медного лазера с $\lambda = 510,5$ нм. Длина волны желтой линии равна 578,2 нм. Красное излучение лазера на парах золота имеет длину волны 627,8 нм.

Схематически конструкция рассматриваемых лазеров показана на рис. 4.6, д. Инверсия создается импульсным газовым разрядом в смеси паров металла и буферного газа (гелия и неона). Обеспечивается высокая температура внутри активного элемента (1500–1700 °С). Средняя мощность у медных лазеров, выпускаемых промышленностью, $P = 1\text{--}40$ Вт, частота следования импульсов $f = 2\text{--}30$ кГц, их длительность $\tau_{\text{и}} = 3\text{--}50$ нс, мощность в импульсе достигает 200 кВт, энергия в импульсе, определяемая соотношением $E_{\text{и}} = P_{\text{и}}\tau_{\text{и}} = P_{\text{ср}}/f$, составляет примерно $2 \cdot 10^{-3}$ Дж. Для лазеров на парах золота при прочих равных условиях средняя мощность в 4–8 раз меньше, примерно во столько же раз меньше энергия в импульсе. КПД медного лазера составляет $\sim 1\%$. Угловая расходимость излучения примерно такая же, как у He-Ne-лазера, т.е. около 2 мрад, диаметр пучка для 8-ваттного лазера — около 15 мм. Благодаря значительному усилению среды использование неустойчивого резонатора позволяет снизить расходимость до 0,9 мрад. Разработаны трехцветные лазеры на смеси меди и золота, а также лазеры специального медицинского применения, в том числе полностью автоматизированные, с водяным и воздушным охлаждением [1013–1016, 1094]. Атомарные лазеры на парах металлов интересны тем, что являются самыми мощными источниками излучения в видимой области, особенно важны зеленая и красная линии; их излучение хорошо пропускается волоконными световодами (до 70% при диаметре световода 1000 мкм). Они обладают узкой линией и имеют малую расходимость, поэтому используются для эффективной накачки лазеров на красителях, работающих в диапазоне 530–950 нм.

Среди ионных лазеров на благородных газах наибольшее распространение получили *лазеры на однократно ионизированных атомах аргона и криптона* [978–980, 993, 997, 1011, 1017–1023]. Для возбуждения используется дуговой разряд. Такие лазеры являются самыми мощными лазерами непрерывного действия видимого и ближнего УФ-диапазонов длин волн. Суммарная мощность P на многих линиях промышленных лазеров (данные фирм: LiCONiX, American Laser, Laser Ionics, Coherent, Omnicrome и др.) в области длин волн 457,9–514,5 нм достигает 50 Вт, а в УФ-области (351,1–363,8 нм) $P \leq 5$ Вт. Для криптонового лазера на $\lambda = 647,1\text{--}676,4$ нм $P \leq 14$ Вт, на $\lambda = 350,7\text{--}356,4$ нм $P \leq 4,6$ Вт. Для лазеров на смеси газов (Ag + Kr) $P \leq 20$ Вт.

В зависимости от типа и конструктивных особенностей Ag- и Kr-лазеры могут работать на многих линиях в различных спектральных диапазонах, на одной линии (в многомодовом или одномодовом режимах) или даже на единственной продольной

моде (одночастотная генерация). Например, лазеры фирмы Coherent [1023] излучают в следующих спектральных диапазонах и на отдельных длинах волн (нм):

Ag-лазеры — (336,6–363,8); (351,1–363,8); 454,5; (454,5–457,9); 457,9; (457,9–514,5); (457,9–501,7); (465,8–514,5); 488,0 и 514,5; 488,0 и (351,1–363,8); 528,7; 1090;

Kr-лазеры: — (337,5–356,4); (350,7–356,4); (406,7–415,4); (468,0–530,9); (468,0–482,5); (476,2–530,9); (520,8–568,2); 568,2; (647,1–676,4); (752,5–799,3).

Так же как и в He–Ne-лазерах, для выделения отдельных линий и спектральных диапазонов используются селективные зеркала, оптимизированные на выбранные длины волн.

Низкий КПД ионных лазеров, который не превышает 0,2%, требует использования мощных источников питания и эффективного охлаждения кварцевого, керамического или металлокерамического активного элемента; обычно это водяное охлаждение. Для маломощных конструкций используется воздушное охлаждение. Типичная схема Ag-лазера с кварцевым или керамическим капилляром и водяным охлаждением показана на рис. 4.7.

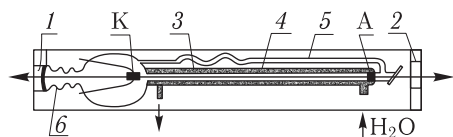


Рис. 4.7. Типичная схема ионных лазеров на благородных газах (Ag, Kr): 1, 2 — зеркала; 3 — кварцевый или керамический рабочий капилляр; 4 — рубашка водяного охлаждения; 5 — обводной канал, выравнивающий давление газа; 6 — соединительный сильфон; А — анод; К — катод

Удельная выходная мощность на каждой из основных линий генерации Ag-лазера с $\lambda = 488,0$ и $514,5$ нм составляет 5 Вт/м при соотношении тока разряда к диаметру рабочего капилляра 25 А/мм, диаметр трубки — обычно 1–3 мм, давление аргона — $(0,7–1,0) \cdot 133$ Па. Диаметр пучка излучения Ag- и Kr-лазеров в зависимости от типа лазера изменяется в пределах 1,5–2,0 мм, расходимость излучения $2\vartheta = 0,4–0,8$ мрад.

Использование широких капилляров порядка 7–10 мм и малых давлений газа, $p = (0,3–0,4) \cdot 133$ Па, позволяет в лабораторных условиях получать непрерывную удельную мощность до 100 Вт/м, создавать источники УФ-излучения на $\lambda = 351,1$ и $363,8$ нм с мощностью до 10 Вт [1019, 1020]. Интерес для биологии и медицины представляют УФ-лазер умеренной мощности, излучающий в диапазоне 334,0–363,8 нм суммарную мощность порядка 1 Вт, а на $\lambda = 351,1$ нм — около 0,25 Вт [1018], а также мощный аргоновый лазер сине-зеленого диапазона, 454,5–514,5 нм, работающий в режиме TEM₀₀-моды (диаметр пучка излучения ≤ 2 мм, расходимость — 0,6 мрад, нестабильность мощности за 30 мин — не более 2%, кратковременные флуктуации в полосе 20–10⁶ Гц не превышают 2%, общая мощность излучения $P = 10$ Вт, на $\lambda = 488,0$ нм — $P = 5$ Вт, поляризация линейная, ресурс 5 тыс. ч) [1020].

Стабилизированный лазер с мощностью одночастотной генерации 3 Вт и 0,6 Вт на длинах волн 514,5 и 457,9 нм описан в [1019]. Лазер предназначен для голографических целей, имеет длину когерентности около 10 м и может быть использован при голографировании протяженных объектов.

Лазеры фирмы Coherent помимо широкого выбора длин волн, от УФ до ИК, имеют устройства для селекции длин волн, выделения единственной продольной моды, стабилизации выходной мощности [1023]. Уровень кратковременной и долговременной нестабильности этих лазеров не превышает 0,5%.

Лазеры фирмы Omnicrome, имеющие сравнительно небольшую выходную мощность, являются хорошими источниками излучения в видимой области для решения задач медицинской диагностики и терапии [1021]. Выходная мощность этих лазеров лежит в диапазоне от 10 мВт на отдельных (слабых) линиях до 500 мВт на всех линиях в многомодовом режиме, они имеют воздушное охлаждение и срок службы более 10 тыс. ч, линейную поляризацию излучения и низкий уровень флуктуаций интенсивности. Например, лазер серии 543 имеет максимальную выходную мощность на всех линиях, равную 500 мВт, а в одномодовом режиме на одной из основных линий с $\lambda = 488$ или 514 нм около 150 мВт. Лазер серии 543 AP, MAP излучает на 9 линиях в диапазоне 454–514 нм, а криптон-аргоновый лазер серии 643 излучает на 13 линиях в диапазоне 467–676 нм.

Ионные лазеры на парах химических элементов также являются прекрасными источниками непрерывного излучения в видимой и ближней УФ-областях спектра [978–982, 992, 993, 997, 1011, 1024, 1025]. Поскольку в качестве рабочего вещества могут быть использованы пары многих химических элементов (Cd, Zn, Se, Te и т. д.), то набор длин волн оказывается довольно широким. Уровень мощности излучения лазеров на парах химических элементов несколько больше, чем у He-Ne-лазеров, и вполне удовлетворяет многим задачам биомедицинской диагностики и терапии. Лазеры работают при наличии вспомогательного газа, в качестве которого применяются гелий. Наибольшее распространение получили He-Cd- и He-Se-лазеры катафорезного типа, в которых подачу паров и их равномерное распределение внутри активного элемента обеспечивает процесс катафореза. Типичная схема катафорезного лазера показана на рис. 4.8, а. Необходимое давление паров достигается, как правило, за счет внешнего подогрева резервуара с металлом, расположенного вблизи анода. Возбуждение лазера осуществляется продольным тлеющим разрядом постоянного тока с параметрами, близкими к He-Ne-лазеру. Принудительное охлаждение не требуется. Излучение He-Cd-лазера происходит на коротковолновой синей линии с $\lambda = 441,6$ нм и УФ-линии с $\lambda = 325,0$ нм. He-Cd-лазеры, использующие для накачки разряд в полом катоде, генерируют излучение в широком диапазоне длин волн, от УФ до ИК [1024]. Всего таких длин волн 12: 325,0; 441,6; 533,7; 537,8; 635,5; 636,0; 723,7; 728,4; 806,7; 853,1; 865,2; 887,8 нм (RGB LaserTM. Nihon Dempa Kogyo Co. Ltd.). Схема He-Cd-лазера с полым катодом показана на рис. 4.8 б. В условиях поперечного высокочастотного разряда в He-Cd-лазере одновременно возбуждаются пять видимых линий: синяя с $\lambda = 441,6$; две зеленых с $\lambda = 533,7$; 537,8 и две красных с $\lambda = 635,5$; 636,0 нм [1024].

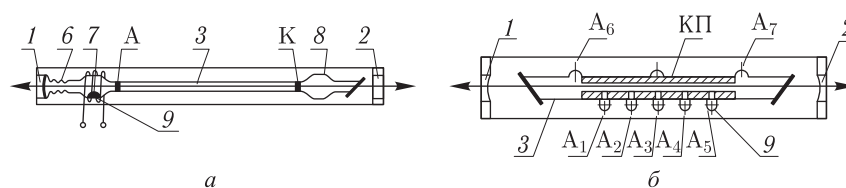


Рис. 4.8. Типичные схемы ионных лазеров на парах химических элементов: а — катафорезный, б — с полым катодом (1, 2 — зеркала, 3 — рабочий капилляр, б — соединительный шильфон; 7 — нагреваемый печкой резервуар с химическим элементом; 8 — холодильник для конденсации отработавшего химического элемента; 9 — кусочек химического элемента; А — анод; К — катод; А₁–А₅ — основные аноды; А₆, А₇ — вспомогательные аноды, КП — полый катод)

He-Se-лазер излучает более чем 20 линий, перекрывающих почти весь видимый диапазон, $\lambda = 460,4$ –653,5 нм. Излучение He-Zn-лазера происходит на десятке

линий в диапазоне 491,2–775,8 нм с максимальной мощностью на линиях с $\lambda = 747,9$ и 758,8 нм.

Промышленность у нас в стране и за рубежом выпускает разнообразные модификации He–Cd-лазеров. Они применяются в микрофлуориметрии, КР-спектроскопии, новых цитометрических системах, лазерных микроскопах, разнообразных терапевтических приложениях и пр. Мощность излучения промышленных лазеров (данные НПО «Плазма» и фирм: Omnicrome, LiCONiX, Nihon Dempa Kogyo (NDK) и др.) на $\lambda = 441,6$ нм составляет 8–200 мВт, на $\lambda = 325,0$ нм — 1–75 мВт, размер пучка равен 0,8–3,0 мм, расходимость — 0,4–1,0 мрад, кратковременные флуктуации выходной мощности в полосе частот 10–10⁶ Гц — обычно 6–10%, у лучших образцов — менее 1%, долговременные флуктуации — 5–10% за 8 ч, а у лучших образцов — 5% за 24 ч. Выпускаются лазеры двух типов: с внутренними зеркалами и с брестеровскими окнами у активных элементов. Первые из них характеризуются более высокой мощностью и круговой поляризацией излучения, вторые — дают линейно поляризованное излучение высокой степени поляризации, (100–500) : 1. Срок службы лазеров достигает 10 тыс. ч.

Различные модификации He–Cd-лазеров с полым катодом фирмы NDK дают высокостабильное по мощности излучение на синей линии ($\lambda = 441,6$ нм), зеленом и красном дублетах ($\lambda = 533,7$ и 537,8 нм; $\lambda = 635,5$ и 636 нм) с общей мощностью от 15 до 50 мВт. То есть такие лазеры излучают свет, близкий к белому и могут быть применены в специальных видах диагностики или терапии. В лазерах с полым катодом белое излучение с примерно равными интенсивностями излучения на $\lambda = 441,6$ нм, 533,7/537,8 нм и 615,0 нм (Hg) получают при использовании комбинированной активной среды He–Cd–Hg [1024].

Инфракрасные *молекулярные CO₂-лазеры* находят широкое применение в хирургии и косметологии, их излучение используется также в терапии и диагностике, в экологических исследованиях при анализе загрязнений окружающей среды и т. п. CO₂-лазер излучает на колебательно-вращательных линиях молекулярных полос в области длин волн 9,4 и 10,4 мкм [978–982, 993, 997, 1000, 1011]. Он может работать на многих линиях из этих полос (до 110) в области длин волн от 9,2 до 11,1 мкм [1026]. Перестройка линий генерации обычно осуществляется с помощью дифракционной решетки, используемой в качестве одного из зеркал лазера. Наибольшее усиление имеют линии P(18), P(20) и P(22), длины волн которых близки к $\lambda = 10,6$ мкм, поэтому лазер без дисперсионного элемента работает на этой длине волны. Для возбуждения лазера непрерывного действия используется продольный тлеющий разряд постоянного тока в многокомпонентной смеси (обычно CO₂–N₂–He–Xe при общем давлении (15–20) · 133 Па). Выходная мощность промышленных лазеров малой и средней мощности составляет 5–100 Вт, диаметр пучка — 5–10 мм, расходимость — 1–5 мрад. CO₂-лазер отличается высоким КПД (10–20%).

Для активных элементов диаметром около 10 мм реализуется одномодовый режим с уровнем мощности почти до 70 Вт [1000]. Импульсные так называемые ТЕА CO₂-лазеры возбуждаются поперечным разрядом и работают при давлениях смесей CO₂:N₂:He, близких к атмосферному. Существуют и другие способы возбуждения активной среды CO₂-лазеров [993, 1000], среди которых следует выделить поперечный высокочастотный (ВЧ) разряд, при его использовании удается конструировать малогабаритные лазеры с высокими эксплуатационными характеристиками.

Перспективными для диагностики и терапии представляются малогабаритные *волноводные CO₂-лазеры*, имеющие узкий рабочий капилляр (волновод), повышенное давление смеси (от 1,3 кПа до атмосферного), что обеспечивает сравнительно

высокие уровни мощности с единицы длины, значительную перестройку частоты в пределах одной линии излучения (порядка 1,5 ГГц). Выходная мощность волноводных CO_2 -лазеров в непрерывном режиме может достигать 30 Вт, типичное значение мощности для компактного лазера 1–10 Вт, диаметр пучка — около 1 мм, однако расходимость оказывается значительной, порядка 10 мрад.

Поперечное высокочастотное возбуждение и высокое давление смеси газов позволяют реализовать весьма компактный спектрометр с квазиплавной перестройкой длины волны в диапазоне 9,1–11,0 мкм ($1096\text{--}908\text{ см}^{-1}$). Более плавную перестройку в этом диапазоне длин волн можно получить при работе на смеси изотопов молекулы CO_2 . При использовании полос секвенции и горячих полос в сочетании с различными изотопами CO_2 -генерация может быть получена на нескольких тысячах перекрывающихся линий в диапазоне 8,3–12,5 мкм [1027]. Типичные схемы CO_2 -лазеров показаны на рис. 4.9.

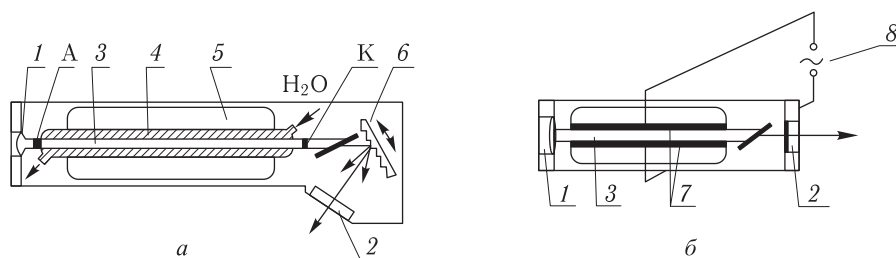


Рис. 4.9. Типичная схема молекулярных CO_2 -лазеров малой и средней мощности: *a* — лазер с перестройкой длин волн с помощью поворота отражательной дифракционной решетки; *б* — волноводный лазер с поперечной высокочастотной (ВЧ) накачкой (1, 2 — зеркала; 3 — рабочий капилляр; 4 — рубашка водяного охлаждения; 5 — резервуар с рабочей смесью газов; 6 — дифракционная решетка; 7 — охлаждаемые водой плоские металлические электроды; 8 — генератор ВЧ-колебаний)

Создан лазер атмосферного давления с объемом активной среды $0,5 \times 0,4 \times 25,0\text{ см}^3$, дающий максимальную энергию в импульсе 54 мДж, с частотой повторения $f = 100\text{ Гц}$ и длительностью импульсов $\tau_n = 70\text{ нс}$ [1028]. Металлокерамический волноводный CO_2 -лазер непрерывного действия с объемом активной среды $0,2 \times 0,2 \times 18,0\text{ см}^3$, ВЧ-возбуждением (125 МГц), максимальным КПД, равным 12%, и максимальной выходной мощностью, равной 5,5 Вт, описан в [1029]. Разработанный фирмой Сименс малогабаритный CO_2 -лазер типа LGK 8000 с поперечным ВЧ-возбуждением (125 МГц) и модуляцией выходного излучения прямоугольными импульсами с частотой следования 100 Гц — 2 кГц специально предназначен для лазерной хирургии [1030]. Во многих медицинских и косметических приложениях будет полезен щелевой волноводный CO_2 -лазер с ВЧ-возбуждением (100 МГц), работающий в импульсно-периодическом режиме со средней мощностью 160 Вт, КПД около 10%, и с малой расходимостью, порядка 2–3 мрад [1001].

Молекулярный CO -лазер работает в интервале длин волн 5–6,5 мкм [994]. Он обладает еще большим КПД (до 30–60%), чем CO_2 -лазер, сравнимыми с CO_2 -лазером уровнями мощности, также может перестраиваться в широком диапазоне длин волн, генерировать в непрерывном и импульсном режимах. Рабочая смесь газов содержит гелий, азот, ксенон и кислород. Возможно создание компактных инфракрасных спектрометров на основе перестраиваемых волноводных CO -лазеров с поперечным высокочастотным возбуждением.

СО-лазеры перспективны для хирургических и терапевтических целей, поскольку благодаря более короткой длине волны излучения, по сравнению с СО₂-лазерами (большая глубина проникновения в мягкие биоткани), они дают ряд положительных медицинских эффектов (уменьшение кровотечения, снижение порога испарения ткани). Кроме того, излучение СО-лазеров в меньшей степени ослабляется при прохождении через волоконные световоды.

Отечественная промышленность выпускает СО-лазеры типа ИЛГН-706 с выходной мощностью 10–15 Вт в многомодовом и 3–5 Вт в одномодовом режимах генерации, излучение происходит на многих линиях в диапазоне 5,1–6,2 мкм, диаметр лазерного пучка — 8 мм в многомодовом и 6 мм в одномодовом режимах, расходимость излучения — 3 мрад, излучение линейно поляризовано. На базе аналогичного активного элемента, как и у лазера ИЛГН-706, но с обоими внутренними зеркалами, создан лазер типа ИЛГН-711 с выходной мощностью 35–40 Вт, диапазоном длин волн 5–6 мкм, диаметром пучка 8 мм, расходимостью 5 мрад и произвольной поляризацией лазерного излучения.

В основу перестраиваемого одночастотного СО-лазера с дифракционной решеткой в качестве дисперсионного элемента (см. рис. 4.9, а) положен активный элемент лазера ИЛГН-706. Лазер имеет систему обратной связи для автоматической настройки частоты на центральную частоту выбранной линии генерации, малую нестабильность мощности (менее 1% за несколько часов), позволяет получать при перестройке до 90 линий в диапазоне от 1626 до 1910 см⁻¹ с мощностью излучения на отдельных линиях от 50 мВт до 3 Вт.

СО-лазеры с выходной мощностью порядка 100 Вт также изготавливаются на основе активного элемента ИЛГН-706. Для достижения такой мощности сконструирован лазер с тремя активными элементами, размещенными параллельно друг другу в едином «свернутом резонаторе» с длиной оптического пути 3,75 м. КПД лазера составляет 10–17%.

Отечественной промышленностью выпускается также малогабаритный СО-лазер типа ИЛГН-705-СО с выходной мощностью 2,5–3,0 Вт, областью генерации 5,2–6,1 мкм (1610–1831 см⁻¹), в которой наблюдается 20–30 линий; КПД лазера составляет 5–7%; нестабильность мощности не хуже 3% за час работы; срок службы лазера превышает 1 тыс. ч.

Существуют многие типы молекулярных лазеров, работающих в ИК-области спектра: N₂O-лазер ($\lambda = 10,5$ и $11,0$ мкм), H₂O-лазер ($\lambda = 28,78$ и 118 мкм), D₂O-лазер ($\lambda = 171$ мкм), SO₂-лазер ($\lambda = 141$ и 193 мкм), HCN-лазер ($\lambda = 311$ и 337 мкм) и DCN-лазер ($\lambda = 190$ – 204 мкм). По своим параметрам они близки к СО₂- и СО-лазерам и дают длинноволновое лазерное излучение, вплоть до миллиметрового диапазона [979, 997]. Разработаны сверхмалошумящие лазеры, использующие возбуждение ВЧ-разрядом (27,5 МГц), у которых шумы снижены на два порядка, а мощность в два-три раза выше, чем у лазеров с постоянным возбуждением [1002]. Такие лазеры с длиной резонатора, равной 2,5 м, имеют максимальную выходную мощность, равную 48 мВт для H₂O-среды (118,6 мкм) и 430 мВт для DCN-среды (189,95 мкм).

К газовым лазерам относятся также лазеры с оптической накачкой, работающие на парах высокомолекулярных соединений. Например, лазер на парах муравьиной кислоты (НСООН), накачиваемый излучением СО₂-лазера с $\lambda = 9,27$ мкм (25 Вт), излучает на частоте $\tilde{\nu} = 23,13$ см⁻¹ (длина волны около 0,5 мм) с мощностью, равной нескольким милливаттам. Для терапевтических целей могут представлять интерес

субмиллиметровые волноводные лазеры со следующими параметрами [1031]:

| λ , мкм | Линия накачки CO ₂ -лазера | Рабочее вещество | Выходная мощность, мВт |
|-----------------|--|---------------------|---------------------------|
| 118,8 | 9P (36) | CH ₃ OH | 60 |
| 447,2 | 10P (18) | CH ₃ I | 23 |
| 570,0 | 9P (16) | CH ₃ OH | 10 |
| 1250,0 | 10P (38) | CH ₃ I | 4 |

Применяются и другие химические соединения: CH₃Br ($\lambda = 545$ и 1582 мкм), CD₃Br ($\lambda = 351$ и 554 мкм), CD₃Cl ($\lambda = 791$ мкм), DCOOH ($\lambda = 362$ и 528 мкм). Субмиллиметровые лазеры с оптической накачкой перекрывают широкий диапазон длин волн, от 70 до 1990 мкм.

Близкие характеристики к CO₂- и CO-лазерам имеют *химические лазеры* (рис. 4.10). Генерация реализуется на колебательно-вращательных переходах двухатомных молекул галогеноводородных соединений [978, 995]. Химические лазеры могут работать в импульсном и непрерывном режимах генерации, допускают дискретную перестройку длины волны в пределах колебательно-вращательных полос генерации: HF-лазер имеет $\lambda = 2,5$ – $3,4$ мкм; HCl-лазер — $3,6$ – $4,1$ мкм; HBr-лазер — $4,0$ – $4,1$ мкм, DF-лазер — $3,5$ – $4,5$ мкм [995]. Отметим, что диапазон длин волн излучения HF-лазера приходится на максимум поглощения воды, поэтому его излучение эффективно для абляционного удаления биотканей.

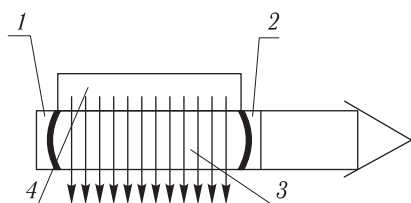


Рис. 4.10. Типичная схема химических лазеров: 1, 2 — зеркала; 3 — рабочая камера для смеси газов (стрелками показано направление прокачки смеси для проточных лазеров); 4 — инициатор химической реакции

Молекулярные лазеры, работающие на электронно-колебательных переходах, излучают в УФ-диапазоне длин волн. Наиболее интересными из них являются *лазер на молекулах азота*, основная длина волны излучения которого равна $337,1$ нм, и *водородный лазер* с излучением в вакуумном УФ (116 и 160 нм) [978–982, 997, 1032]. Азотные лазеры относятся к лазерам на самоограниченных переходах и могут работать только в импульсном режиме, правда, с довольно большой частотой повторения импульсов f , вплоть до 1 кГц, что для большинства медицинских применений эквивалентно непрерывной генерации. Рассматриваемые лазеры являются суперлюминесцентными, т. е. их излучение представляет собой усиленное спонтанное свечение, а зеркала служат лишь для снижения порога генерации и уменьшения расходимости излучения. Они имеют не очень высокие значения КПД — $0,01$ – $1,00\%$, среднюю мощность от нескольких милливатт до 1 Вт, длительность импульса 1 – 10 нс, мощность в импульсе 1 – 10^3 кВт. Субнаносекундный ТЕА азотный лазер с возбуждением бегущей волной при атмосферном давлении и мощностью в импульсе более 300 кВт описан в [1003]. Важно, что лазер может работать и на атмосферном воздухе, генерировать при этом импульсы мощностью до 100 кВт и длительностью $0,5$ нс.

Важный и чрезвычайно перспективный класс молекулярных лазеров на электронных переходах составляют *эксимерные лазеры* [980, 982, 983, 997]. Рабочим веществом являются так называемые эксимеры — молекулы-димеры, существующие

устойчиво только в возбужденном состоянии и мгновенно распадающиеся в основном состоянии, что и обеспечивает автоматически инверсию. Накачка лазеров осуществляется быстрым поперечным разрядом, так же как и у некоторых типов азотных лазеров.

Типичная схема эксимерного лазера с дисперсионным резонатором показана на рис. 4.11. Активной средой эксимерных лазеров служит смесь газов с достаточно большим суммарным давлением, вплоть до 1,5 атм. Например, активной средой KrF-лазера является смесь криптона, молекулярного фтора и аргона или гелия в качестве буферного газа. Эксимерные лазеры (табл. 4.4) имеют значительный КПД, порядка 1–15 %, ширину линии около 0,8 нм, типичную длительность импульсов, 4–20 нс, могут перестраиваться по длине волны в пределах 2–6 нм [982]. Для примера в табл. 4.4 приведены основные технические параметры эксимерных лазеров, выпускаемых Эстонской Академией наук. Лазер ELI-10 предназначен для медицинских применений (ангиопластика, литотрипсия, артроскопия и пр.). Пучок излучения эксимерных лазеров обычно представляет собой прямоугольник с размерами 10 × 25 мм, а расходимость разная по двум координатам и составляет 2 × 5 мрад. Кроме представленных в таблице типов эксимерных лазеров существуют KrCl- (222 нм), XeBr- (282 нм) лазеры, а также более длинноволновые, например XeO-лазер с $\lambda = 558$ нм, и, что очень важно в медицине, более коротковолновые: Ar₂-лазер ($\lambda = 126$ нм), Kr₂-лазер ($\lambda = 146$ нм) и Xe₂-лазер ($\lambda = 172$ нм) [980, 997]. Например, фирма Lambda Physik выпускает F₂-лазеры ($\lambda = 157$ нм) с энергией в импульсе $E_{\text{и}} = 60$ мДж с максимальной частотой повторения $f = 50$ Гц и $P_{\text{ср}} = 3$ Вт.

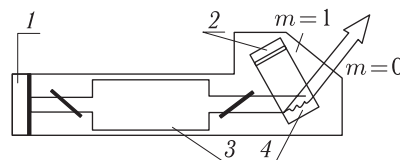


Рис. 4.11. Типичная схема эксимерных лазеров: 1, 2 — зеркала, 3 — рабочая камера для смеси газов; 4 — дифракционная решетка, скользящее падение

Таблица 4.4. Параметры эксимерных лазеров серии ELI, выпускаемых Эстонской Академией наук (Laser Market, 92/3)

| Активная среда | ArF | KrF | XeCl | XeF |
|----------------------|-----|-----|------|-----|
| λ , нм | 193 | 248 | 308 | 351 |
| $E_{\text{и}}$, мДж | | | | |
| ELI-95 | 120 | 250 | 200 | 100 |
| ELI-76 | 200 | 450 | 400 | 200 |
| ELI-10 | — | — | 150 | — |
| f , Гц | | | | |
| ELI-95 | 50 | 50 | 50 | 50 |
| ELI-76 | 150 | 150 | 150 | 150 |
| ELI-10 | — | — | 30 | — |
| $P_{\text{ср}}$, Вт | | | | |
| ELI-95 | 6 | 12 | 10 | 5 |
| ELI-76 | 25 | 55 | 50 | 20 |
| ELI-10 | — | — | 5 | — |

Компактный импульсно-периодический XeCl-лазер ($\lambda = 308$ нм) описан в [1033], главным его достоинством является малая угловая расходимость, которая по двум взаимно ортогональным направлениям составляет 10^{-4} – 10^{-5} рад. Энергия в импульсе

се $E_i = 1,1$ Дж, средняя мощность $P_{\text{ср}} = 60$ Вт, $f = 100$ Гц, $\tau_i = 60\text{--}80$ нс, КПД — около 1%, ресурс без смены смеси больше 10^5 импульсов. Мощные эксимерные лазеры имеют среднюю мощность излучения вплоть до 400 Вт при очень высокой частоте повторения импульсов, $f = 1$ кГц.

Итак, высокая частота повторения импульсов, значительный уровень средней мощности, возможность перестройки частоты и, самое главное, целый набор УФ-линий излучения позволяют считать эксимерные лазеры перспективными для исследований в биологии и медицине, а также для накачки лазеров на красителях.

4.3. Жидкостные лазеры

Жидкостные лазеры на красителях нашли самое широкое применение в различных областях науки и техники, главным из которых является сверхчувствительная лазерная спектроскопия, в том числе и биологических объектов. Такие лазеры обладают всеми достоинствами идеальных лазерных источников: перестройкой длины волны в широких пределах; высоким уровнем мощности или энергии излучения; возможностью работы в непрерывном и импульсном режимах, получения узкой линии генерации в непрерывном режиме и генерирования сверхкоротких импульсов в режиме синхронной накачки короткими импульсами [415, 978–982, 987, 997, 1034].

Активные среды лазеров на красителях представляют собой размещенные в специальных кюветах или прокачиваемые в струе на воздухе растворы органических красителей, инверсия в которых создается за счет внешней оптической накачки с помощью ламп или лазеров (рис. 4.12). Лазеры на красителях обладают значительным КПД преобразования. Плавная перестройка длины волны излучения для одного типа красителя осуществляется в пределах нескольких десятков нанометров с помощью дисперсионных элементов внутри резонатора, при этом ширина спектральной линии излучения не превышает нескольких мегагерц. Заменой красителей и источников накачки можно осуществить перестройку длины волны во всем спектральном диапазоне от УФ до ближнего ИК.

Наиболее простую конструкцию имеют импульсные лазеры на красителях с ламповой накачкой (см. рис. 4.12, а) [987, 1034]. Созданы десятки моделей промышленных образцов лазеров. Они перекрывают диапазон длин волн от 340 до 960 нм, при удвоении частоты — 217–380 нм, а при параметрическом преобразовании — 1,06–3,10 мкм. Энергия их излучения изменяется от 1 мДж до 50 Дж в периодическом режиме и достигает 400 Дж в режиме одиночных импульсов; средняя мощность — от 0,06 до 20 Вт; длительность импульса — от 0,007 до 8 мкс; частота повторения импульсов — от 1 кГц до одиночных импульсов; максимальный КПД лазеров — от 0,08 до 0,8%. Ширина линии излучения лежит в пределах $4 \cdot 10^{-1}\text{--}10^{-3}$ нм, а рекордные значения для систем с усилителями достигают $10^{-4}\text{--}10^{-5}$ нм. Расходимость излучения в зависимости от конструкций резонатора и кюветы с красителями изменяется в пределах от 0,3 до 100 мрад.

Эффективную накачку в импульсном режиме обеспечивают азотный, медный и эксимерные лазеры. Используется как поперечная, так и продольная накачка (вдоль оси резонатора) (см. рис. 4.12, б–г). Эффективность преобразования УФ-излучения азотного лазера в видимое излучение лазера на красителях составляет 10%, диапазон перестройки такого лазера — 350–1000 нм и 217–310 нм с удвоением частоты [1036], ширина линии генерации — порядка 0,01 нм, а с эталоном Фабри–Перо внутри резонатора — около 0,001 нм, частота повторения импульсов — 50–100 Гц, длительность импульса — 5–10 нс, мощность в импульсе — около 10^5 Вт, расходимость лазерного пучка — примерно 10 мрад.

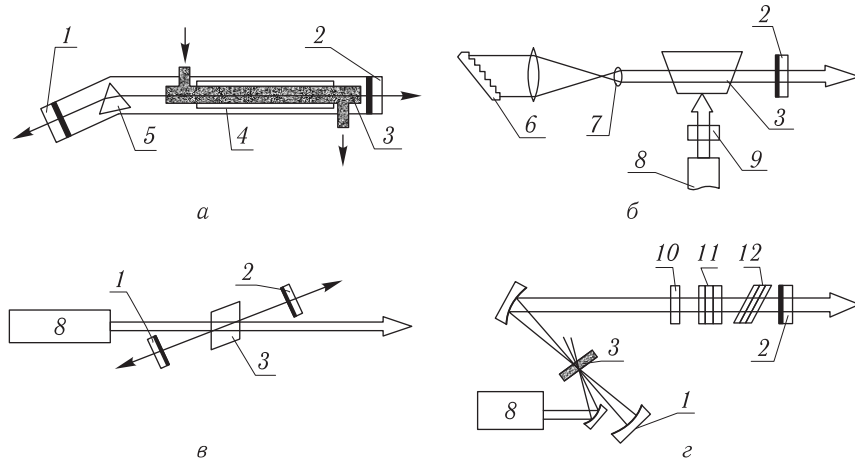


Рис. 4.12. Типичные схемы жидкостных лазеров на красителях: *а* — с ламповой накачкой, *б* — с поперечной лазерной накачкой, *в* — с продольной лазерной накачкой, *г* — с продольной лазерной накачкой и селекцией продольных мод (1, 2 — зеркала лазеров на красителях; 3 — кюветы с красителями или струя красителя на воздухе; 4 — коаксиальная лампа накачки; 5 — призма; 6 — дифракционная решетка в автоколлимационном режиме; 7 — расширитель пучка; 8 — лазер накачки; 9 — цилиндрическая линза; 10 — эталон; 11 — перестраиваемый интерферометр Фабри-Перо; 12 — фильтр Лيو (на основе двойного лучепреломления))

Для накачки эксимерными лазерами, излучающими много линий, характерными являются следующие параметры лазера: диапазон длин волн — 320–980 нм, средняя мощность — около 0,4 Вт, длительность импульса и ширина линии примерно такие же, как при накачке N_2 -лазером. Для промышленного лазера ЛЖИ-504 накачка медным лазером, излучающим в зеленой области спектра суммарную мощность 4 Вт, позволяет с помощью четырех красителей перекрыть диапазон длин волн 530–710 нм со средней мощностью около 600 мВт, длительность импульсов лазера — примерно 18 нс, частота их повторения — 10 кГц, ширина линии излучения — около 0,05 нм (с эталоном Фабри-Перо в резонаторе примерно 0,002), расходимость излучения — 3 мрад. Главным достоинством лазера является высокая частота повторения импульсов, обеспечивающая квазинепрерывный режим генерации. Фирма Oxford Lasers выпускает накачиваемый медным лазером лазер на красителях с высокой пиковой мощностью излучения, более чем 20 кВт, и частотой повторения импульсов вплоть до 12 кГц.

Импульсную генерацию красителей получают также при накачке излучением второй или третьей гармоник основной линии генерации АИГ:Nd-лазера с $\lambda = 1064$ нм, т. е. излучением с $\lambda = 532$ и 355 нм.

Лазеры на красителях являются уникальными перестраиваемыми источниками когерентного излучения и в непрерывном режиме. В этом случае в качестве лазеров накачки используются Ag- и Kг-лазеры. Для создания инверсии необходима жесткая фокусировка излучения накачки (до размера пучка 10–30 мкм), поскольку требуется высокая плотность мощности, порядка 1 МВт/см². Необходимое охлаждение облучаемого красителя происходит за счет быстрой его прокачки (струя в воздухе) (см. рис. 2.12, з).

Эффективность преобразования для родамина-6Ж ($\lambda = 600$ нм) при накачке аргонным лазером ($\lambda = 458$ –514 нм) — около 25%, примерно такую же эффективность преобразования имеет краситель оксазин-1 ($\lambda = 750$ нм) при накачке криптоно-

вым лазером ($\lambda = 647\text{--}676$ нм), остальные красители имеют меньшую эффективность, 3–15%. Выходная мощность непрерывных лазеров на красителях достигает 30–40 Вт [980]. Мощность лазеров накачки равна обычно 1–25 Вт, обеспечивается перестройка длин волн лазеров на красителях в диапазоне 400–1000 нм, для одночастотных лазеров тонкая перестройка частоты осуществляется в пределах 10–30 ГГц, ширина линии не превышает 10–100 МГц, а при наличии системы стабилизации оказывается даже менее 100 кГц. Диаметр пучка лазеров — около 0,5 мм, их расходимость равна 1,5–2,0 мрад.

Фирма Spectra Physics в течение многих лет выпускает высокостабильные непрерывные лазеры на красителях, работающие в широком спектральном диапазоне, от 450 до 950 нм. Мощность излучения для некоторых красителей составляет около 1 Вт, режим ТЕМ₀₀, диаметр пучка — 0,47–0,6 мм, расходимость — 1,24–1,58 мрад, поляризация линейная, ширина области генерации в пределах одного красителя — 20–60 ГГц, кратковременная и долговременная нестабильность мощности не хуже 0,5%. Фирма выпускает также перестраиваемый одночастотный лазер с мощностью излучения 15–100 мВт в зависимости от типа красителя, с нестабильностью частоты (± 5)–(± 25) МГц и сканированием частоты в пределах 3–15 ГГц.

Разрабатываются новые типы эффективных красителей, например полиметиновые (цианиновые), позволяющие работать в УФ-, видимой и, что очень важно для медицины, в ближней ИК-области спектра, вплоть до 1600 нм [1038]. С другой стороны, удобство работы с лазером на красителях зависит от возможности работы без смены красителя в широком диапазоне длин волн. Этому требованию отвечают красители с областью перестройки порядка 100 нм в диапазонах 500–600 нм и 640–740 нм [1039].

Наибольшую энергию, вплоть до 1800 Дж, можно получать от лазеров на неорганических жидкостях [1040]. Активная среда таких лазеров состоит из неорганической жидкости, например оксихлорида фосфора (POCl₃) или оксихлорида селена (SeOCl₂), которая является матрицей для внедрения в нее ионов Nd³⁺, возбуждаемых, как и в твердотельном лазере, светом лампы накачки. Линии генерации лазеров имеют длины волн 0,9; 1,06; 1,33 мкм. Наиболее интенсивная линия имеет длину волны 1,06 мкм. Лазеры обладают довольно значительным КПД, до 2,5–3,5% (больше, чем у лазеров на стекле), однако имеют значительную расходимость, $2\vartheta \approx 10^{-1}$ рад. Для типичного лазера на POCl₃–ZrCl₄–Nd³⁺, имеющего длину кюветы 16,5 см, диаметр 1,4 см, скорость прокачки активной среды 25 л/мин, в моноимпульсном режиме получено: $\tau_i = 20$ нс, $E_i = 220$ МВт, $P_{cp} = 45$ Вт [1040]. Лазер способен работать при $f \leq 10$ Гц. При $f = 10$ Гц энергия в импульсе падает в 3 раза.

4.4. Твердотельные лазеры

Рубиновый лазер является первым в мире лазером, с него началась история лазеров и их применений (1960 г.). Лазер представляет собой рубиновый стержень, накачиваемый обычно светом спиральной или линейной ксеноновой лампы. Типичная схема твердотельного лазера с ламповой накачкой показана на рис. 4.13, а. При комнатной температуре лазер излучает красную линию на $\lambda = 694,3$ нм. Изменением температуры рубинового стержня в пределах 77–500 К длина волны перестраивается в пределах 50 см⁻¹. По сравнению с другими твердотельными лазерами он имеет низкий КПД, около 0,1%. Длительности импульсов в режиме свободной генерации составляют 1–3 мс, энергия в импульсе в ТЕМ₀₀-моду — около 1 Дж, частота их повторения меньше или равна 1 Гц, расходимость излучения — порядка 1 мрад,

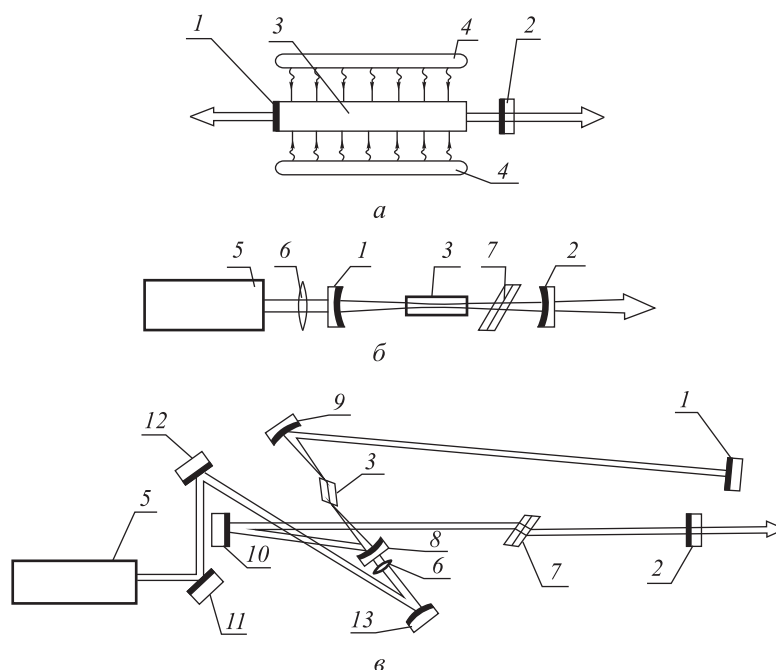


Рис. 4.13. Типичные схемы твердотельных лазеров: *a* — с ламповой накачкой; *б* — с продольной лазерной накачкой и перестройкой длины волны; *в* — титан-сапфировый лазер фирмы Coherent (1, 2, 8–10 — зеркала лазера; 3 — активный элемент; 4 — лампа накачки; 5 — лазер накачки; 6 — согласующая линза; 7 — фильтр Лио; 11–13 — зеркала накачки)

диаметр пучка — 2–10 мм. Он может работать и в непрерывном режиме, но промышленность выпускает только импульсные системы [982].

Лазеры на стекле с неодимом работают на силикатном и фосфатном стеклах. Рабочим веществом являются ионы неодима Nd^{3+} . Длина волны излучения лазеров на силикатном стекле равна 1,061 мкм, а на фосфатном — 1,054 мкм. Лазеры работают в импульсном режиме и характеризуются высокими уровнями энергии в импульсе (до 10^3 Дж), широкими линиями флуоресценции, 26 и 19 нм, малой частотой повторения импульсов, 1–2 Гц. В режиме свободной генерации диаметры пучков излучения составляют 5–10 мм, расходимость — 5–10 мрад [982, 997].

Из всех твердотельных лазеров лазеры на алюмоиттриевом гранате с неодимом (АИГ:Nd) [978–980, 982, 996, 997] находят наиболее широкое применение. Они работают как в импульсном, так и непрерывном режимах. В качестве накачки используются обычно криптоновые или ксеноновые дуговые лампы. По уровню выходной мощности в непрерывном режиме гранатовые лазеры уступают лишь CO_2 -лазерам. Коэффициент полезного действия гранатовых лазеров достаточно высок и составляет 2–2,5%. Наиболее легко возбуждается линия с $\lambda = 1,064$ мкм, генерация происходит также на линиях с $\lambda = 0,946$; 1,319 и 1,833 мкм. Создано уже несколько сотен промышленных образцов лазеров на гранате. Их можно разделить на три категории: импульсные с непрерывной накачкой, непрерывные, импульсные с импульсной накачкой. Средняя мощность излучения импульсных лазеров с непрерывной накачкой ($\lambda = 1,064$ мкм) в многомодовом режиме составляет 20–40 Вт, в TEM_{00} — 3–16 Вт, расходимость — 1,2–2,0 мрад. Выпускаются лазеры с $\lambda = 1,319$ мкм, а также с преобразованием частоты во вторую и четвертую гармони-

ки с длинами волн: 532, 266, 659 нм. Средняя мощность излучения на $\lambda = 1,319$ мкм и 532 нм — 2–4 Вт, на $\lambda = 266$ нм — 0,5 Вт. В этих лазерах предусмотрена периодическая модуляция добротности резонатора с частотой 5–50 кГц. Непрерывные лазеры могут работать и при очень больших уровнях мощности: 65–250 Вт на $\lambda = 1,064$ мкм и 30 Вт на $\lambda = 1,319$ мкм, расходимость пучка излучения — 10–12 мрад. Например, в медицинской практике типичным является управляемый от компьютера лазер с мощностью до 100 Вт на $\lambda = 1,06$ мкм и 18 Вт на $\lambda = 532$ нм.

Разработаны простые управляемые многоволновые системы непрерывного действия, которые позволяют работать поочередно на двух линиях с $\lambda_1 = 1,064$ и $\lambda_2 = 1,318$ или 1,064 и 1,061 мкм, или на четырех линиях 1,318; 1,335; 1,338; 1,356 мкм [1041]. Подобные системы могут быть использованы в диагностических целях при зондировании глубоколежащих опухолей.

Импульсные гранатовые лазеры с импульсной накачкой характеризуются большой, по сравнению с рубиновыми и стеклянными лазерами, частотой повторения импульсов, 25–300 Гц. Длительность импульсов изменяется в пределах 8–100 нс, энергия в импульсе без дополнительных усилителей составляет 0,05–0,50 Дж, мощность в импульсе — $5\text{--}5 \cdot 10^3$ кВт, $P_{\text{ср}} \approx 5\text{--}75$ Вт, расходимость пучка — 4–8 мрад.

Основой для создания широкого спектра медицинских лазеров с заданными характеристиками могут служить кристаллы хромсодержащих скандиевых гранатов [1042]. Ионы хрома эффективно поглощают излучение на $\lambda = 1,06$ мкм, тем самым, в зависимости от их концентрации в кристалле, могут приводить либо к автомодуляции добротности лазеров, работающих на ионах неодима, либо к полному подавлению основной линии генерации неодима. В первом случае для *иттрий-скандий-галлий-гранатового* (ИСГГ:Cr-Nd) лазера ($\lambda = 1,06$ мкм) с размерами активного элемента $\varnothing 5,6 \cdot 100$ мм удалось получить режим автомодуляции добротности с параметрами: $\tau_{\text{и}} \approx 85$ нс (полная длительность генерации — 0,5 мс), $E_{\text{и}} \approx 85$ мДж, $P_{\text{и}} \approx 10^6$ Вт, $f = 10\text{--}100$ кГц (зависит от превышения накачки над порогом генерации), КПД $\approx 2,4\%$, $P_{\text{ср}} \approx 30$ Вт (импульсно-периодический режим с частотой повторения длинных импульсов 7 Гц). Во втором случае селективное подавление генерации на основной линии ионов неодима с $\lambda = 1,06$ мкм позволило существенно повысить эффективность генерации более слабого конкурирующего перехода с $\lambda = 1,32$ мкм, КПД $\approx 1,3\%$, $E_{\text{и}} \approx 140$ мДж.

Выпускаются лазеры с $\lambda = 1,064$ мкм и другими длинами волн, а также с преобразованием частоты во вторую и третью гармоники. Например, в лазерной фототерапии ряда кожных заболеваний представляет интерес лазерное излучение УФА-диапазона [297]. По средней мощности и длине волны излучения подходящим оказывается излучение третьей гармоники АИГ:Nd-лазера с $\lambda = 355$ нм. Типичные параметры такого лазера: $P_{\text{ср}} \geq 0,5$ Вт (≥ 10 мДж \times 50 Гц), $\tau_{\text{и}} = 5\text{--}15$ нс, диаметр пучка 6,3 мм (многомодовый режим), расходимость пучка — не более 5 мрад.

Перспективным для биомедицины является АИГ:Er-лазер (эрбиевый) [7, 62, 148, 205]. По своим параметрам он практически не уступает гранатовому лазеру, а длина волны его излучения ($\lambda = 2,94$ мкм) лежит в полосе нормальных колебаний молекулы воды ($\lambda = 2,91$ мкм), что и определяет его перспективность для применений в биологии и медицине, в частности хирургии. Близкие характеристики и возможности имеет ИСГГ:Er-лазер с длиной волны 2,79 мкм (ИСГГ — иттрий-скандий-галлиевый гранат) [1042]. При частоте повторения импульсов $f = 25$ Гц средняя мощность в режиме свободной генерации ИСГГ:Cr-Er-лазера ($\lambda = 2,79$ мкм) с размерами кристалла $\varnothing 4 \times 75$ мм достигает 2,8 Вт, $E_{\text{и}} \approx 2,4$ Дж ($\tau_{\text{и}} \approx 150$ мкс), КПД $\approx 1\%$, а в режиме модуляции добротности — $\tau_{\text{и}} \approx 70\text{--}100$ нс, $E_{\text{и}} \approx 80\text{--}120$ мДж, КПД $\approx 0,16\%$ [1042].

Оптимальным для многих задач лазерной медицины (сваривание или абляция тканей внутренних органов) является излучение *гольмиевого лазера*, работающего,

в зависимости от типа рабочего кристалла, в диапазоне длин волн 2,09–2,15 мкм [1086]. Например, ИСГГ:Cr–Tu–Ho-лазер работает на переходах ионов гольмия с $\lambda = 2,088$ мкм [1042]. В режиме свободной генерации энергия излучения лазера с размерами кристалла $\varnothing 4 \times 76$ мм достигает 8 Дж при КПД более 2%, а в режиме модуляции добротности в TEM₀₀ моде для кристалла с размерами $\varnothing 3 \times 54$ мм удается получить энергию гигантского импульса — 50 мДж ($\tau_n = 50$ нс, $f = 1$ Гц).

Миниатюрные лазеры на основе эрбиевого стекла (хром-иттербий-эрбиевое стекло, ЛГС-Х), работающие на $\lambda = 1,54$ мкм, также перспективны для практической медицины [1043]. Они имеют довольно высокий КПД (до 1,7%). Активные элементы представляют собой стержни диаметром 2–3 мм и длиной 35–50 мм. В импульсно-периодическом режиме получена средняя мощность, равная 0,7 Вт ($f \approx 7$ Гц). Импульсный лазер на кристалле YSGG:Cr³⁺, Yb³⁺, Ho³⁺ позволяет получать непрерывную перестройку в диапазоне 2,84–3,05 мкм при импульсной (200 мкс) накачке в полосу с длиной волны 925 нм излучением лампы или титан-сапфирового лазера [1071].

Во многих разделах лазерной биологии и медицины, включая диагностику, фотобиохимию и управляемую фотодеструкцию, оказываются полезными твердотельные лазеры на основе кристаллов с ионами металлов, имеющие широкие линии люминесценции [415, 988, 1044–1048]. Данные по некоторым типам этих лазеров сведены в табл. 4.5. В ИК-области спектра твердотельные лазеры оказываются более удобными и стабильными источниками, чем лазеры на красителях: отсутствует необходимость смены красителя, более простая прямая лазерная накачка, высокая стабильность частоты (благодаря отсутствию движения жидкости), долговечность более 5 тыс. ч и пр. Они имеют значительные полосы перестройки и высокий КПД преобразования (25–40%) излучения накачки в выходное излучение. Кроме указанных в табл. 4.5 кристаллов, используются также: $\text{Ve}_3\text{Al}_2\text{Si}_6\text{O}_{18}:\text{Cr}^{3+}$ (730–840 нм), $\text{SrAlF}_5:\text{Cr}^{3+}$ (850–950 нм), $\text{ZnWO}_4:\text{Cr}^{3+}$ (980–1090 нм), $\text{MgF}_2:\text{Ni}^{2+}$ (1630–1750 нм), $\text{MgF}_2:\text{Co}^{2+}$ (1500–2300 нм), $\text{MgF}_2:\text{V}^{2+}$ (1070–1120 нм), $\text{CsCaF}_3:\text{V}^{2+}$ (1240–1330 нм) и многие другие кристаллы [989, 1045–1048].

Для возбуждения активной среды применяется либо ламповая накачка, либо продольная когерентная (лазерная) накачка (см. рис. 4.13). Лазеры могут работать как в импульсном, так и в непрерывном режимах. Лазерная накачка в импульсном режиме осуществляется обычно второй гармоникой АИГ:Nd-лазера ($\lambda \approx 532$ нм), а в непрерывном — излучением Аг- или Кг-лазеров.

Титан-сапфировый ($\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Ti}^{3+}$) лазер при возбуждении всеми линиями непрерывного Аг-лазера с мощностью 8–10 Вт имеет область перестройки порядка 730–980 нм, среднюю по диапазону выходную мощность до 400–500 мВт, может работать в непрерывном и импульсном режимах. При пассивной синхронизации мод по методу керровской линзы (KLM) длительность импульса $\tau_n = 30$ –100 фс. Отметим, что перестройка частоты генерации может быть осуществлена любым из способов, реализованных для лазеров на красителях (см. рис. 4.12). Наиболее простым способом лазерной накачки является продольная накачка в сферическом селективном резонаторе, с линзой, в качестве согласующего элемента полей накачки и генерации, и фильтром Лио (одно- или двухсекционным) — для селекции и перестройки длины волны [1047] (см. рис. 4.13, б).

Описанная в [1046] импульсная лазерная система на $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Ti}^{3+}$ при возбуждении второй гармоникой АИГ:Nd-лазера имеет КПД преобразования 42%. В селективном резонаторе осуществляется перестройка длины волны в пределах 675–945 нм при КПД 25% ($\lambda = 780$ нм), ширина полосы генерации — около 0,2 нм, расходимость $2\vartheta \approx 1,2$ мрад. В импульсно-периодическом режиме $E_n = 40$ мДж ($P_{cp} = 1,5$ Вт).

Таблица 4.5. Перестраиваемые твердотельные лазеры на ионах металлов [988, 989, 1044–1048]

| Ионы активатора | Тип кристалла | Максимальный диапазон длин волн, нм | Источник накачки | Режим работы | Максимальная выходная мощность или энергия, КПД преобразования, частота повторений |
|--------------------|---|-------------------------------------|--------------------------------|--------------------|--|
| Cr ³⁺ | BeAl ₂ O ₄ (александрит) | 701–818 | Лампа | Импульсный | $E_n = 0,4$ Дж, $P_{cp} = 100$ Вт, $f = 10$ Гц |
| | | 746–794 | Лампа | Непрерывный | $P = 5–60$ Вт |
| | BeAl ₆ O ₁₀ | 790–920 | 2-я гармоника АИГ:Nd-лазера | Импульсный | $f = 6$ кГц, $\tau_n = 150–200$ нс |
| | LiCaAlF ₆ | 735–840 | Лампа | Импульсный | $E_n = 80$ мДж, КПД $\approx 0,13\%$ |
| | GdSc ₂ Ga ₃ O ₁₂ | 750–840 | Ионный лазер | Непрерывный | $P = 0,2$ Вт |
| | KZnF ₃ (перовскит) | 780–850 | Ионный лазер | Непрерывный | $P = 0,05$ Вт (одна мода) |
| | | 775–870 | Рубиновый лазер | Импульсный | КПД $\leq 42\%$ |
| | | 785–875 | Лампа | Импульсный | $E_n = 1,15$ Дж, $f = 0,5$ Гц |
| SrAlF ₅ | 840–970 | Рубиновый лазер | Импульсный | КПД $\approx 20\%$ | |
| Ti ³⁺ | Al ₂ O ₃ (сапфир) | 662–1178 | Аргонный лазер | Непрерывный | $P = 1,6$ Вт |
| | | 675–945 | 2-я гармоника АИГ:Nd-лазера | Импульсный | $E_n = 0,04$ Дж, $P_{cp} = 1,5$ Вт |
| | | 698–880 | Лампа | Импульсный | $E_n = 0,30 - -0,75$ Дж, $\tau_n = 0,4$ мс |
| | BeAl ₂ O ₃ | 730–950 | 2-я гармоника АИГ:Nd-лазера | Импульсный | $P_{cp} = 0,04$ Вт, $f = 3–15$ кГц |
| Cr ⁴⁺ | Y ₃ Al ₅ O ₁₂ (АИГ) | 1350–1600 | АИГ:Nd-лазер | Импульсный | $E_n \leq 25$ мДж, КПД = 20–25%, $f = 12,5$ Гц, $\tau_n \approx 0,1$ мс |
| Co ²⁺ | KZnF ₃ | 1700–2100 | Лазер | Непрерывный | $P = 0,04$ Вт (одна мода) |

Генерация второй гармоники в кристалле LiIO_3 (эффективность 22 %) позволила перекрыть диапазон 340–470 нм.

Для многих биомедицинских задач представляет интерес квазинепрерывный титан-сапфировый лазер с ламповой накачкой [1044]. При длительности импульса до 0,4 мс его энергия в режиме свободной генерации E_0 достигала 1,5 Дж при КПД преобразования 0,04 %. Максимальный диапазон перестройки, полученный с помощью двухсекционного фильтра Лио, составил 698–880 нм. В этом случае ширина линии генерации не превышала 1 нм, а энергия генерации $E_i \approx (0,2-0,5) \cdot E_0$.

Многие фирмы выпускают разнообразные модификации александритовых и титан-сапфировых лазеров: непрерывного мощного перестраиваемого александритового лазера для медицины (фирма Light Age); непрерывного стабильного $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Ti}$ -лазера линейной конфигурации (фирма Lexel Laser); недорогого $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Ti}$ -лазера, перестраиваемого в диапазоне $\lambda = 700-1100$ нм и накачиваемого стандартным промышленным АИГ:Nd-лазером с удвоением частоты (фирма Solidlite); $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Ti}$ -лазера со сверхкороткой длительностью импульсов (синхронизация мод), высокой выходной мощностью во всем диапазоне перестройки (720–840 нм), осуществляемой с помощью одного ионного лазера (фирма Spectra-Physics Lasers).

Фирма Coherent выпускает титан-сапфировый лазер Model 890, перестраиваемый в диапазоне $\lambda = 690-1100$ нм, мощностью не менее 3,5 Вт (максимальная мощность около 7 Вт), при накачке непрерывным аргоновым лазером мощностью 20 Вт, в диапазоне 700–1020 нм мощностью не менее 1,1 Вт (максимальная мощность более 2 Вт), при накачке аргоновым лазером мощностью 8 Вт. Конфигурация оптической схемы лазера показана на рис. 4.13, в. Она отличается удобством и высокой точностью настройки пучка лазера накачки. Полный диапазон перестройки, обеспечиваемый тремя комплектами зеркал лазера, осуществляется в поддиапазонах длин волн 680–810, 790–940 и 930–1100 нм. Лазер работает в режиме TEM_{00} , его излучение линейно поляризовано, кратковременные флуктуации интенсивности в диапазоне частот 10 Гц — 1 МГц не превышают 2 %.

Фирма Coherent Laser Group выпускает непрерывный перестраиваемый кольцевой лазер на основе $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Ti}$ и красителей, непрерывно перестраиваемый в диапазоне от 370 нм до 1000 нм. Лазер имеет рекордные значения выходной мощности в широкой полосе, в одночастотном режиме и в режиме удвоения частоты. Возможна взаимная накачка лазеров: $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Ti}$ — краситель, и наоборот. Конверсия осуществляется путем замены усиливающей среды, двух держателей зеркал и настройки лазера.

Получена эффективная (на уровне 25 %-го преобразования) генерация форстерита (Mg_2SiO_4) с хромом при накачке в полосу $\lambda = 740,7$ нм, при этом спектр длин волн излучения лежал в ближнем ИК-диапазоне: 1170–1350 нм [1072].

Рабочим веществом *твердотельных лазеров на красителях* являются красители (родамин-6ж, -С, -101; ДСМ; ПФ-103; оксазин-1, -17 и др.), внедренные в твердую матрицу полиметилметакрилата [986]. Активный элемент представляет собой вращающиеся диски диаметром 50–70 и толщиной 8–10 мм. Накачка осуществляется второй гармоникой АИГ:Nd-лазера по квазипродольной схеме под углом 6–8°. Спектральная область перестройки равна 550–750 нм, с удвоением частоты — 275–350 нм, ширина линии генерации без эталона Фабри–Перо — 1 нм, с эталоном — 0,1 нм, длительность импульса — 10–20 нс, $f \leq 100$ Гц, угловая расходимость — 3–4 мрад, КПД преобразования на $\lambda = 580$ нм — примерно 30 %. ИК-красители (2681 и 3493) в полимерной матрице (перхлорвиниловая смола) дают достаточно эффективную (3 %) генерацию в диапазоне 1100–1500 нм при поперечной накачке пикосекундным АИГ:Nd-лазером [1037].

Лазеры на центрах окраски по своим параметрам генерации близки к лазерам на красителях [978–981, 988, 989, 1045, 1049]. Очень важно, что они могут излучать

не только в видимой, но и в ближней ИК-области длин волн, вплоть до 4 мкм, где нет подходящих красителей. Рабочей средой лазеров на центрах окраски являются ионные кристаллы, в которых различными способами (фотохимическим, аддитивным или электронно-лучевым окрашиванием) создаются те или иные комплексы точечных дефектов, обладающие собственной частотой поглощения, так называемые F-центры, или собственные центры окраски. В качестве ионных кристаллов обычно используют щелочно-галогидные кристаллы (ЩГК). Наиболее стабильными являются F_2^- , F_2^+ , F_2^- , F_A^- и F_B^- -центры окраски. Лазеры на ЩГК перекрывают диапазон 500–3500 нм. Типы рабочих кристаллов, активных центров и области перестройки даны в табл. 4.6.

Таблица 4.6. Диапазоны длин волн перестраиваемых лазеров на центрах окраски в щелочно-галогидных кристаллах [980, 988, 989, 1045]

| Тип кристалла | Тип центра | Диапазон длин волн, нм |
|--|----------------|------------------------|
| LiF | F_2^+ | 510–570 |
| LiF | F_2 | 620–730 |
| LiF | $(F_2^+)^{**}$ | 750–1100 |
| LiF | $(F_2^+)^*$ | 830–1100 |
| NaF | F_2^+ | 880–1000 |
| NaF:Li | $(F_2^+)_A$ | 920–1150 |
| NaF | $(F_2^+)^*$ | 990–1220 |
| NaF | $(F_2^+)^{**}$ | 1080–1380 |
| LiF | F_2^- | 1080–1250 |
| NaF:OH | F_2^- | 1100–1340 |
| KF | F_2^1 | 1260–1480 |
| KCl:Tl | $Tl^0(1)$ | 1400–1600 |
| NaCl:OH | $(F_2^+)_A$ | 1360–1770 |
| KCl | F_2^+ | 1600–1780 |
| KCl:OH | $(F_2^+)_A$ | 1600–1900 |
| KCl:Na | $(F_2^+)_A$ | 1620–1910 |
| KBr:OH | $(F_2^+)_A$ | 1700–2000 |
| KCl:Na ⁺ :O ₂ ⁻ | F_2^+ | 1700–2200 |
| KCl:Li | $(F_2^+)_A$ | 2000–2500 |
| KCl:Na | $F_B(II)$ | 2250–2650 |
| RbCl:Na | $F_B(II)$ | 2500–2900 |
| KCl:Li | $F_A(II)$ | 2100–3200 |
| KJ:Na | $(F_2^+)_A$ | 2380–2990 |
| RbCl:Li | $F_A(II)$ | 2500–3300 |

Лазеры на центрах окраски работают как в импульсном, так и непрерывном режимах. Некоторые из них эффективны лишь при низких температурах (77 К), другие имеют хорошие выходные характеристики при комнатной температуре. Обычно применяется лазерная накачка по аналогичным с лазерами на красителях схемам, при этом порог генерации оказывается существенно более низким, чем у лазеров на красителях. Для непрерывных лазеров пороговая мощность накачки составляет всего 13–50 мВт. В качестве источников накачки используются Ag-, Kг-, АИГ:Nd-лазеры. Эффективность лазеров на центрах окраски меняется в довольно широких пределах

и в зависимости от вида кристалла и рабочего центра может быть весьма большой, 2–60%. Выходная мощность излучения также меняется в довольно широких пределах: 0,06–1 Вт, в импульсном режиме энергия одного импульса составляет 1–120 мДж. Лазеры на F-центрах имеют высокую степень однородности линии усиления и поэтому при слабой селективности резонатора могут работать в одночастотном режиме, к тому же ширина линии излучения даже в нестабилизированном лазере оказывается малой, около 260 кГц.

Приведем данные отечественного лазера МАЛСАН-201, первого в мире промышленного лазера на ЩГК, работающего при комнатной температуре кристалла [988, 989]. Он интересен также тем, что полностью автоматизирован. В лазере обеспечена синхронная генерация в двух спектральных диапазонах (840–1100 нм и 1090–1250 нм) с одним источником накачки (гранатовый или стеклянный лазеры), а также нелинейное преобразование во вторую гармонику, дающее еще два диапазона (420–550 нм и 545–620 нм). Для рабочего кристалла LiF (F_2^+ , F_2^-) эффективность преобразования равна 8–15% (при мощности накачки 5–20 МВт на $\lambda = 532$ нм) и 15–20% (при мощности накачки 25–100 МВт на основной гармонике 1064 нм), длительность импульса накачки — 5–30 нс, частота повторения — 12,5 Гц, ширина линии излучения — 1–3 см^{-1} (с дифракционной решеткой и эталоном — 0,1–0,3 см^{-1}), расходимость излучения — 3 мрад при расходимости пучка накачки около 1 мрад.

При замене кристалла LiF на NaF:OH для F_2^- -центров была получена генерация в диапазоне 1100–1340 нм с коэффициентом преобразования 10% и $\Delta\nu \approx 1 \text{ см}^{-1}$, а при замене на кристалл LiF:Mg для $(F_2^+)^*$ -центров была получена генерация в диапазоне 780–1100 нм с максимальным коэффициентом преобразования 15%. Такая замена кристаллов предусмотрена в лазере МАЛСАН-203, в котором для расширения диапазона перестройки используется нелинейное преобразование частоты (вплоть до 4-й гармоники) и ВКР-преобразование излучения [989]. В результате спектр длин волн лазера простирается от 273 до 1600 нм.

Хорошим источником для низкокогерентной томографии является сверхширокополосный LiF: F_2^- -лазер с внутррезонаторным преобразованием частоты, который работает в ближней ИК-области (около 1175 нм с полосой 140 нм) и в видимой области (около 585 нм с полосой 70 нм) [1049].

Расширение диапазона длин волн лазеров на центрах окраски в видимую и УФ-области дает использование оксидных кристаллов [989, 1050]. Получена генерация на кристаллах CaO (357–420 нм), Al_2O_3 (540–620 нм и 750–1150 нм), $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Mg}$ (500–590 нм).

4.5. Полупроводниковые лазеры

Большинство лазеров и лазерных систем, излучающих в видимом и ближнем ИК-диапазонах, имеют или малую полную эффективность (КПД), порядка 0,05–4%, или значительные размеры и довольно сложное устройство. Все это препятствует созданию на их основе компактных средств диагностики и спектроскопии биологических сред, а также терапии и хирургии. В значительной мере конкуренцию им могут составить инжекционные полупроводниковые лазеры, которые перекрывают диапазон от 575 нм до 49,1 мкм, имеют высокую эффективность (до 66%), чрезвычайно компактны и просты конструктивно [293, 416, 978–982, 988, 990, 991, 997, 1051–1057, 1085, 1089–1092, 1099–1103].

Полупроводниковый инжекционный лазер представляет собой полупроводниковый диод с p - n -переходом, в области которого при пропускании тока в пря-

мом направлении создается инверсия населенности (рис. 4.14). Активная область (p - n -переход) занимает слой толщиной порядка 1 мкм. В качестве рабочего вещества в ближней ИК-области используется арсенид галлия, GaAs ($\lambda = 830$ нм), на основе которого делают так называемые гомолазеры, имеющие сравнительно высокую пороговую плотность тока инжекции при комнатной температуре. На два порядка меньшую пороговую плотность тока при комнатной температуре имеют лазеры на гетероструктурах. Наиболее часто применяются двойные гетероструктуры, когда в диоде создаются два перехода между различными материалами с толщиной активного слоя 0,1–0,3 мкм.

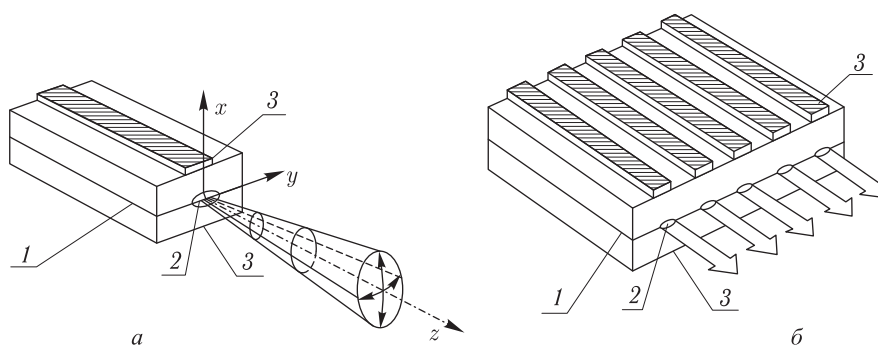


Рис. 4.14. Схемы полупроводниковых лазеров: а — инжекционный лазер, б — линейка лазеров (1 — плоскость p - n -перехода; 2 — излучающая область p - n -перехода; 3 — электроды)

Для расширения спектрального диапазона и снижения пороговой накачки используют разнообразные тройные и четверные соединения. Например, $\text{GaP}_x\text{As}_{1-x}$ -лазеры перекрывают диапазон от 830 ($x = 0$) до 640 ($x = 0,4$) нм. Наименьшая длина волны ($\lambda = 575$ –600 нм) получена для соединений GaInP, AlGaAs, AlGaInP, GaInAsP. На основе сплава $\text{Ga}_x\text{In}_{1-x}\text{As}_y\text{P}_{1-x}$ при $y = 2,2x$ для разных значений x получают лазеры с длинами волн от 920 до 1500 нм. Для ИК-спектроскопии важным классом полупроводниковых лазеров являются лазеры на основе соединений свинца: PbS_{1-x} , $\text{Sn}_x\text{Pb}_{1-x}\text{Te}$, $\text{Sn}_x\text{Pb}_{1-x}\text{Se}$ и аналогичных (PbCdS и др.), для которых получена генерация в диапазоне 2,5–49,1 мкм. При заданной концентрации компонентов (значение параметра x) перестройка длины волны осуществляется изменением температуры кристалла, тока через диод (тепловой эффект), приложением внешнего магнитного поля и внешнего давления. Главным недостатком лазеров на соединениях свинца является необходимость их достаточно глубокого охлаждения (20–40 К) при работе в непрерывном режиме, поэтому в промышленных ИК-спектрометрах наряду с непрерывными используются импульсные диоды, для охлаждения которых можно применять простую технику — термоэлектрические микрохолодильники.

Из неохлаждаемых наиболее длинноволновыми полупроводниковыми лазерами являются лазеры на двойных гетероструктурах с GaInAsSb-активным слоем, излучающие в интервале длин волн 2,3–2,4 мкм [1058]. А самыми коротковолновыми являются лазеры на структурах индий-галиевого нитрида ($\text{In}_x\text{Ga}_{1-x}\text{N}$) с квантовой ямой, которые эффективно излучают в ультрафиолете и сине-зеленой области длин волн (см. [35]). Длина волны излучения зависит от величины запрещенной зоны материала и выбирается путем изменения соотношения компонентов GaN/InN, от ближнего УФ (390 нм) для 0,02In/0,98Ga и фиолетово-синего (420 нм) для 0,1In/0,9Ga до синего (440 нм) для 0,3In/0,7Ga. На рынке [35] доступны мощные лазеры от синего до ближнего ИК с выходной мощностью до 50 Вт, например 405 нм

(150 мВт), 442 нм (50 мВт), 447 нм (400 мВт), 635 нм (5 Вт), 640 нм (300 мВт), 655 нм (2,5 Вт), 685 нм (20 мВт), 690 нм (800 мВт), 705 нм (25 мВт), 730 нм (30 мВт), 785 нм (1,2 Вт), 808 нм (10 Вт), 830 нм (30 мВт), 845 нм (30 мВт), 885 нм (5 Вт), 915 нм (50 Вт), 940 нм (50 Вт), 965 нм (2 Вт), 975 нм (50 Вт), 980 нм (50 Вт), 1450 нм (500 мВт), 1550 нм (600 мВт), 1560 нм (1 Вт).

Для целого ряда диагностических и терапевтических целей представляет интерес видимая и ближняя ИК-области излучения полупроводниковых лазеров (575–1500 нм): можно говорить о замене наиболее часто употребляемого He–Ne-лазера, работающего на красной линии, на более компактный, не уступающий, а зачастую существенно превосходящий по выходной мощности и имеющий почти в тысячу раз большую эффективность полупроводниковый лазер. Мощные инжекционные лазеры успешно используются вместо аргонового или криптонового лазеров при фотокоагуляции биотканей [2, 416, 422, 423].

Двумерные решетки, состоящие из большого количества лазеров, генерируют излучение мощностью до нескольких сотен ватт, например 800 Вт в режиме длинных импульсов ($\tau_n = 150$ мкс, $f = 40$ Гц, ток инжекции равен 80 А) с КПД 40% [988]. Двумерная матрица инжекционных лазеров позволяет получить плотность мощности до 1 кВт/см² на $\lambda = 810$ нм при длительности импульса 0,5 мс, $f = 20$ Гц [1078]. Матрица из 150 лазеров на основе AlGaAs/GaAs дает импульсы мощностью 450 Вт, длительностью 4 нс и частотой повторения 1 кГц [1079].

Главным недостатком полупроводниковых лазеров является чрезвычайно малый размер пучка на выходе (0,5–1,0 мкм), что влечет за собой по сравнению с другими лазерами существенно большую расходимость излучения (20–40° в плоскости, перпендикулярной плоскости активного слоя, и 5–10° в плоскости слоя — эллиптическое сечение пучка). Однако разнообразные технологические приемы, увеличивающие размер пучка на выходе диода, и применение коллимирующей оптики (цилиндрических линз) позволяют уменьшить расходимость (до 0,6–3,0°). Сфазированные диодные линейки, или решетки, имеют увеличенный размер пучка и сниженную расходимость в дальней зоне, вплоть до 0,01°, что дает возможность фокусировать излучение в пятно диаметром 1–3 мкм, эффективно использовать одномодовые световоды для передачи излучения, обеспечить диагностику биологических микрообъектов. Следует отметить значительную ширину линии усиления инжекционных лазеров, малые размеры резонатора (менее 1 мм), соответственно значительную разреженность продольных мод (порядка 50 ГГц, 1,6 см⁻¹) и чрезвычайно узкую ширину линии отдельной моды, которая может не превышать 50 кГц, что позволяет производить тонкую непрерывную перестройку частоты (длины волны) в широких пределах сравнительно простыми средствами.

Для многих применений, например лазерной интерферометрии и голографии, оказывается важным одночастотный режим работы лазера (значительная длина когерентности), что обеспечивают так называемые РОС-лазеры (лазеры с распределенной обратной связью). Другим достоинством РОС-лазеров является слабая зависимость длины волны от тока инжекции.

Приведем некоторые разработки Физико-технического института им. А. Ф. Иоффе Российской Академии наук (г. Санкт-Петербург), предлагаемые для различных, в том числе и биологических, применений. Это AlGaAs-лазер непрерывного действия с областью длин волн 780–860 нм, выходной мощностью $P = 0,5$ –1 Вт, расходимостью в дальней зоне $2\vartheta_{\parallel} \approx 1^\circ$ и $2\vartheta_{\perp} \approx 8^\circ$ (имеет термоохладительник); GaInAsP-лазер непрерывного действия с $\lambda = 1,3$ мкм, с $P = 0,15$ –0,50 Вт и одним или несколькими (5–10) волоконно-оптическими выходами (имеет термоохладительник); набор лазерных микрокоагуляторов биотканей на $\lambda = 810$ нм, с мощностью до 0,4 Вт и временами экспозиции 0,04–0,40 с; перестраиваемый лазер с $\lambda = 750$ –850 нм, область пере-

стройки в импульсном режиме $\Delta\lambda = 50$ нм, а в непрерывном — 20 нм, шириной линии — 0,15 нм; пикосекундный лазер с $\lambda = 820\text{--}850$ нм, мощностью в импульсе больше 0,5 Вт, длительностью $\tau_{\text{и}} = 5\text{--}30$ пс, частотой повторения импульсов $f = 15$ МГц.

Разработаны однокомпонентные одночастотные GaAlAs/GaAs-лазеры с плоским резонатором, работающие в диапазоне 780–850 нм с мощностью до 20 мВт и шириной линии 35 МГц [1077], которые могут оказаться полезными для лазерной спектроскопии биотканей. Для оптических томографов с временным разрешением перспективными являются одночастотные лазеры на квантово-размерных гетероструктурах (КРГ), которые обеспечивают высокую степень высокочастотной модуляции по току инжекции. Две модификации таких лазеров на GaAs/AlGaAs- и InGaAs/GaAs-гетероструктурах с квантово-размерными активными слоями и монолитным плоским резонатором описаны в [1076]. Первая модификация обеспечивала генерацию мощностью порядка 20 мВт на линиях 780 и 852 нм (длина волны определяется молярным содержанием Al в активном слое), а вторая — более 100 мВт на 975 нм, при уровне подавления боковых продольных мод более 30 дБ, ширина линии генерации около 50 МГц. Также перспективными для медицины представляются низкороговые КРГ-лазеры на основе InGaP/InGaAsP, которые могут работать в широком диапазоне температур (до 80 °С) с длиной волны излучения 1,02 мкм, ширина линии лазеров составляет 2–3 нм, с мощностью в несколько милливатт [1073].

КРГ-структуры используются также для создания новых типов суперлюминесцентных диодов (СЛД), необходимых для реализации когерентных томографических схем с повышенным пространственным разрешением и с большей глубиной зондирования [33, 1074, 1113]. Для (GaAl)As КРГ-структур, работающих на $\lambda = 800$ нм, полуширина спектра излучения достигает 100 нм (длина когерентности порядка 7 мкм), а для (InGa)PAs-структур, работающих на $\lambda = 1500$ нм, — 170 нм (длина когерентности порядка 13 мкм). Типичные значения выходной мощности СЛД лежат в диапазоне нескольких милливатт (5–15 мВт), однако продемонстрированы и существенно большие мощности порядка 100 мВт на выходе из волоконного световода СЛД на всех интересных для биомедицинских приложений длинах волн, включая 800 нм и 1300–1600 нм [1113]. Для уменьшения длины когерентности (повышения продольной разрешающей способности ОКТ, см. главу 2) необходимое расширение полосы частот излучения можно достичь сложением нескольких сдвинутых по длинам волн излучателей, либо на единственном излучателе на структурах со многими квантовыми ямами или квантовыми точками. Потенциально имеется возможность обеспечить длину когерентности порядка 1–2 мкм [1113].

Одна из ведущих фирм мира в области лазерной техники, LaserMax, выпускает широкий набор разнообразных полупроводниковых лазеров непрерывного действия для медицинских применений. Длины волн излучения лазеров лежат в диапазоне 660–1500 нм, максимальная выходная мощность в видимой области составляет 10 мВт, а в ИК — 100 мВт. Основные длины волн лазеров: 670, 780, 830, 1300 и 1550 нм, температурная перестройка длин волн — 0,25 нм/°С (в пределах рабочих температур $-10\text{--}+80$ °С), поляризация линейная ($> 100 : 1$ или $400 : 1$), расходимость излучения — 0,6–1,6 мрад (используется встроенная коллимирующая оптика), размеры пучка составляют $3,3 \times 0,6\text{--}3,8 \times 3,0$ мм², ширина линии — 0,01 нм или 3–4 нм, срок службы лазеров — $5 \cdot 10^4\text{--}10^5$ ч. Отдельные типы лазеров имеют цепь внутренней модуляции излучения в диапазоне от 2 кГц до 10 МГц. Лазеры, излучающие на $\lambda = 670$ нм, изготовлены на основе материала AlGaInP.

Фирма Micrasag выпускает непрерывные перестраиваемые лазеры небольшой мощности ($P \approx 25$ мВт). Области их перестройки — 780–820 нм и 810–860 нм, в одночастотном режиме кратковременная нестабильность частоты не хуже 30 кГц,

Таблица 4.7. Длины волн излучения полупроводниковых лазеров с накачкой током инжекции (1), светом (2), пучком электронов (3), стримерным разрядом (4) и скрещенными электрическим и магнитным полями (5) [1052]

| Рабочее вещество | Длина волны, мкм | Тип накачки | Рабочее вещество | Длина волны, мкм | Тип накачки | Рабочее вещество | Длина волны, мкм | Тип накачки |
|------------------------------------|------------------|-------------|------------------|------------------|-------------|---|------------------|-------------|
| ZnS | 0,32–0,33 | 2; 3 | AlGaSbAs | 0,62–1,77 | 1 | PbI ₂ | 2,47–2,49 | 2 |
| ZnCdS | 0,33–0,49 | 2 | GaPAs | 0,63–0,90 | 1; 3 | CdPbS | 2,5–4,3 | 1 |
| ZnO | 0,37–0,40 | 2–4 | ZnCdTe | 0,65–0,82 | 3 | InAs | 3,0–3,2 | 1–3 |
| ZnSe | 0,46–0,47 | 2–4 | MnCdTe | 0,66–0,67 | 2 | InAsSb | 3,1–5,3 | 1 |
| ZnCdSe | 0,48–0,52 | 3 | CdSe | 0,69–0,75 | 2; 3 | Te | 3,6–3,9 | 3 |
| CdS | 0,49–0,52 | 2–4 | CdTe | 0,78–0,79 | 3 | CdHeTe | 3,8–4,1 | 2 |
| CdSSe | 0,50–0,69 | 2–4 | GaAs | 0,82–0,92 | 1–4 | PbTe | 4,01–6,45 | 1 |
| CdHgS | 0,50–4,10 | 2 | GaAsSb | 0,85–1,60 | 1 | PbSSe | 4,1–8,5 | 1–3 |
| GaInP | 0,58–0,91 | 1; 2 | InGaAs | 0,85–3,20 | 1; 2 | PbGeTe | 4,1–6,5 | 1 |
| Cd ₃ (AsP) ₂ | 0,57–2,30 | 2 | InP | 0,89–0,95 | 1; 2; 4 | InSb | 4,8–5,3 | 1–3 |
| AlGaInP | 0,58–0,62 | 1 | InAsP | 0,90–3,20 | 1 | SnPbTe | 6,4–46 | 1–3 |
| CdSe | 0,59–0,60 | 2–4 | AlGaSb | 1,10–1,60 | 1 | SnPbSe | 6,4–46 | 1; 2 |
| GaInAsP | 0,6–3,0 | 1 | GaSb | 1,55–1,77 | 1–3 | SnTePbSe | 23,2–46,2 | 1 |
| AlGaAs | 0,62–0,90 | 1; 3 | AlGaSb | 1,6–1,8 | 1 | (PbSe) _{0,8} (SnTe) _{0,2} - -(PbSe) _{0,32} Te _{0,68} | 49,1 | 1 |
| AlGaAsP | 0,62–0,90 | 1 | GaInAsSb | 1,65–2,20 | 1 | p-Ge | 70–200 | 5 |

а долговременная — 1 МГц. Лазеры могут работать в режиме самосинхронизации мод с длительностью импульсов 10 пс и в режиме перестраиваемой длительности импульсов от 10 нс до ∞ . Лазеры этой фирмы имеют выходную мощность вплоть до 500 мВт и тем самым составляют конкуренцию дорогостоящим лазерам на красителях и титан-сапфировым лазерам с накачкой от аргоновых лазеров, что особенно важно в биомедицинских применениях.

Промышленность выпускает мощные полупроводниковые излучатели видимой и ближней ИК-областей спектра (650–690, 870–890, 910–920, 950–990, 1885–2004 нм) в виде отдельных лазеров с открытым выходом или отрезком световода на выходе, лазерных модулей и специальных медицинских систем. Например, фирма Applied Optronics Corporation предлагает отдельные лазеры мощностью до 0,6 Вт в видимой, до 1,6 Вт в ближней ИК-области и до 0,25 Вт для длин волн, больших 1800 нм; лазерные модули, работающие на очень малых токах (до 2 А) с выходной мощностью на торце световода (диаметром 0,7–2,3 мм) до 10 Вт в видимой, до 80 Вт в ближней ИК и до 12 Вт на длинах волн, больших 1800 нм; специальные системы с мощностью на выходе моноволоконного световода (диаметром 0,4–0,6 мм) до 8 Вт в видимой, до 60 Вт в ближней ИК и до 8 Вт на длинах волн, больших 1800 нм. Российско-германская фирма CeramOptec выпускает медицинскую систему для хирургии и термотерапии мягких тканей на основе GaInAs/GaAs решетки с длиной волны излучения 980 нм и максимальной выходной мощностью более 65 Вт (50 Вт на торце моноволоконного световода диаметром 0,2–1,2 мм).

Успешное применение в медицине мощных полупроводниковых лазеров, излучение которых близко по своему действию на биоткани излучению широко распространенного в медицинской практике АИГ:Nd-лазера, позволяет говорить о замене этого лазера на существенно более компактный, обладающий высоким КПД полупроводниковый лазер.

Кроме накачки током инъекции возможны и другие способы накачки полупроводниковых лазеров: оптический, электронным пучком, стримерным разрядом, скрещенными электрическим и магнитным полями [1052]. Использование разнообразных способов накачки позволит существенно расширить диапазон длин волн от ближнего УФ (320 нм) до дальнего ИК (200 мкм) (табл. 4.7). При двухфотонном лазерном возбуждении в широкозонных полупроводниковых материалах удастся получить УФ-генерацию в диапазоне 320–400 нм. Для оптической накачки применяются различные типы лазеров, в том числе и He–Ne, инъекционные полупроводниковые, лазеры на красителях. Мощность излучения полупроводниковых лазеров с оптической накачкой может быть на два-три порядка больше, чем в инъекционных лазерах, однако КПД таких устройств оказывается низким.

Наибольшую длину волны, вплоть до 200 мкм, имеют полупроводниковые лазеры на монокристалле германия *p*-типа, помещенном в скрещенные электрическое и магнитное поля. Типичные размеры монокристалла $(30\text{--}50) \times (5\text{--}6) \times (0,7\text{--}4,0)$ мм. Монокристалл помещается в сверхпроводящий соленоид, который обеспечивает продольное магнитное поле с индукцией в $10^4\text{--}10^5$ Тл, а с помощью омических контактов создается импульсное поперечное электрическое поле напряженностью 1–2 кВ/см. Максимальная мощность достигает 10 Вт с КПД, равным 10^{-3} .

4.6. Твердотельные лазеры с диодной накачкой

Прогресс в области создания мощных полупроводниковых излучателей вызвал бурное развитие твердотельных лазеров с диодной накачкой [988, 1057, 1059–1061, 1080, 1081, 1085, 1089, 1091, 1100]. Промышленность уже выпускает десятки наименований компактных высокоэффективных, стабильных, с большим сроком службы

лазеров, которые находят применение в микрохирургии, цитометрии, микроскопии, клеточной инженерии и пр. Их высокая эффективность обусловлена тем, что длины волн лазерных и светоизлучающих диодов на основе AlGaAs (700–900 нм) очень хорошо совпадают с сильными полосами поглощения твердотельных активных элементов с ионами Ho, Er, Nd и Pm. При таком способе возбуждения работают АИГ:Ho-лазер с $\lambda = 2090$ нм, YLF:Er-лазер с $\lambda = 2800$ нм, АИГ:Nd с $\lambda = 946$ нм, YVO₄:Nd-лазер с $\lambda = 1060$ нм, лазер на стекле с неодимом с $\lambda = 1060$ нм и др.

В рассматриваемых лазерах используются как поперечная накачка излучением линеек светоизлучающих диодов или лазеров, так и продольная лазерная накачка. Системы с продольной лазерной накачкой (рис. 4.15) оказываются существенно более эффективными и обеспечивают высокий КПД (около 20% от тока лазерного диода к излучению твердотельного лазера), низкую потребляемую мощность, малые габариты, высокую монохроматичность и когерентность, высокую стабильность частоты и мощности.

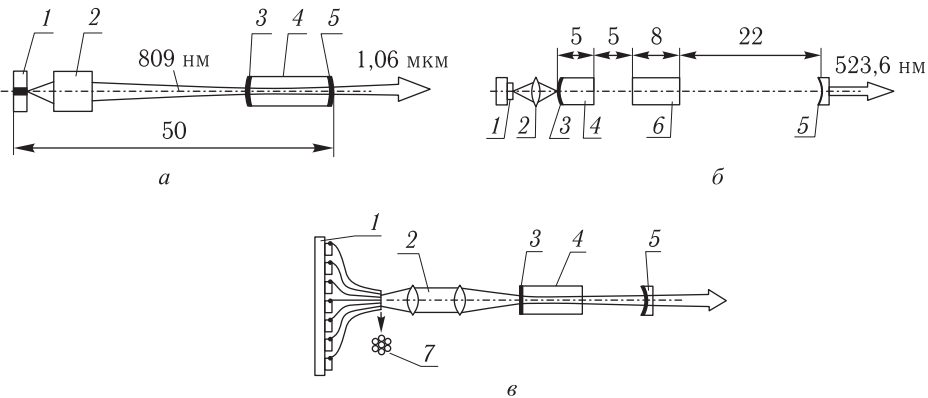


Рис. 4.15. Типичные схемы твердотельных лазеров с накачкой излучением лазерных диодов (размеры даны в миллиметрах): *a* — монолитный АИГ:Nd-лазер; *б* — YLF:Nd-лазер с внутрирезонаторным удвоением частоты ($\lambda = 523,6$ нм); *в* — лазер с волоконно-оптической системой накачки от 7-диодной линейки полупроводниковых лазеров (1 — полупроводниковый лазер или линейка лазеров; 2 — согласующая оптика; 3 — входное зеркало, пропускающее излучение накачки и отражающее излучение твердотельного лазера; 4 — активный элемент; 5 — выходное зеркало; 6 — нелинейный кристалл; 7 — волоконные световоды)

Для изображенной на рис. 4.15, *a* монолитной системы на основе АИГ:Nd-активного элемента диаметром 2 мм и длиной 5 мм, накачиваемого лазерным диодом с $\lambda = 809$ нм, удастся получить выходную мощность на $\lambda = 1060$ нм порядка 2 мВт с полным КПД, равным 6,5%. В качестве согласующего элемента применена градиентная линза, а торцы активного элемента представляют собой сферические зеркала с радиусом кривизны 19 мм.

Для более мощных лазерных диодов оказывается возможным получать мощность излучения непрерывных одномодовых неодимовых лазеров до 2 Вт. Двукратное увеличение выходной мощности можно получить при продольной накачке от двух полупроводниковых лазеров с взаимно ортогональными линейными поляризациями излучения [1061].

Другая система (рис. 4.15, *б*) демонстрирует возможность преобразования частоты. В качестве внутрирезонаторного нелинейного элемента использован кристалл LiNbO₃:MgO. Получена максимальная выходная мощность (около 0,15 мВт на $\lambda = 523,6$ нм) при мощности накачки (на $\lambda = 791$ нм) порядка 30 мВт, при пороге ге-

нерации около 7 мВт. Без нелинейного элемента мощность излучения на $\lambda = 1047$ нм составила 7,5 мВт при мощности накачки 26 мВт ($\lambda = 791$ нм).

Для линейки из семи лазерных диодов при подаче их излучения через волоконные световоды (ВС) на торец АИГ:Nd-активного элемента (рис. 4.15, в) получена выходная мощность 0,66 Вт в режиме ТЕМ₀₀ на $\lambda = 1060$ нм при полной эффективности, равной 4,4% [1059]. После ВС суммарная мощность излучения лазерных диодов составляла примерно 2 Вт при суммарном токе инъекции 7 А. Внутррезонаторное преобразование с помощью нелинейного кристалла позволило получить излучение с $\lambda = 530$ нм мощностью около 180 мВт. Такая схема накачки перспективна при использовании более мощных полупроводниковых лазеров.

Другим примером эффективной многоэлементной лазерной системы с квазипродольной накачкой является система, состоящая из 7 лазерных диодов мощностью по 300 мВт, каждый из которых накачивает свой активный элемент [1061]. АИГ:Nd-активные элементы, длиной 5 мм, размещались в многозеркальном резонаторе с оптической осью, проходящей по двум пересекающимся направлениям внутри каждого элемента. В непрерывном режиме генерации была получена выходная мощность излучения ($\lambda = 1060$ нм), равная 0,7 Вт (суммарная мощность накачки — 2,1 Вт), на второй гармонике $P = 0,15$ Вт. В импульсном режиме, который осуществлялся путем пассивной модуляции потерь в резонаторе, энергия импульсов при $\tau_{\text{и}} \approx 200$ нс была равна: 0,1 мДж ($\lambda = 1060$ нм); 0,032 мДж ($\lambda = 532$ нм); 0,002 мДж ($\lambda = 355$ нм).

Существенного повышения энергии импульсов можно добиться в случае поперечной накачки активного элемента излучением системы двумерных решеток лазерных диодов [1061]. При накачке активного элемента излучением 16 двумерных решеток, составленных из 74 линеек лазерных диодов, излучающих по 10 мДж ($\tau_{\text{и}} = 200$ мкс) каждая, удалось получить энергию импульсов АИГ:Nd-лазера, равную 0,26 Дж при $f = 40$ Гц и КПД более 10%.

Высокоэффективный миниатюрный АИГ:Nd-лазер с поперечной лазерной диодной накачкой, излучающий в зеленой области спектра, представлен в [1060]. Получено непрерывное излучение мощностью 360 мВт ($\lambda = 1060$ нм) и мощностью 80 мВт ($\lambda = 530$ нм) при мощности оптической накачки ($\lambda = 806$ нм), равной 800 мВт, и электрической накачки — 3,2 Вт. Полный КПД лазера равен 2,5%. Преобразование частоты подобного лазера вплоть до УФ дает при той же электрической мощности излучение ($\lambda = 355$ нм) мощностью 0,32 мВт [1061].

Для многих медицинских приложений может представлять интерес компактный пико- и фемтосекундный лазерный источник на основе кристалла LiSAF:Cr³⁺ с диодной накачкой и нерезонансным полупроводниковым нелинейным поглотителем внутри резонатора для обеспечения синхронизации мод [1081]. Источник генерирует сверхкороткие импульсы длительностью 45 фс (полуширина линии 17,5 нм) со средней длиной волны 852 нм и средней мощностью 60 мВт.

Многие из описываемых лазеров могут работать в режиме единственной продольной моды со стабильностью частоты не хуже, чем у He-Ne-лазера (флуктуационная ширина линии — порядка 1–10 кГц при мощности в несколько милливатт, при активной стабилизации частоты вплоть до 3 Гц) [1080].

Наиболее эффективные твердотельные лазеры с диодной лазерной накачкой имеют выходную мощность ($\lambda = 1060$ нм) вплоть до 1,2 Вт при полном КПД, равном 19%. Промышленность уже давно выпускает непрерывные АИГ:Nd-лазеры с лазерной диодной накачкой ($\lambda = 1060$ нм) мощностью до 3–5 Вт.

Например, фирма ADLAS/A-B Lasers выпускает непрерывные лазеры мощностью более 0,75 Вт ($\lambda = 1064$ нм) и более 0,14 Вт ($\lambda = 532$ нм). Импульсные лазеры с модуляцией добротности этой фирмы имеют энергию порядка 150 мкДж ($\lambda = 1047$ нм) и 40 мкДж ($\lambda = 523$ нм). Одночастотные лазеры фирмы Micrasol

имеют мощность вплоть до 0,5 Вт ($\lambda = 1060$ нм) и 0,25 Вт ($\lambda = 1320$ нм). Лазеры этой фирмы обладают высокой кратковременной ($\delta\nu \leq 3$ кГц) и долговременной (10^{-9}) стабильностью частоты, имеют возможность тепловой перестройки частоты в диапазоне более 20 ГГц и частотной модуляции излучения в широкой полосе, вплоть до 1 ГГц. Лазеры имеют выход в виде отрезка волоконного световода. Фирма Amoco Laser также выпускает высокостабильные одночастотные лазеры мощностью до 0,1 Вт ($\lambda = 1064$ и 1319 нм), с шириной линии менее 5 кГц и долговременной нестабильностью мощности на уровне 2%.

Фирма Power Technology Inc. выпускает высокостабильные одномодовые лазеры непрерывного действия с линейной поляризацией с выходной мощностью до 150 мВт на $\lambda = 1064$ нм, 50 мВт на $\lambda = 532$ нм (вторая гармоника) и 10 мВт на $\lambda = 946$ нм.

Фирма CeramOptec предлагает фотокоагулятор на основе АИГ-Nd-лазера с диодной накачкой и преобразованием частоты, имеющий на $\lambda = 532$ нм выходную мощность до 2 Вт.

В качестве примера приведем недавние разработки полностью твердотельных компактных лазеров, генерирующих в видимой области непрерывное излучение мощностью порядка 1–2 Вт [1107, 1108]. В [1107] описан АИГ-Nd-лазер (1123 нм) с диодной накачкой и внутрирезонаторным удвоением частоты с помощью нелинейного кристалла LiB_3O_5 (LBO), работающий на желто-зеленой линии излучения 561 нм с мощностью до 1,2 Вт. Полная оптическая эффективность при оптической мощности накачки 10 Вт такого лазера достигает 13,3%, а долговременная стабильность выходной мощности лучше, чем 3% за 3 ч. Другой лазер на кристалле Nd:GdVO_4 , генерирующий на переходе ${}^4F_{3/2} - {}^4I_{11/2}$ с длиной волны 1083 нм, при продольной накачке от диодного лазера (808 нм) мощностью 18,7 Вт и внутрирезонаторном удвоении частоты с помощью того же нелинейного кристалла LiB_3O_5 (LBO) дает выходную мощность до 2,14 Вт непрерывного излучения на длине волны 541,5 нм (рис. 4.16) [1108]. Полная оптическая эффективность этого лазера достигает 11,4%, а долговременная стабильность выходной мощности лучше, чем 3,5% за 4 ч.

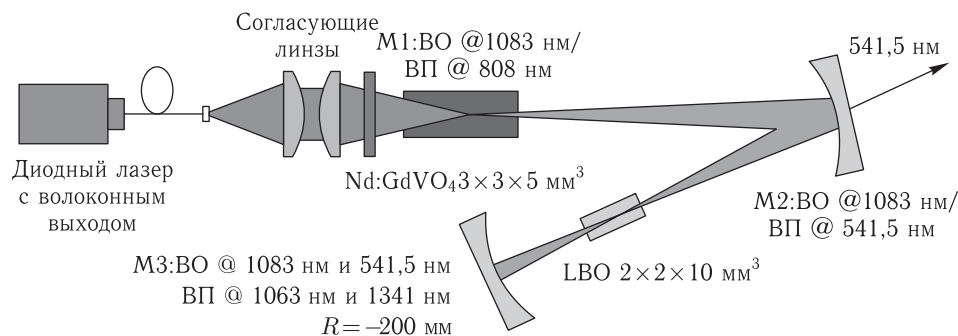


Рис. 4.16. Полностью твердотельный лазер с накачкой от диодного лазера и с удвоением частоты, генерирующий непрерывное излучение на длине волны 541,5 нм; расстояния между зеркалами M1–M2 и M2–M3 соответственно равны 74 и 45 мм; VO — высокое отражение, ВП — высокое пропускание [1108]

4.7. Перестраиваемые лазерные источники

Успех применения методов лазерной спектроскопии в диагностике, а также методов селективной терапии и фотодеструкции биотканей определяется во многом суще-

ствованием простого и надежного источника лазерного излучения, перестраиваемого в нужном диапазоне длин волн. По мере описания различных лазеров особое внимание уделено именно этой проблеме, как одной из главных для биомедицины. Кроме представленных выше типов перестраиваемых лазеров существуют и другие, основанные на иных принципах получения перестраиваемого когерентного излучения. Рассмотрим наиболее важные из них [7, 205, 978–982, 997, 1062–1064, 1082, 1085, 1089–1093, 1099].

Часто для получения перестраиваемого излучения используют явление вынужденного комбинационного рассеяния (ВКР). Одним из представителей *ВКР-лазеров* является *полупроводниковый лазер на основе комбинационного рассеяния с переверотом сцины* [994]. Его работа основана на рассеянии излучения лазера — накачки электронами проводимости в полупроводниках, помещенных в однородное магнитное поле при низкой температуре. Частота лазера перестраивается в широких пределах изменением напряженности магнитного поля со скоростью $2 \cdot 10^{-4} \text{ см}^{-1}/(\text{А} \cdot \text{м}^{-1})$ для активного элемента из InSb. При использовании сверхпроводящих магнитов обеспечивается диапазон перестройки InSb-лазера в пределах 300 см^{-1} (напряженность магнитного поля изменяется от $1,6 \cdot 10^6$ до $8 \cdot 10^6 \text{ А} \cdot \text{м}^{-1}$). Перестройка осуществляется также изменением длины волны лазера накачки, в качестве которых обычно служат СО- или СО₂-лазеры. Для InSb-лазера диапазон перестройки при накачке СО-лазером составляет 5,0–6,5 мкм, порог генерации равен $50 \text{ Вт} \cdot \text{см}^{-2}$, мощность генерации достигает нескольких ватт, КПД преобразования — до 50%. Накачка СО₂-лазером эффективна для более длинноволнового диапазона, от 9,0 до 14,0 мкм, импульсная мощность достигает 1 кВт.

ВКР на колебательных и вращательных переходах в газах или конденсированных средах лежит в основе так называемых *комбинационных лазеров*. Для газообразных активных сред удается преобразовать частоту, тем самым для получения перестраиваемого излучения необходим перестраиваемый источник накачки. При использовании лазера на красителях в комбинационном лазере на газообразном водороде удается получить плавную перестройку в диапазонах длин волн 185–880 нм и 700–7000 нм. Параметры многоцветного ВКР-лазера при преобразовании излучения первой, второй и третьей гармоник импульсного АИГ:Nd-лазера в сжатом водороде ($p = 5\text{--}10 \text{ атм}$) представлены в табл. 4.8 [1063].

Таблица 4.8. Характеристики многоцветного импульсного лазера на сжатом водороде [1064]

| | | | | | | | | |
|--------------------|-----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|
| Длина волны, нм | 309 | 355 | 369 | 416 | 436 | 457 | 503 | 532 |
| Тип преобразования | 1ас ТГ | ТГ | 2ас ВГ | 1с ТГ | 1ас ВГ | 3ас ПГ | 2с ТГ | ВГ |
| Эффективность, % | 0,2 | 10 | 0,1 | 1,5 | 0,3 | 0,1 | 0,4 | 30 |
| Длина волны, нм | 565 | 636 | 683 | 738 | 954 | 1064 | 1579 | 1907 |
| Тип преобразования | 2ас ПГ | 3с ТГ | 1с ВГ | 1ас ПГ | 2с ВГ | ПГ | 3с ВГ | 1с ПГ |
| Эффективность, % | 0,1 | 0,1 | 10 | 1,0 | 1,0 | 100 | 0,6 | 15 |

Примечание. с, ас — стоксовые и антистоксовые компоненты ВКР первой (ПГ), второй (ВГ) и третьей (ТГ) гармоник излучения АИГ:Nd-лазера соответственно.

Комбинационный лазер на жидком азоте с продольной накачкой может работать в многоимпульсном режиме с КПД преобразования 15–25% [1082]. Излучение с $\lambda = 1060 \text{ нм}$ преобразуется в излучение с $\lambda = 1440 \text{ нм}$ с энергией до 36 Дж в серии из 30 импульсов общей длительностью 550 мкс, с расходимостью 0,5–1,5 мрад

и размером пучка $1 \times 1 \text{ см}^2$. Другой ВКР-лазер на метане при атмосферном давлении, возбуждаемый излучением КгF-лазера (249 нм), при КПД преобразования в излучение с $\lambda = 268 \text{ нм}$ порядка 35–50% обеспечивает энергию до 5 Дж [1082].

ВКР-лазеры относятся к большому многообразию лазерных систем, в которых реализуются методы нелинейного оптического смешения. Использующие нелинейное взаимодействие лазерного излучения с атомами и молекулами конденсированных и газообразных сред *генераторы второй гармоники, суммарных и разностных частот*, а также *параметрические генераторы* покрывают весь диапазон от вакуумного УФ до далекой ИК-области, имеют вполне удовлетворительную для многих биомедицинских задач интенсивность когерентного излучения [1062].

Генерацию второй и высших гармоник (вплоть до шестой) обычно получают с помощью нелинейных кристаллов, расположенных как внутри, так и вне резонатора. Наиболее распространенными кристаллами, обладающими широкими спектральными диапазонами прозрачности и высокой эффективностью, являются: KDP, DKDP, KTP, LiNbO₃, LiB₃O₅, KNbO₃, LiIO₃, KB₅, DKB₅, LFM, банан (Ba₂NaNb₅O₁₅). Области прозрачности этих кристаллов лежат в широком интервале длин волн, от УФ до ИК, и покрывают диапазон от 0,16 до 5 мкм [1062]. В более длинноволновой области, $\lambda_n = 5,3\text{--}6,1 \text{ мкм}$, эффективен кристалл ZnGeP₂ [1064]. Поскольку интенсивность волны на второй гармонике $I(2\omega)$ пропорциональна квадрату интенсивности сигнала накачки $I(\omega)$, то для повышения эффективности преобразования необходимо повышать интенсивность накачки. Эффективность преобразования обычно не превышает 10–50% для внерезонаторных схем преобразования и достигает 100% для внутрирезонаторных. В случае преобразования перестраиваемого по частоте лазерного излучения необходимо обеспечить синхронную угловую или температурную перестройку нелинейного кристалла для соблюдения фазового синхронизма взаимодействующих волн. При использовании лазеров на красителях с удвоением частоты удается перекрыть диапазон от 217 до 450 нм.

Для генерации суммарных частот и высших гармоник помимо кристаллов используют однородные смеси инертных газов и паров металлов, что расширяет диапазон перестраиваемого когерентного излучения вплоть до вакуумного УФ. Например, при утроении четвертой гармоники гранатового лазера ($\lambda = 266 \text{ нм}$) в смеси Хе–Ар получается излучение с $\lambda = 88,7 \text{ нм}$.

Нелинейное смешение излучений лазеров видимого диапазона, один из которых перестраиваемый, дает разностные частоты в ИК-области спектра и является основой спектрометров разностной частоты. Например, при смешении излучений аргонового лазера и лазера на красителях в кристалле LiNbO₃ перестройка частоты лазера на красителях и температурная перестройка фазового синхронизма нелинейного кристалла позволяют получить перестраиваемое когерентное излучение в диапазоне 2,2–4,2 мкм.

Смешение в длинном (11 мм) кристалле GaSe световых пучков АИГ:Nd-лазера ($\lambda = 1060 \text{ нм}$, $P_i = 0,5 \text{ кВт}$) и LiF:F₂⁻-лазера ($\lambda = 1090\text{--}1240 \text{ нм}$) дает когерентное излучение в области длин волн 7–16 мкм, с мощностью в импульсе 1,0–0,2 кВт [988].

Кристаллы, прозрачные в УФ-области, позволяют осуществлять суммирование частот видимого и ближнего ИК-диапазонов. Например, нелинейное смешение излучений двух лазеров на красителях ($\lambda = 237 \text{ нм}$ (вторая гармоника) и $\lambda = 740\text{--}910 \text{ нм}$) в кристалле KB₅ дает перестраиваемое излучение в области 185–269 нм [1062].

Важное место среди устройств нелинейной оптики занимает оптический *параметрический генератор*, который представляет собой нелинейный кристалл, расположенный внутри оптического резонатора и накачиваемый излучением внешнего лазера, работающего на фиксированной частоте. Оптический резонатор осуществляет обратную связь для обеих или одной из волн, возникающих при нелинейном взаи-

модействии внешнего излучения с кристаллом. Перестройка параметрического генератора осуществляется или вращением кристалла, или изменением его температуры. При накачке кристалла LiNbO_3 излучением гранатового лазера с удвоением частоты удается получить параметрическую генерацию в диапазоне длин волн 0,55–4,00 мкм. При этом поворот кристалла на 4° изменяет длину волны от 1,4 до 4,0 мкм.

Параметрическая генерация света с температурной перестройкой (80–220 °С) в диапазоне 0,75–1,82 мкм, с эффективностью 5 %, реализуется в кристалле ниобата бария-натрия (банан) при накачке второй гармоникой АИГ:Nd-лазера с модуляцией добротности [1062]. Накачка непрерывным Аг-лазером (с $\lambda = 488$ и 514 нм) дает в этом же кристалле генерацию в областях 640–660 нм и 930–1160 нм, с эффективностью порядка 1 %. При синхронной накачке импульсным пикосекундным излучением второй гармоники гранатового лазера удается получить эффективность преобразования до 25 % в диапазоне 0,8–1,6 мкм ($\tau_i \approx 10$ пс) [1062]. Параметрический генератор на кристалле LFM дает перестраиваемое излучение в видимой области (458–610 нм) при накачке азотным лазером ($\lambda = 337$ нм, $\tau_i \approx 7$ нс).

Лазер на свободных электронах (ЛСЭ) оценивается как перспективный лазер для применений в биомедицине, поскольку он имеет чрезвычайно широкую область перестройки длин волн (0,1–1000 мкм), значительную среднюю мощность (до 10 Вт), короткую длительность импульсов (3–35 пс), достаточно высокую частоту повторения импульсов (1–100 Гц) [415, 1065, 1083]. В качестве активной среды ЛСЭ используют пучок высокоэнергетических электронов. Указанная область перестройки реализуется с различными типами ускорителей электронов. Типичные области перестройки: 0,5–1,4; 1,4–3,1; 0,5–2,6; 2,5–4,3; 9–35 и 120–800 мкм. Главная ценность такого лазера для биомедицины, особенно для лазерной терапии, заключается в возможности получения перестраиваемого излучения в дальней ИК-области спектра, вплоть до миллиметрового диапазона длин волн, где уже действуют применяемые в терапии генераторы радиодиапазона (использующие иные принципы генерации). Известно применение ЛСЭ (с $\lambda = 200$ мкм) для воздействия на процесс синтеза ДНК и РНК в клетках [415].

Возможны самые разнообразные применения ЛСЭ в медицине, включая не только терапию, но также диагностику и хирургию, однако существуют серьезные препятствия по использованию ЛСЭ на практике, обусловленные его большими размерами и высокой стоимостью.

4.8. Лазеры с короткой и сверхкороткой длительностью импульсов

Трудно переоценить те перспективы, которые открылись в биологии при появлении лазеров со сверхкороткой длительностью импульсов, например в изучении первичных механизмов фотосинтеза, путей передачи энергии возбуждения в сложных биологических молекулах и пр. Рассмотрению методов и устройств для получения световых импульсов короткой и сверхкороткой длительности посвящена обширная литература [978, 980, 985, 991, 998, 999, 1051, 1075, 1098, 1104–1106]. Здесь обсудим лишь основные принципы получения коротких и сверхкоротких импульсов и приведем некоторые цифры, характеризующие возможности отдельных типов лазеров.

Для укорочения длительности и повышения мощности световых импульсов применяют *модуляцию добротности* (потерь) резонатора. Режим характеризуется более мощными по сравнению с режимом свободной генерации импульсами генерации, так называемыми *гигантскими импульсами*. В качестве управляющих элементов (оптических затворов) наиболее часто используют электрооптические или акустооптические

ские модуляторы, пассивные затворы на просветляющихся красителях и щелочно-галлоидных кристаллах с центрами окраски или нелинейно поглощающие газы внутри резонатора, тем самым реализуя пассивную или активную модуляцию добротности. Режим модуляции добротности осуществлен для всех типов лазеров, однако наиболее часто он используется в твердотельных лазерах или в CO_2 -лазерах. Длительности гигантских импульсов, $\tau_{\text{и}}$, приблизительно равны 10–100 нс. Например, для рубинового лазера в TEM_{00} -мод, имеющего в режиме свободной генерации пиковую мощность 10^6 Вт при длительности импульса 1–3 мс, переход в режим гигантских импульсов дает пиковую мощность 10^9 Вт при длительности около 10 нс.

Существенно более короткие длительности в пикосекундном и даже субпикосекундном диапазоне можно получить в режиме синхронизации многих продольных (TEM_{00}) мод. Если между модами лазера устанавливаются определенные фазовые соотношения, т.е. излучение отдельных мод происходит синхронно, то говорят о существовании режима вынужденной или спонтанной *синхронизации мод*. Для осуществления вынужденной синхронизации мод используют модуляцию потерь с помощью электрооптических и акустооптических модуляторов на частотах, близких к межмодовому частотному интервалу $c/2nL$, где c — скорость света; nL — оптическая длина резонатора лазера. Пассивная синхронизация мод обеспечивается либо самой активной средой лазера, либо внесением внутрь резонатора такой среды, дисперсия которой способствует выравниванию межмодового интервала в пределах всей линии усиления.

В режиме синхронизации моды лазера интерферируют между собой с образованием коротких световых импульсов длительностью, определяемой шириной спектра мод (шириной линии генерации), $\tau_{\text{и}} \approx 1/\Delta\nu_{\text{г}}$, разделенных временным интервалом $\Delta t = 2nL/c$ (см. рис. 4.3). Для газовых лазеров $\Delta\nu_{\text{г}} \approx 10^9$ – 10^{10} Гц, поэтому можно получить импульсы лишь наносекундной и субнаносекундной длительности; для твердотельных лазеров $\Delta\nu_{\text{г}} \approx 10^{12}$ – 10^{13} Гц и $\tau_{\text{и}} \leq 1$ пс; для лазеров на красителях $\Delta\nu_{\text{г}} \approx 10^{14}$ – 10^{15} Гц, следовательно, достижимы фемтосекундные длительности.

Наиболее простой способ получения наносекундных и субнаносекундных импульсов в He–Ne-лазерах непрерывного действия состоит в обеспечении устойчивости режима самосинхронизации мод, для чего необходимо в лазерах, работающих на 8–10 продольных модах, удерживать длину резонатора постоянной. При определенных условиях промышленные He–Ne-лазеры с длиной резонатора 20–80 см довольно стабильно работают в режиме наносекундных импульсов [1066]. Например, лазер типа ЛГ-79 при мощности 7–12 мВт дает импульсы с $\tau_{\text{и}}$, равной 0,7–0,9 нс. Режим вынужденной синхронизации мод, полученный с помощью акустооптического модулятора внутри резонатора, позволяет легко получить импульсную генерацию в He–Ne-лазере ($\lambda = 1,15$ мкм) с параметрами: $\tau_{\text{и}} = 0,5$ нс, $f = 83,6$ МГц, $P_{\text{и}} = 40$ мВт [558].

С помощью перестраиваемых по длинам волн лазеров со сверхкороткой длительностью можно решить многие задачи кинетической спектроскопии биологических объектов. Наиболее эффективным способом получения сверхкоротких перестраиваемых по длинам волн импульсов длительностью 10^{-11} – 10^{-13} с является метод синхронной оптической накачки, который заключается в модуляции усиления активной среды лазера на частотах, равных или кратных обратному времени обхода резонатора, $f = 1/\Delta t = c/2nL$ [998]. Лазер генерирует последовательность импульсов, следующих синхронно с импульсами накачки. Если в качестве источника выбран лазер с синхронизированными модами, то оптические длины лазера накачки и перестраиваемого лазера должны быть согласованы с необходимой точностью. Синхронная накачка реализована для большинства перестраиваемых лазеров и лазерных систем, включая лазеры на центрах окраски, полупроводниковые и ВКР-лазеры,

параметрические генераторы и, конечно, лазеры на органических красителях, получившие наибольшее распространение и выпускаемые промышленностью.

Лазеры с синхронной накачкой имеют сравнительно низкий порог возбуждения, широкую область перестройки, значительную эффективность и способность генерировать импульсы существенно меньшей длительности, чем импульсы накачки. Генерируемые импульсы обладают высоким спектральным качеством (отсутствует дополнительная модуляция частоты), поэтому они представляют интерес для прецизионной кинетической спектроскопии и возбуждения волоконно-оптических систем, служащих для компрессии (сжатия) импульсов во времени [998]. Обычно методом синхронной накачки удается получить импульсы длительностью единицы пикосекунд — сотни фемтосекунд. Для лазеров на красителях с синхронной накачкой (рис. 4.17) типичными являются импульсы длительностью 2,5–10 пс, средней мощностью 80–100 мВт, частотой повторения импульсов от одиночных импульсов до 100 МГц, энергией одиночного импульса 1–20 нДж, пиковой мощностью 0,5–2 кВт. Минимальная длительность импульсов для лазеров на красителях с синхронной накачкой составляет 180 фс.

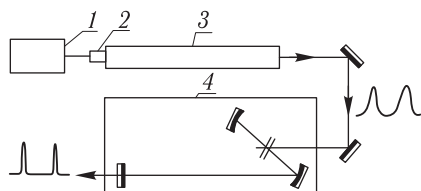


Рис. 4.17. Схема лазера на красителях с синхронной накачкой: 1 — генератор ВЧ-колебаний; 2 — устройство, обеспечивающее вынужденную синхронизацию мод; 3 — аргоновый лазер с синхронизацией мод; 4 — лазер на красителях

Наиболее короткие импульсы, полученные в лазерах на красителях с пассивной синхронизацией мод методом сталкивающихся импульсов (СРМ), имеют длительность 27 фс. Фемтосекундные лазеры на красителях с пассивной синхронизацией мод могут перестраиваться в довольно широком диапазоне длин волн при подборе нескольких пар усиливающих и поглощающих красителей (перекрываются диапазоны длин волн 550–700 нм, 840–880 нм и 1250–1350 нм) [998].

Наиболее короткие импульсы света (длительностью 6 фс) получены при компрессии фемтосекундных импульсов длительностью 50 фс и мощностью порядка 200–300 кВт ($\lambda = 625$ нм) в одномодовом волоконном световоде длиной 0,8 см. Такая малая длительность составляет примерно три периода световых колебаний и близка к теоретическому пределу (один световой период).

Имеются сообщения о создании перестраиваемого в области длин волн 800–850 нм 9-фемтосекундного лазера с энергией, равной 10 нДж [1067], а также перестраиваемого субпикосекундного инфракрасного генератора (генерация разностных частот в кристалле LiNbO_3), работающего в диапазоне 1,7–4 мкм и генерирующего импульсы мощностью 10 кВт ($E_{\text{и}} = 2$ нДж) при длительности 200 фс [1068]. Отметим, что подобные устройства весьма сложны и содержат, как правило, синхронно накачиваемый аргоновым лазером лазер на красителях, накачиваемый медным или эксимерным лазером усилитель на красителях, ВКР-ячейку для генерации континуума, волоконно-оптический компрессор импульсов, нелинейный кристалл для генерации гармоник.

Детальное описание методов и схем синхронной накачки перестраиваемых лазеров, других методов получения стабильных сверхкоротких импульсов, разнообразных схем компрессии импульсов, методов и устройств для получения мощных фемтосекундных импульсов в УФ, видимом и ИК-диапазонах длин волн, а также техники измерений параметров сверхкоротких импульсов дано в [998, 1098, 1104–1106, 1110].

Возможности получения сверхкоротких импульсов света в полупроводниковых инжекционных лазерах проанализированы в [1051, 1075]. Минимальные длительности импульсов составляют 1,8–0,8 пс, нет ограничений для получения и более коротких импульсов, порядка 200–300 фс. Главными достоинствами полупроводниковых лазеров со сверхкороткой длительностью импульсов являются их простота и малые габариты.

Лазер на красителях, работающий в режиме синхронизации мод, полученный методом сталкивающихся импульсов (СРМ) и имеющий длительность 100 фс, широко используется в биомедицинских исследованиях [1, 173]. Для низкокогерентной томографии и нелинейной микроскопии биотканей широко используются титан-сапфировый ($\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$), $\text{Cr}^{4+}:\text{Mg}_2\text{SiO}_4$ - и $\text{Cr}^{4+}:\text{YAG}$ -лазеры с пассивной синхронизацией мод по методу керровской линзы (KLM), обеспечивающей надежную синхронизацию мод лазеров в соответствующих спектральных диапазонах: 700–1100 нм, 1180–1360 нм и 1350–1640 нм с длительностями импульсов менее 100 фс (до 10 фс) и средней мощностью до 100 мВт [1069, 1070]. Одна из схем фемтосекундного титан-сапфирового лазера ($\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$), используемого в ОКТ системах сверхвысокого разрешения основана на технологии зеркала с двойным чирпом (DCM) [1069]. Эта технология позволяет существенно увеличить спектральную полосу отражения зеркал лазера и обеспечивает эффективную компенсацию дисперсии кубического порядка [1098]. Такой лазер генерирует импульсы длительностью 5,5 фс, что соответствует полосе ~ 300 нм с центральной длиной волны на 800 нм, со средней мощностью 150 мВт.

Малогобаритные лазеры на тонких дисках, отличительной особенностью которых является малая толщина активной среды, во много раз меньшая поперечного размера накачиваемой активной области, являются перспективными лазерами для биомедицинских исследований и приложений [1105, 1110–1112]. Диаметр активной области дискового лазера варьируется от 1 мм для лазеров с низкой выходной мощностью до 10 мм и более для получения лазеров с выходной мощностью в десятки киловатт. Толщина активной среды меняется обычно от 100 мкм до 300 мкм. Малая толщина активного материала позволяет эффективно охлаждать и отводить большой тепловой поток без значительного повышения температуры. Поэтому лазеры на тонких дисках способны генерировать излучение высокой мощности.

На рис. 4.18, *a* показана наиболее распространенная конфигурация активного элемента лазера. На верхнюю сторону диска нанесено просветляющее покрытие, а на нижнюю — зеркальное покрытие для отражения излучения накачки и генерируемого излучения. Диск закреплен на подложке зеркальной стороной. В средней части диска создается инверсия заселенности путем накачки лазерными диодами. Достигаемая плотность излучения накачки несколько кВт на см^2 . Выделяющееся в лазерном материале тепло хорошо отводится. Поглощение излучения накачки при отражении на диске составляет около 15–20%. Для получения высокого КПД в лазере используется многопроходная схема накачки (обычно 16–32 прохода), в этом случае до 90% излучения накачки поглощается в лазерном диске. Фактически диск представляет собой усиливающее зеркало, которое заменяет одно из зеркал резонатора. При мощности накачки в 1 кВт можно получать выходную мощность до 700 Вт с диаметром активной области на диске около 5 мм.

Эффективное охлаждение активного материала позволяет использовать легирование ионами иттербия с практически трехуровневой энергетической схемой. Иттербий часто используют в лазерах из-за малой разницы энергий фотонов накачки и выходного излучения. Это позволяет уменьшить нагрев лазерного материала и увеличить КПД. В сравнении с неодимом (при накачке лазерными диодами с длиной волны излучения 808 нм) нагрев материала за счет разницы энергий фотонов уменьшается в два раза в случае использования иттербия. Ионы иттербия размещаются обычно

в матрице граната (YAG). Кроме иттербия в лазерах на тонких дисках используются также и другие ионы: неодим, гольмий, тулий и эрбий. Однако в коммерческих лазерах на тонких дисках используются только иттербий и неодим (рис. 4.19).

Важным преимуществом тонких дисков является очень слабое фазовое искажение лазерных пучков при больших мощностях накачки (слабая тепловая линза). Амплитуда фазовых искажений более высокого порядка (за вычетом сферических аберраций) обычно меньше 100 нм. Эти искажения сосредоточены на краю активной области. Благодаря столь слабому искажению фазы излучателя на тонких дисках могут достигать высокой выходной мощности в одномодовом (TEM_{00}) режиме работы с высоким КПД. Типичные значения КПД составляют 30–40%.

Преимущества лазеров на тонких дисках проявляются особенно сильно в импульсном режиме работы. Средняя мощность в 100 Вт легко достигается для всех импульсных режимов, кроме режима сверхкоротких импульсов (< 800 фс). Частота повторения ограничивается только динамическим откликом лазера и составляет ~ 1 МГц для лазеров с модуляцией добротности. На рис. 4.18, б показаны основные элементы, необходимые для построения лазера с заданной длительностью импульса. На рис. 4.19 представлены соответствующие данные по длительностям и энергиям импульсов для коммерческих и лабораторных лазеров на тонких дисках.

Для модуляции добротности резонатора, которая требует внесения в резонатор дополнительных потерь, препятствующих генерации между импульсами, обычно используется акустооптический модулятор (АОМ) (рис. 4.18, б). Ультразвуковые волны создают в материале модулятора дифракционную решетку. Она вызывает отклонение луча в резонаторе и создает потери. При накачке лазера от диодного лазера энергия, сохраненная активной средой дискового лазера, высвечивается затем в виде одного короткого и мощного импульса. Длительность выходного импульса зависит от многих факторов: от длины резонатора, усиления тонкого диска, пропускания выходного зеркала и т. д. Обычно длительность лежит в диапазоне 300 нс — 1 мкс. Более короткие импульсы требуют короткого резонатора. Длительность импульса и энергия зависят также от частоты повторения и не могут изменяться независимо друг от друга.

Для получения коротких импульсов с линейной поляризацией излучения в резонатор добавляется электрооптический ключ (ячейка Погкельса) и поляризатор (рис. 4.18, б). Добротность резонатора между импульсами снижена, за счет включения потерь, поэтому инверсия заселенности в активном элементе нарастает и после выключения потерь уже в полной мере используется для генерации короткого и мощного импульса. В такой схеме все зеркала могут быть глухими, а вывод излучения происходит через пластинку поляризатора. Обычно длительность импульса составляет 20–30 нс.

Схема регенеративного усилителя (рис. 4.18, б) внешне мало отличается от предыдущей схемы. Между импульсами потери в резонаторе регенеративного усилителя таковы, что предотвращают генерацию. Энергия накапливается в активном элементе в виде инверсной заселенности рабочих уровней. Процессы выключения потерь и введения оптического импульса от задающего генератора синхронизированы во времени. Это необходимо, чтобы исходный (усиливаемый) импульс оказался запертым в усилителе, когда резонатор окажется высокодобротным после выключения потерь. В результате усиления (обычно 50 проходов резонатора достаточно для усиления в 10^5 раз) импульс покидает регенеративный усилитель через разделитель, построенный обычно с помощью эффекта Фарадея. Усилители для генерации наносекундных и пикосекундных импульсов практически не отличаются друг от друга.

Синхронизация мод может быть осуществлена с помощью полупроводникового просветляющегося фильтра (SESAM). Оба основных элемента лазера — тонкий диск и просветляющийся фильтр — имеют малый размер в направлении, параллельном

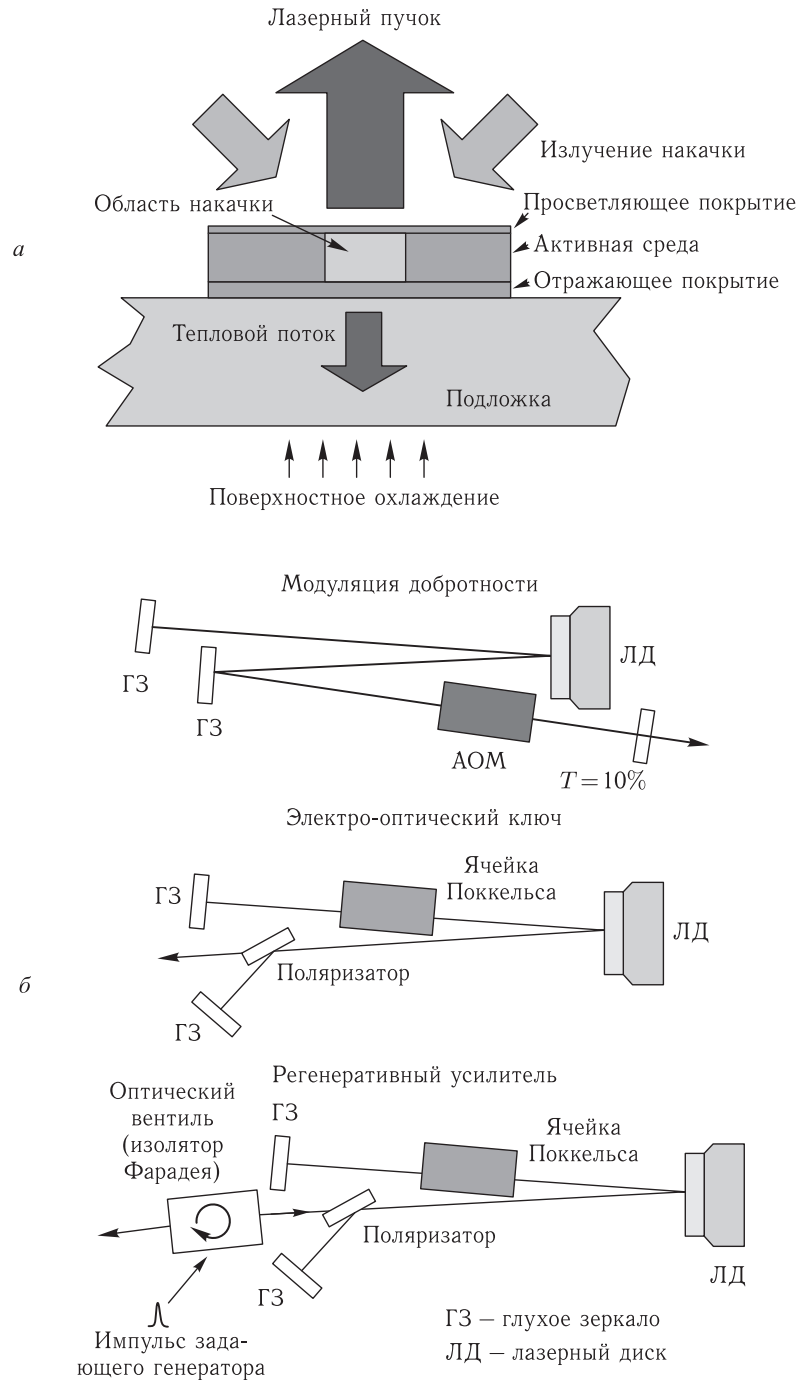


Рис. 4.18. Дискный лазер, схемы импульсной генерации: *a* — устройство активного элемента — тонкий диск, питаемый на подложку (активная область может иметь диаметр до 6 мм); *б* — схемы генерации, АОМ — акустооптический модулятор [1110]



Рис. 4.19. Режимы генерации дискового лазера

лучу лазера и плоскостное охлаждение. Поэтому хорошо интегрируются в единую систему. Активная область на обоих элементах может подбираться в соответствии с требуемой мощностью. На рынке уже доступны излучатели с энергией в 1 мкДж и средней мощностью в 50 Вт. Большие импульсные энергии могут быть получены путем удлинения резонатора и снижения частоты повторения импульсов ниже обычных 50 МГц. Дополнительные меры, такие как, например, увеличение числа отражений на диске за проход резонатора, позволили достичь энергии 25,9 мкДж [1112] (см. рис. 4.19).

Рентгеновские лазеры, относящиеся к столкновительным лазерам, на Ni-подобных ионах тяжелых металлов являются одними из наиболее разработанных [1084]. Источником рентгеновского излучения является мишень из тяжелых металлов, облучаемая одним или несколькими импульсами накачки высокой энергии и малой длительности. Например, эффективная лазерная генерация мягкого рентгеновского излучения в диапазоне 6–8 нм получена при накачке ионов неодима цугом импульсов с энергией 250 Дж и $\lambda = 1053$ нм, длительностью отдельного импульса 200–400 пс с интервалами между импульсами 400 пс [1084]. Рентгеновские лазеры должны позволить перейти на принципиально новую технологию рентгеновской компьютерной томографии, существенно более безопасную и эффективную [295].

Завершая обзор, приведем в табл. 4.9 параметры наиболее распространенных лазеров в единицах, удобных для биомедицинских исследований [978]:

$$\begin{aligned} \nu &= 3 \cdot 10^{17} / \lambda, \text{ Гц}; & \tilde{\nu} &= \nu / c = 10^7 / \lambda, \text{ см}^{-1}; \\ h\nu &= (1986 / \lambda) \cdot 10^{-12}, \text{ эрг} & &= (1986 / \lambda) \cdot 10^{-19}, \text{ Дж} = 1240 / \lambda, \text{ эВ}; \\ N_A h\nu &= (28,5 / \lambda) \cdot 10^3, \text{ ккал/моль}; & h\nu / k &= (14,3 / \lambda) \cdot 10^6, \text{ К}, \end{aligned}$$

Таблица 4.9. Частоты излучения и энергии квантов некоторых лазеров

| Лазер | λ , нм | $\frac{n}{c} \cdot 10^3$, см ⁻¹ | $h\nu \cdot 10^{-19}$, Дж | $h\nu$, эВ | $N_A h\nu$, ккал/моль | $h\nu/k \cdot 10^3$, К |
|---------------------|-------------------|--|-------------------------------|---------------------|---------------------------|----------------------------|
| He-Ne | 543,3 | 18,4 | 3,65 | 2,28 | 52,5 | 26,3 |
| | 632,8 | 15,8 | 3,14 | 1,96 | 45,0 | 22,6 |
| | 1152,3 | 8,7 | 1,72 | 1,08 | 24,7 | 12,4 |
| | 3391,2 | 2,9 | 0,59 | 0,37 | 8,4 | 4,2 |
| Аргоновый | 351,1 | 28,5 | 5,66 | 3,53 | 81,2 | 40,7 |
| | 363,8 | 27,5 | 5,46 | 3,41 | 78,3 | 39,3 |
| | 488,0 | 20,5 | 4,07 | 2,54 | 58,4 | 29,3 |
| | 514,5 | 19,4 | 3,86 | 2,41 | 55,4 | 27,8 |
| Криптоновый | 647,1 | 15,5 | 3,07 | 1,92 | 44,0 | 22,1 |
| He-Cd | 325,0 | 30,8 | 6,11 | 3,82 | 87,7 | 44,0 |
| | 441,6 | 22,6 | 4,50 | 2,81 | 64,5 | 32,4 |
| CO ₂ | 9600 | 1,0 | 0,21 | 0,13 | 3,0 | 1,5 |
| | 10600 | 0,9 | 0,19 | 0,12 | 2,7 | 1,3 |
| СО | 5500 | 1,8 | 0,36 | 0,22 | 5,2 | 2,6 |
| Азотный | 337,1 | 29,7 | 5,89 | 3,68 | 84,5 | 42,4 |
| ArF | 193 | 51,8 | 10,29 | 6,42 | 147,7 | 74,1 |
| XeCl | 308 | 32,5 | 6,45 | 4,03 | 92,5 | 46,4 |
| XeF | 350 | 28,6 | 5,67 | 3,54 | 81,4 | 40,8 |
| Родаминовый | 600 | 16,7 | 3,31 | 2,07 | 47,5 | 23,8 |
| Рубиновый | 694,3 | 14,4 | 2,86 | 1,79 | 41,0 | 20,6 |
| Неодимовый | 1064 | 9,4 | 1,87 | 1,17 | 26,8 | 13,4 |
| Александри-товый | 760 | 13,2 | 2,61 | 1,63 | 37,5 | 18,8 |
| Гольмиевый | 2088 | 4,8 | 0,95 | 0,59 | 13,6 | 6,8 |
| Эрбиевый | 2940 | 3,4 | 0,68 | 0,42 | 9,7 | 4,9 |
| LiF-F ²⁺ | 1000 | 10,0 | 1,99 | 1,24 | 28,5 | 14,3 |
| GaAs | 830 | 12,0 | 2,39 | 1,49 | 34,3 | 17,2 |
| CH ₃ I | $1,25 \cdot 10^6$ | $8 \cdot 10^{-3}$ | $1,6 \cdot 10^{-3}$ | $9,9 \cdot 10^{-4}$ | 0,2 | $1,1 \cdot 10^{-2}$ |

где λ — длина волны, c — скорость света, см/с, h — постоянная Планка, N_A — число Авогадро, k — постоянная Больцмана.

Итак, для биомедицинских исследований и практической деятельности в области фототерапии, диагностики и лазерной хирургии имеются разнообразные лазеры и лазерные устройства, которые могут обеспечить решение многих задач медицины. Наряду с традиционно используемыми в медицине He-Ne-, Ar-, N₂-, CO₂-, АИГ:Nd-лазерами, эксимерными, лазерами на красителях интенсивно внедряются эрбиевый, гольмиевый, титан-сапфировый, александритовый, СО-лазеры и др. Перспективны в медицине полупроводниковые лазеры и твердотельные лазеры с диодной накачкой благодаря их высокой эффективности, малым габаритам и стабильности параметров излучения.

ВОЛОКОННЫЕ СВЕТОВОДЫ ДЛЯ БИОМЕДИЦИНЫ

5.1. Физика и техника волоконных световодов

В настоящее время разработано много различных типов волоконных световодов (ВС), предназначенных для решения конкретных научных и технических задач [1–3, 7, 9, 76, 310, 386, 436, 558, 997, 1069, 1070, 1114–1222]. Наиболее широкое применение, в том числе и в биологии, и в медицине, имеют диэлектрические ВС, схематически представленные на рис. 5.1. Свет по ВС распространяется за счет явления полного внутреннего отражения на границе двух диэлектриков: сердцевины ВС, имеющей диаметр $2a$ и показатель преломления n_c и оболочки, имеющей диаметр $2b$ и показатель n_0 ; $n_c > n_0$.

Распространение света в виде меридиональных (пересекающих ось световода) и косых лучей в многомодовых ВС со ступенчатым и параболическим распределениями показателя преломления по сечению сердцевины показано на рис. 5.2. Видно, что по ВС распространяются лишь те меридиональные лучи, угол падения которых на торец не превышает некоторого критического угла $\vartheta_{кр}$. Другими словами, все лучи, попадающие в конус, образующая которого составляет угол $\vartheta_{кр}$ с осью ВС, возбуждают световод. Угол $\vartheta_{кр}$ называют угловой апертурой или приемным углом ВС. Обычно для характеристики ВС используют параметр, называемый числовой апертурой:

$$NA \equiv n \sin \vartheta_{кр} = \sqrt{n_c^2 - n_0^2}, \quad (5.1)$$

где n — показатель преломления вещества, в котором находится торец световода. В отличие от меридиональных, косые лучи идут по ломаным винтовым линиям (рис. 5.2, б). Имея больший критический угол, косые лучи несколько увеличивают коэффициент пропускания ВС и его числовую апертуру.

Путем повторяющихся многократных отражений свет по ВС может распространяться на большие расстояния, поскольку при полном внутреннем отражении потери чрезвычайно малы. Однако на определенных длинах ВС свет все-таки затухает как за счет очень большого числа отражений, так и поглощения и рассеяния света в материале сердцевины.

В градиентном световоде (см. рис. 5.1, б) параболический профиль показателя преломления способствует фокусировке отдельных лучей при их распространении по ВС. Траектории лучей представляют собой синусоиды (меридиональные лучи) или винтовые линии (косые лучи). Период фокусировки градиентных ВС соответствует нескольким диаметрам сердцевины. Для типичного ВС ($\Delta n = n_c - n_0 \approx 0,02$) период фокусировки — около $10a$ [1126].

Для двуслойного ступенчатого диэлектрического волновода цилиндрического сечения число возбуждаемых мод (направляемых мод, лучей) [1115, 1123, 1126]

$$M \approx 0,5V^2, \quad (5.2)$$

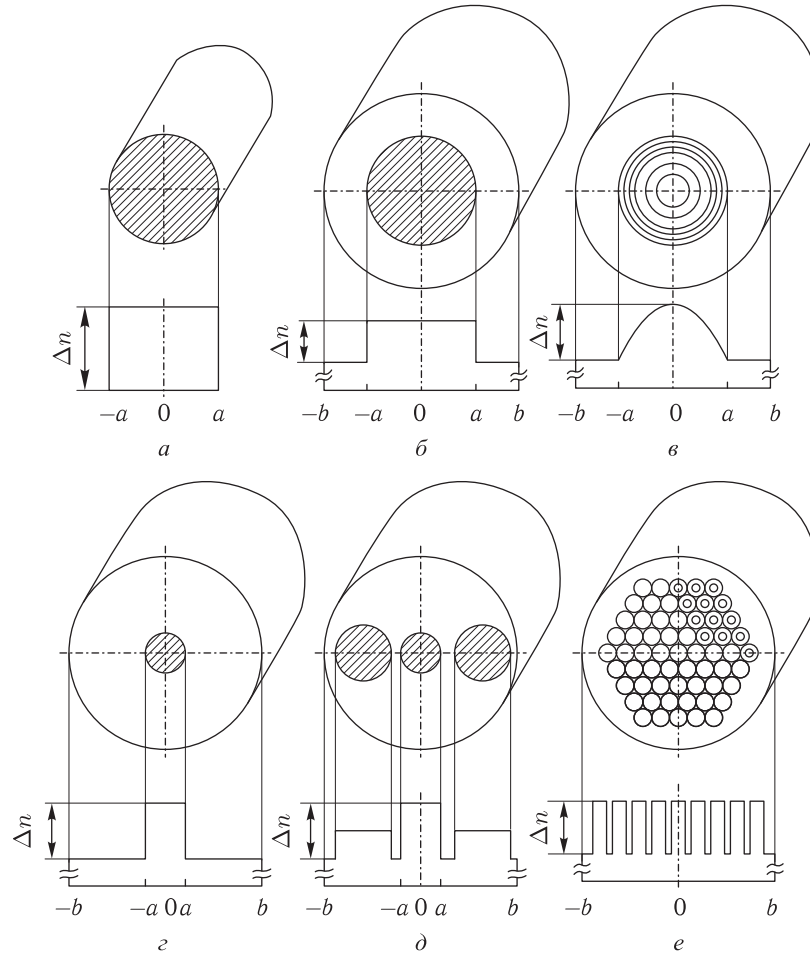


Рис. 5.1. Типы волоконных световодов: *a* — световод без оболочки; *b* — ступенчатый многомодовый световод; *v* — градиентный многомодовый световод; *z* — ступенчатый одномодовый световод; *d* — одномодовый световод с сохранением поляризации типа PANDA; *e* — волоконный жгут пучкового типа

где

$$V = \frac{2\pi a NA}{\lambda}, \quad (5.3)$$

— безразмерный параметр ВС (характеристическая частота), а режим единственной моды реализуется при $V < 2,405$ или $2a < 0,76\lambda/NA$, где λ — длина волны в свободном пространстве (или воздухе).

Для кварцевых многомодовых ВС $n_0 \approx 1,46$ и относительная разница показателей преломления $\Delta = (n_c - n_0)/n_c \leq 0,01$. Следовательно, числовая апертура ВС, находящегося в воздухе ($n \approx 1$),

$$NA \approx n_1 \sqrt{2\Delta}, \quad (5.4)$$

не должна быть больше 0,2 (обычно она составляет 0,1–0,2, что соответствует угловым апертурам $\vartheta_{кр} \approx 5,7\text{--}11,5^\circ$, для широкоапертурных медицинских ВС $\vartheta_{кр}$

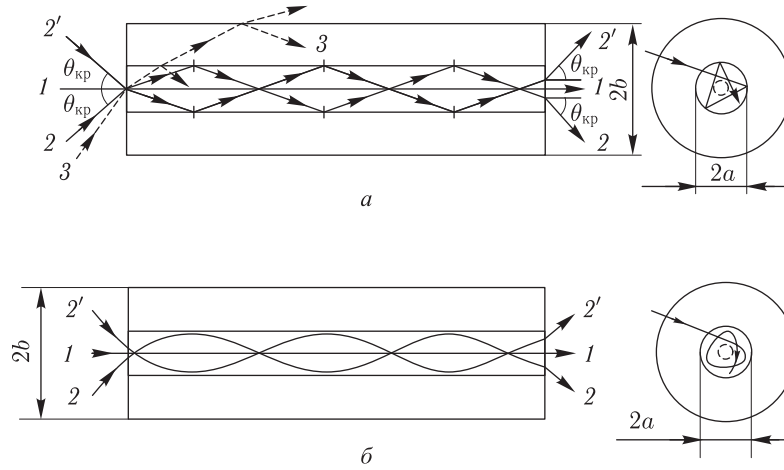


Рис. 5.2. Траектории световых лучей в многомодовых световодах со ступенчатым (а) и параболическим (б) профилями показателя преломления. Показаны меридиональные (1, 2, 2', 3) и косые (проекция на поперечное сечение) лучи

может быть существенно выше: $\vartheta_{кр} \geq 30^\circ$ ($NA \geq 0,5$). При $2a = 50$ мкм, $NA = 0,2$ и $\lambda = 632,8$ нм число одновременно возбуждаемых мод $M \approx 1250$.

В зависимости от условий ввода излучения и качества самого ВС не всегда удается возбудить все моды. Существует так называемая стационарная длина ВС $L_{ст}$, на которой происходит эффективное возбуждение всех мод ВС. Для световодов с дефектами $L_{ст}$ оказывается малой — всего несколько сантиметров, а для ВС высокого качества она достигает нескольких километров. Во многих случаях для эффективного возбуждения большого количества мод на малой длине и обеспечения независимости распределения интенсивности на выходе ВС от условий ввода излучения используют разнообразные смесители мод (создают изгибы, микроизгибы, скрутки и пр.).

Согласно [1127], при возбуждении ВС от диффузного (ламбертова) источника света пространственно-установившийся режим распространения света (возбуждение всех мод) для ВС со ступенчатым профилем имеет место при

$$L_{ст} \approx \frac{an_c}{2n \sin \vartheta_{кр}} \cdot \exp(V/2),$$

и для ВС с параболическим профилем при

$$L_{ст} \approx \frac{\pi an_c}{n \sin \vartheta_{кр}} \cdot \exp(V/2).$$

В случае типичного многомодового ВС $a = 25$ мкм, $(n/n_c) \sin \vartheta_{кр} = 0,14$; $V = 30$; $L_{ст} = 300$ м; а при $V < 10$ область неустановившегося режима занимает всего лишь несколько сантиметров.

Согласно (5.3), режим одной моды при $NA = 0,1$ и $\lambda = 632,8$ нм имеет место при $2a < 4,8$ мкм. Схематически структура одномодового световода показана на рис. 5.1, г. Следует отметить, что, несмотря на малый диаметр сердцевины, оболочка имеет примерно такой же диаметр, что и у многомодовых ВС, что дает сравнительно высокую их механическую прочность и малые потери. Одномодовые ВС на самом деле являются двухмодовыми, поскольку поле возбуждаемой в ВС низшей поперечной моды имеет два компонента с ортогональными поляризациями. Даже для

световода с круглым сечением сердцевины разность показателей преломления для волн ортогональных поляризаций ($n_{\parallel} - n_{\perp}$) приблизительно равна 10^{-9} (для прямого ВС) и $5 \cdot 10^{-9}$ (для изогнутого ВС, $r = 30$ см). Двулучепреломление характеризуется обычно так называемой длиной поляризационных биений L_p , на которой сдвиг фаз световых волн с ортогональными поляризациями меняется на 2π . Для круглого ВС $L_p = 1-10$ м. Прошедший ВС монохроматический свет может иметь любую поляризацию — линейную, круговую, эллиптическую (в зависимости от состояния исходной поляризации, длины ВС, степени его изогнутости или скрученности). Распространение немонахроматического света по ВС приводит к его деполаризации.

Заметного двулучепреломления можно добиться изменением формы сердцевины, скруткой световода, созданием механических напряжений. Существует много типов изготавливаемых промышленностью ВС с сохранением поляризации. Одним из наиболее распространенных является ВС типа PANDA, структура которого показана на рис. 5.1, д [1128, 1129]. Характерной его особенностью является наличие круглых вставок из боросиликатного стекла внутри оболочки, которые создают механические напряжения, приводящие к двулучепреломлению. Для ВС с сохранением поляризации длина поляризационных биений небольшая, $L_p = 0,2-5,0$ см, что способствует нарушению синхронизма при взаимном рассеянии волн ортогональных поляризаций на неоднородностях и, следовательно, сохранению определенной поляризации. Волокна, сохраняющие поляризацию, должны иметь $n_{\parallel} - n_{\perp} > 3 \cdot 10^{-4}$. Для ВС хорошего качества степень перекачки мощности из волны одной поляризации в другую составляет около 1% на отрезке длиной в 1 км.

Многомодовые ВС, в отличие от одномодовых, деполаризуют излучение, т. е. в целом излучение на выходном торце ВС неполяризовано. Однако в пределах отдельного спекла, образованного за счет интерференции отдельных волноводных мод, выходное излучение оказывается поляризованным. Характер поляризации от спекла к спеклу меняется случайным образом, и в целом излучение получается неполяризованным.

Кроме рассмотренных, на практике используют безоболочечные ВС (см. рис. 5.1, а) и волоконные жгуты (см. рис. 5.1, е). Безоболочечные ВС обычно изготавливают из материалов, прозрачных в средней ИК-области, для которых нет подходящего материала для изготовления оболочки. Любые загрязнения или шероховатости на поверхности таких ВС приводят к дополнительному затуханию света в них.

Исторически волоконные жгуты были первыми световодами; и до настоящего времени они эффективно используются в технике и медицине, в частности для интроскопии [7, 1115, 1122]. Жгуты изготавливаются с регулярной и нерегулярной укладкой волокон. Материалом для волокон служат многокомпонентные стекла. Между волокнами имеются светоизолирующие прослойки с более низким показателем преломления (1,43–1,52). Разработаны пучки волокон с диаметром световедущих жил 2 мкм и менее, однако на практике используют пучки многомодовых волокон с диаметром жил 5–9 мкм. Современные гибкие жгуты с регулярной укладкой имеют диаметр 0,3–3,0 мм (число волокон достигает 150 000), значительную числовую апертуру, $NA \approx 0,5-1,0$, и используются в основном для передачи изображений из труднодоступных мест. Пропускание жгутов не очень велико и обычно составляет 30–70% на один метр длины, разрешающая способность — 10–50 линий на 1 мм.

За исключением некоторых специальных случаев (при передаче среднего ИК-излучения, использовании в датчиках) все типы ВС надежно защищаются разнообразными покрытиями из полимерных материалов (полиамид, фторопласт и др.). Покрытия обеспечивают высокую прочность ВС на разрыв и изгиб, устойчивость

к воздействию агрессивных сред и высоких температур [1129]. Защитно-упрочняющие покрытия наносятся в процессе изготовления световода.

Существуют различные способы изготовления ВС [1115–1129, 1139, 1140]. При получении ВС со сверхнизкими потерями на основе кварцевых стекол используют технологию непрерывного вытягивания ВС из предварительно сделанной заготовки из сверхчистых материалов. Наиболее часто такую заготовку получают методом химического осаждения кварца с легирующими добавками из газовой фазы. Для кристаллических ВС, работающих в среднем ИК-диапазоне длин волн, освоены методы вытягивания из расплава нитевидных монокристаллов, методы пластической деформации (экструзии), прокатки и волочения поликристаллических световодов. Разработана технология получения широкоапертурных ВС типа кварц–полимер, когда при вытяжке сердцевины из кварца на нее непрерывно наносится сначала полимерное отражающее покрытие, а затем защитное. Выпускаются также дешевые и прочные пластмассовые полимерные широкоапертурные ВС, например на основе полистерола (сердцевина) и плексигласа (оболочка).

Типичные размеры сердцевины одномодовых ВС составляют 3–10 мкм, многомодовых — 50–1000 мкм. Диаметр оболочки для одномодовых и малоапертурных многомодовых ВС, $2b$, обычно равен 125 мкм. Для широкоапертурных ВС типа кварц–полимер ($2a = 200–800$ мкм) толщина отражающей оболочки — 30–70 мкм (табл. 5.1). Относительная разность показателей преломления Δ для широкоапертурных ВС типа кварц–полимер или полимерных с числовой апертурой $NA = 0,25–0,75$ составляет 10–20%, для многомодовых малоапертурных ВС — 1–2%, а для одномодовых — несколько десятых долей процента. Световоды в защитном покрытии имеют диаметр от нескольких сот микрометров до нескольких миллиметров.

Таблица 5.1. Технические характеристики широкоапертурных ВС типа кварц–полимер

| Параметры | Промышленные ВС | | Экспериментальные ВС | |
|--|-----------------|-----------------|----------------------|--------------|
| | | | | |
| Диаметр сердцевины $2a$, мкм | 200 ± 10 | 400 ± 20 | 600 ± 20 | 800 ± 20 |
| Толщина отражающего покрытия, мкм | 30–40 | 40–50 | 50 | 70 |
| Диаметр ВС в защитном покрытии, мм | $0,80 \pm 0,06$ | $1,2 \pm 0,1$ | 1,6 | 2,0 |
| Длина отрезков L , м | 600 | 250 | 450 | 150 |
| Коэффициент затухания на $\lambda = 0,85$ мкм, дБ/км | 10–20 | 6–10 | 5–6 | 5–6 |
| Числовая апертура NA | $0,25 \pm 0,02$ | $0,25 \pm 0,02$ | 0,25 | 0,25 |
| Полоса пропускания $\Delta\nu_{ВС} \cdot L$, МГц · км | 20 ± 5 | 20 ± 5 | 20 | 20 |
| Диапазон рабочих температур, °С | +80––50 | +80––50 | +80––60 | +80––60 |
| Критический радиус повреждающего изгиба, мм | 5 | 10 | 15 | 25 |
| Прочность на разрыв на длине отрезка 1 м, Н | 150 ± 50 | 350 ± 80 | 500 | 700 |

При доставке излучения к биообъекту и обратно важной характеристикой ВС является пропускание в заданном диапазоне длин волн, которое зависит от ряда причин: во-первых, возможности эффективного ввода лазерного излучения в ВС

(для данной длины волны зависит от числовой апертуры ВС, диаметра его сердцевины, расходимости и степени пространственной когерентности источника излучения); во-вторых, прозрачности самого ВС, которая определяется собственным поглощением материала световода (электронным и колебательным), поглощением примесных веществ (для кварцевых световодов — ионы металлов переходной группы и гидроксильные группы), рэлеевским рассеянием на различных неоднородностях, технологическими разбросами параметров ВС, потерями на микроизгибах, скрутках, потерями за счет проникающей радиации, деградации ВС в процессе эксплуатации (микротрещины, скрытые разрывы, разрушение и загрязнение торцов), различными нелинейными явлениями [1115–1129].

Благодаря использованию сравнительно коротких отрезков ВС, их прозрачность в ближней УФ-, видимой и ближней ИК-областях спектра оказывается вполне достаточной для многих биомедицинских исследований, и на первый план выдвигаются потери эксплуатационные — за счет неэффективности ввода излучения, наличия крутых изгибов, микроизгибов, скрытых микротрещин и разрывов. Для количественной оценки потерь обычно используется принятое в технике связи так называемое удельное затухание (коэффициент затухания), дБ/км или дБ/м,

$$\alpha = \frac{1}{L} 10 \lg(P_1/P_2),$$

где $P_{1,2}$ — мощность на входе и выходе ВС. Методы измерения потерь ВС можно, например, найти в [558, 1130].

Предельные характеристики пропускания в ближней ИК-области спектра получены для кварцевых одномодовых ВС: при $\lambda = 1,3$ и $1,55$ мкм потери соответственно равны $0,291$ и $0,154$ дБ/км [1119] (рис. 5.3). Спектры оптических потерь для широкоапертурных ВС типа кварц–полимер представлены на рис. 5.4. Там же для сравнения дан график предельных потерь для ВС типа кварц–кварц. Пики затухания на $\lambda = 0,95$, $1,27$ и $1,37$ мкм обусловлены обертовыми линиями поглощения гидроксильных групп ОН, подъем в области коротких длин волн — электронным поглощением и рэлеевским рассеянием, а подъем в ИК-области при $\lambda > 1,6$ мкм — колебательным поглощением решетки и крылом основного пика поглощения гидроксильных групп. Минимальные потери полимерных ВС в видимой области находятся на уровне $0,1$ – $0,2$ дБ/м [1124].

Как уже отмечалось, важным источником потерь в ВС являются как микроизгибы, возникающие за счет локальных механических воздействий на ВС, так и крутые изгибы — повороты световода на большие углы (90° – 180°). С другой стороны, измерение потерь, обусловленных свойствами окружающей изогнутый световод среды, является основой для датчиков давления, температуры, показателя преломления, в том числе и медицинского назначения. На рис. 5.5 показан ход лучей в ВС с крутым изгибом. Хорошо видно, что в зависимости от радиуса изгиба свет может покидать сердцевину при невыполнении условий полного внутреннего отражения (луч 2), а в тех случаях, когда разница показателя преломления оболочки и окружающей среды невелика, а изгиб достаточно крутой, покидать световод совсем (луч 5).

Обычно вводят два характерных радиуса крутого изгиба, $r_{1кр}$ и $r_{2кр}$, первый соответствует полному выходу излучения из сердцевины в оболочку, а второй — отсутствию такого выхода, т. е., изменяя радиус изгиба ВС от $r_{2кр}$ до $r_{1кр}$, можно плавно регулировать интенсивность света в сердцевине. В области $r \geq r_{1кр}$ для ступенчатого ВС интенсивность света в сердцевине [1131]

$$I = I_0(1 - r_{1кр}/r)^{1/2}, \quad (5.5)$$

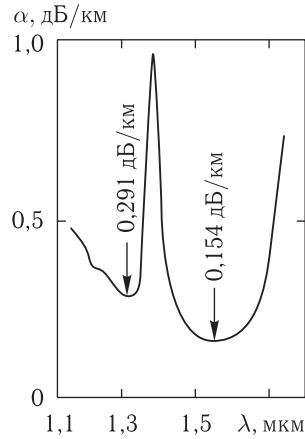


Рис. 5.3. Спектр оптических потерь одномодового ВС [1119]

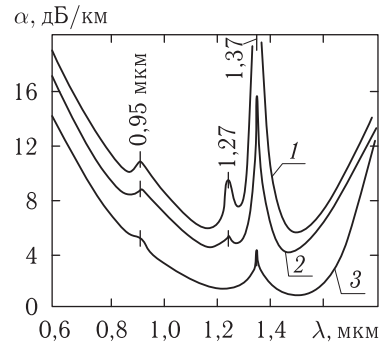


Рис. 5.4. Спектры оптических потерь широкоапертурных ВС: 1, 2 — типа кварц-полимер для двух марок кварцевого стекла; 3 — типа кварц-кварц [1129]

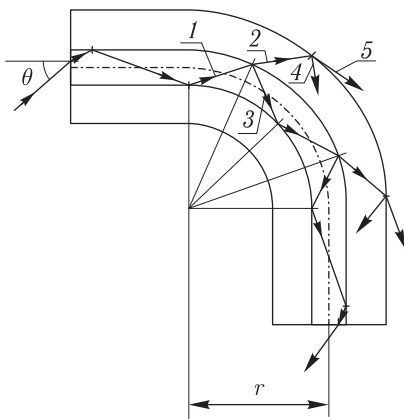


Рис. 5.5. Траектории световых лучей в ступенчатом ВС с крутым изгибом

где I_0 — интенсивность падающего излучения; $r_{1кр} = n_0\delta/(n_c - n_0)$; δ — расстояние, на котором значение n меняется от n_c до n_0 . В области $r \leq r_{2кр}$ интенсивность света в сердцевине [1132]

$$I = I_0 \left[1 - \frac{n_0}{n_c} \left(1 - \frac{r}{r_{2кр}} \right) \right], \quad (5.6)$$

где $r_{2кр} = 2an_0/(n_c - n_0)$. Например, для ВС с $n_c = 1,466$, $n_0 = 1,458$, $2a = 50$ мкм и $\delta = 5$ мкм, $r_{1кр} \approx 0,9$ мм, $r_{2кр} \approx 9,1$ мм.

Степень пропускания ВС зависит от показателя преломления $n(\lambda)$ и поглощения $\alpha(\lambda)$ окружающей световод среды в области крутого изгиба, что определяет потери мощности, которые при $r = r_{1кр}$ могут достигать 100% ($n(\lambda) = n_0$), дает возможность контролировать параметры $n(\lambda)$ и $\alpha(\lambda)$ [1131]. Критический радиус $r_{1кр}$ изменяется примерно от одного миллиметра для многомодовых ВС до нескольких сантиметров для одномодовых. Следует отметить, что эти значения обычно лежат ниже критических радиусов изгибов, приводящих к повреждению ВС (см. табл. 5.1), поэтому крутые изгибы делают по специальной технологии, например путем лазерного локального проплавления ВС с предварительно снятым покрытием. Для изогнутых ВС числовая апертура уменьшается. Из геометрических построений (рис. 5.5) следует, что [1130]

$$NA = [n_c^2 - n_0^2(1 + a/r)^2]^{1/2}.$$

Распространение светового импульса (или модулированного излучения) по световоду приводит к уширению и деформации импульса (или сужению полосы частот модуляции прошедшего света), что ухудшает информационно-пропускную способ-

ность ВС, которая определяется дисперсионными свойствами световода (дисперсией материала, волноводной и межмодовой дисперсией) [558, 1136, 1137]. Использование пикосекундных и субпикосекундных, а также высокоскоростных модуляционных (до 20 ГГц) методов лазерной спектроскопии биотканей [1, 3] влечет за собой необходимость контроля параметров дисперсии ВС.

Информационно-пропускная способность ВС характеризуется комплексной передаточной функцией [558, 1121]:

$$G(\omega) = |G(\omega)| \exp[j\varphi(\omega)],$$

где $|G(\omega)|$ — модуль передаточной функции; $P_2(\omega) = G(\omega)P_1(\omega)$, $P_{1,2}(\omega)$ — спектры световой мощности на входе и выходе ВС, ω — частота спектральной составляющей оптического сигнала; $\varphi(\omega)$ — фазовый угол, который обычно изменяется в пределах $\pm\pi$ на длине в 1 км.

Ширина полосы пропускаемых ВС частот рассчитывается в виде удельной полосы на единицу длины ВС $(\Delta\omega_{\text{ВС}}/2\pi)L$, МГц · км. Полоса $\Delta\omega_{\text{ВС}}$ тем уже, чем больше длина световода.

Для одномодовых ВС характерны дисперсия материала и волноводная дисперсия, которые обычно объединяют под общим названием внутримодовой, или хроматической, дисперсии. Время распространения моды по ВС длиной L [558]

$$t = L(d\beta/d\omega) = -L(\lambda^2/2\pi c)(d\beta/d\lambda), \quad (5.7)$$

где β — постоянная распространения моды; λ — длина волны излучения; c — скорость света в свободном пространстве.

Для источников света с конечной спектральной шириной $\delta\lambda$ возникает дисперсия времени распространения моды:

$$\delta t = -\frac{L}{2\pi c} \left(2\lambda \frac{d\beta}{d\lambda} + \lambda^2 \frac{d^2\beta}{d\lambda^2} \right) \delta\lambda. \quad (5.8)$$

В общем случае постоянная распространения β является функцией показателя преломления n на оси световода, относительной разницы Δ показателей преломления сердцевинки и оболочки, длины волны света и отношения радиуса сердцевинки к длине волны a/λ . Зависимость $n(\lambda)$ определяет дисперсию материала, а зависимость β от a/λ — волноводную дисперсию.

Хотя рассматриваемые виды дисперсии не являются независимыми, для получения оценочных значений они вычисляются отдельно (одна при отсутствии другой). В предположении, что световой импульс представляет собой плоскую волну и распространяется в среде с показателем преломления n , групповая задержка, обусловленная дисперсией материала ($\beta = 2\pi n/\lambda$),

$$t_{\text{мд}} = (L/c) \left(n - \lambda \frac{dn}{d\lambda} \right), \quad (5.9)$$

а расширение светового импульса на длине L

$$\delta t_{\text{мд}} = (L/c) \lambda \left| \frac{d^2n}{d\lambda^2} \right|_{\lambda=\lambda_0} \delta\lambda, \quad (5.10)$$

где вторая производная берется вблизи длины волны излучения λ_0 .

В случае волноводной дисперсии

$$\delta t_{\text{вд}} = -(L/2\pi c) V^2 \left| \frac{d^2\beta}{dV^2} \right| \delta\lambda, \quad (5.11)$$

где V — характеристический параметр световода, определяемый соотношением (5.3).

В одномодовых ВС вклады волноводной дисперсии и дисперсии материала в общую хроматическую дисперсию оказываются сравнимыми по величине, а в определенной области длин волн могут иметь равные значения, но противоположные знаки, что приводит к их взаимной компенсации. Материальная дисперсия чистого кварца меняет свой характер (знак) на длине волны $\lambda_0 = 1,27$ мкм (рис. 5.6) [1137]. Легирование кварца двуокисью германия смещает λ_0 в пределах 1,27–1,39 мкм. Вблизи перехода материальной дисперсии кварца через ноль и происходит взаимная компенсация волноводной и материальной дисперсии, которая наиболее эффективна в области длин волн 1,3–1,6 мкм (рис. 5.6, б). Некоторую роль во взаимной компенсации рассматриваемых видов дисперсии может играть и так называемая дисперсия профиля, которая обусловлена зависимостью относительной разницы показателей преломления от длины волны, $\Delta(\lambda)$ [1137]. Достижимые значения удельной хроматической дисперсии в этой области частот не превышают $\delta = (\delta t / \delta \lambda) / L \approx \pm 1$ пс/(нм · км) [558].

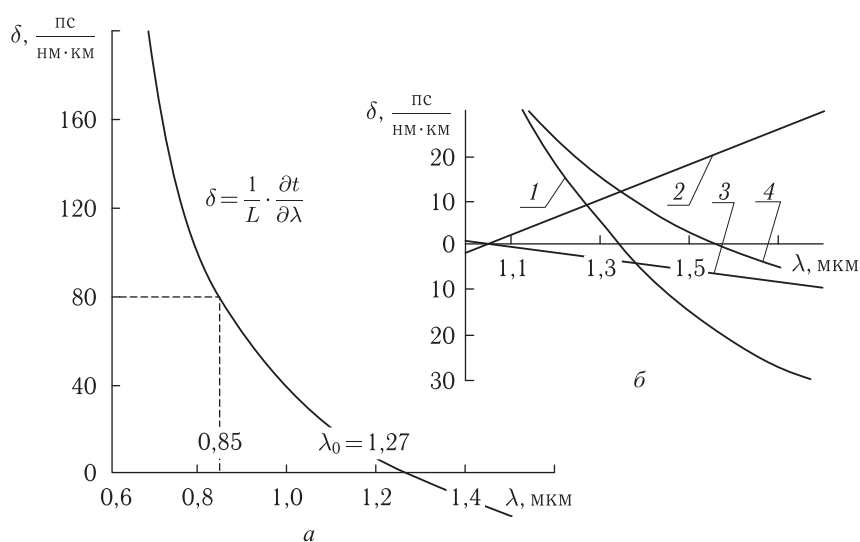


Рис. 5.6. Зависимости коэффициентов дисперсии (удельная дисперсия) от длины волны: *a* — материальная дисперсия для чистого кварца; *б* — ступенчатый одномодовый ВС с сердцевинной диаметром 4 мкм из кварца, легированного GeO_2 , и оболочкой из чистого кварца (1 — материальная дисперсия; 2 — волноводная дисперсия; 3 — «дисперсия профиля»; 4 — суммарная дисперсия) [1137]

Межмодовая дисперсия многомодовых световодов обусловлена различиями групповых скоростей направляемых мод, или — на языке геометрической оптики — оптических длин путей лучей, распространяющихся под разными углами. Межмодовая дисперсия существует и для идеально монохроматического источника света. Ее значение определяется характером распределения профиля показателя преломления сердцевин и связью мод на неоднородностях. Типичное значение межмодовой дисперсии для ступенчатого световода с параметрами $n_c = 1,5$, $\Delta = 1\%$ составляет 50 нс/км, т. е. дополнительное уширение светового импульса при распространении по многомодовому световоду длиной в 1 м оказывается весьма значительным, 50 пс, сравнимым с уширением в биоткани, что необходимо учитывать при построении оптических томографических схем с временным разрешением.

Специальным выбором профиля показателя преломления сердцевин за счет выравнивания длин путей отдельных лучей (периодической фокусировки) можно су-

щественно снизить межмодовую дисперсию (до 10^3 раз), соответственно градиентные многомодовые световоды (см. рис. 5.1, в, 5.2, б), имеющие параболический (квадратический) характер зависимости n от поперечной координаты, обладают значительной полосой пропускания ($270\text{--}1900$ МГц · км для промышленных ВС) [1147], т. е. при длине световода в 1 м полоса модулирующих частот интенсивности транспортируемого света может достигать $2 \cdot 10^3$ ГГц, что существенно превышает потребности биомедицинских приложений при использовании фазового модуляционного метода спектроскопии и томографии [1, 3] (см. главу 2).

Методы измерения дисперсии ВС, используемые в высокоскоростных информационных линиях связи, в датчиках и преобразователях световых импульсов, описаны в [558, 1130].

Как уже отмечалось, в ряде случаев нелинейные явления уменьшают пропускание ВС, что связано с расходом энергии на поддержание нелинейных процессов [1115, 1116]. С другой стороны, нелинейные эффекты лежат в основе работы волоконных лазеров и компрессоров импульсов.

Для изотропного материала сердцевины ВС первый компонент нелинейной составляющей показателя преломления обусловлен кубической нелинейностью, т. е. возникает при взаимодействии трех полей:

$$P^{(3)} = \varepsilon_0 \chi^{(3)} \mathbf{E}\mathbf{E}\mathbf{E},$$

где $P^{(3)}$ — нелинейная кубическая поляризуемость среды; ε_0 — диэлектрическая проницаемость вакуума; $\chi^{(3)}$ — кубическая восприимчивость среды. Показатель преломления сердцевинки может быть представлен в виде двух компонентов — линейного n_1 и нелинейного $n_{\text{нл}}$:

$$n_{\text{с}} = n_1 + n_{\text{нл}}, \quad n_{\text{нл}} = N_{\text{нл}} I, \quad (5.12)$$

где I — интенсивность света.

Для плавленого кварца $N_{\text{нл}} \approx 5 \cdot 10^{-16}$ см²/Вт [1116], что является незначительной величиной, но благодаря малому диаметру сердцевинки одномодовых ВС и значительной их прозрачности можно на достаточно больших длинах иметь высокую плотность мощности, до 10^{10} Вт/см², и «накопить нелинейность» в процессе распространения лазерного излучения. В ВС наблюдаются разнообразные нелинейные явления, в том числе явление вынужденного комбинационного рассеяния (ВКР), которое имеет место при мощности лазера в несколько сотен милливатт и лежит в основе так называемых волоконных ВКР-лазеров, работающих в ближней ИК-области спектра. Для достаточно узкополосных лазеров ($\Delta\nu \ll 1$ МГц) доминирующим нелинейным процессом оказывается вынужденное рассеяние Манделъштама–Бриллюэна (ВРМБ), оно и определяет предельные значения выходной мощности при распространении света по длинным ВС (несколько километров). Поскольку показатель преломления материала световода зависит от интенсивности света, то при распространении короткого (с широким спектром) импульса происходит фазовая самомодуляция и, следовательно, дополнительное уширение спектра. При условии, что средняя длина волны импульса лежит в области аномальной дисперсии материала световода, а $n_{\text{нл}} > 0$, световой импульс при своем распространении будет сжиматься [1115, 1125]. Предельное значение такого сжатия определяется результирующей шириной спектра излучения $\tau \sim 1/\Delta\omega$.

В связи с потребностями лазерной технологии, включая и решение медицинских задач, активно разрабатываются волоконные световоды, прозрачные в средней ИК-области спектра до 22 мкм [7, 1114, 1120, 1128, 1140–1143], способные передавать мощное излучение СО- (5–6 мкм) и СО₂- (9–11 мкм) лазеров в хирургии,

а также получать ИК-изображения и контролировать температуру труднодоступных органов, осуществлять ИК-спектроскопию веществ внутри тела человека.

ИК-световоды изготавливают из галогенидных кристаллов, халькогенидных стекол и стекол на основе фторидов тяжелых металлов. Волоконные световоды на основе халькогенидных стекол (ХВС), прозрачные вплоть до 12–20 мкм, имеют потери менее 1 дБ/м в диапазоне длин волн 2–6,5 мкм. Изготавливают как безоболочечные ВС, так и с полимерным покрытием. В первом случае лучше спектральные характеристики (окна прозрачности в диапазонах 7–10 мкм и 10–12 мкм), а во втором — эксплуатационные [1120]. Диаметр сердцевины ХВС составляет обычно 300–1000 мкм. Поскольку числовая апертура для ХВС очень большая (близкая к единице), то возбуждение ВС удобнее характеризовать длиной установления стационарного распределения мод $L_{ст}$ и эффективной числовой апертурой $(NA)_{эф}$ при облучении торца световода параллельным пучком при различных углах ввода. Для ХВС с фторопластовым покрытием и длиной $L = 14$ м $L_{ст} > 10$ м, а $(NA)_{эф}$ (по уровню 50% распространяющейся мощности) составляет примерно 0,276, что соответствует углу $\vartheta_{кр}$ в воздухе около 16° и 6° внутри ВС [1120].

Непокрытый ХВС диаметром 1 мм (из стекла системы As–S) в периодическом и импульсном режимах способен передавать излучение СО-лазера мощностью 40 и 60 Вт. Разработан кабель с сердцевиной из $Ge_5As_{38}Se_{57}$, диаметром около 0,6 мм, с покрытием из фторопласта, имеющий потери в диапазоне 4–6 мкм на уровне 0,5–0,8 дБ/м и передающий непрерывное излучение СО-лазера мощностью 7–9 Вт в течение нескольких часов [1120]. Минимальное затухание в ХВС на $\lambda = 2,4$ мкм составляет 35 дБ/км.

С точки зрения медицинских применений, главными недостатками ХВС являются токсичность, водорастворимость и сравнительно малая мощность передаваемого лазерного излучения. Они перспективны для некоторых технологических процессов, дистанционного контроля температуры и передачи ИК-изображений.

Волоконные световоды на основе фторидов тяжелых металлов (ФВС) прозрачны лишь на длинах волн до 8 мкм, поэтому не могут быть использованы в хирургии с применением CO_2 -лазера. Представляют определенные трудности при работе с такими ВС их неудовлетворительные механические свойства и гигроскопичность, но чрезвычайно высокая прозрачность ФВС на более коротких длинах волн делает их все-таки перспективными для целей биологии и медицины, в том числе и с использованием АИГ:Ег-лазера с $\lambda = 2,94$ мкм. Обычно для ФВС применяют фторцирконатные, фторгафнатные и бариево-ториевые стекла. Разработаны ФВС длиной 7–30 м с оптическими потерями от 0,7 до 0,9 дБ/км на $\lambda = 2,5$ мкм. Перспективны ФВС также для ИК-спектроскопии веществ в труднодоступных местах организма человека и создания волоконных лазеров среднего ИК-диапазона.

Монокристаллические ВС из сапфира (Al_2O_3) нетоксичны и негигроскопичны, имеют высокую температуру плавления [1140]. Методом вытягивания из расплава могут быть изготовлены ВС длиной 7–8 м. Сапфировые ВС, полученные путем вытягивания из нагретой заготовки, имеют потери около 0,9 дБ/м на $\lambda = 2,94$ мкм. Главным недостатком сапфировых ВС является их жесткость.

В настоящее время лучшими поликристаллическими световодами, прозрачными в широкой области спектра, 2,5–20,0 мкм, являются ВС на основе галогенидов серебра и таллия [7, 1114, 1120, 1128, 1140, 1142, 1143]. Для ВС, изготовленных методом экструзии, получены минимальные потери на $\lambda = 10,6$ мкм на уровне 0,12–0,35 дБ/м. ВС длиной несколько метров при диаметре 1 мм способен передать непрерывное излучение мощностью 50–100 Вт. Однако ВС на основе галогенидов таллия токсичны и не очень удобны в эксплуатации (растворимы, хрупки), поэтому

вряд ли найдут широкое применение в медицине. С другой стороны, ВС на основе галогенидов серебра (ВСГС) при хороших оптических свойствах не токсичны, не растворяются в воде, достаточно гибки, что делает их весьма перспективными для медицины.

Проблемы эффективного возбуждения и пропускания света ВС важны и при работе с малоинтенсивным излучением (при приеме отраженного или рассеянного биообъектами лазерного излучения или при оптимизации работы некоторых типов волоконно-оптических датчиков). Для многомодовых ВС эффективность ввода излучения в них характеризуется отношением части мощности источника света, переносимой всеми направляющими лучами (модами) P_n , к полной мощности источника во всех направлениях в пределах площади сечения сердцевинны $P_{\text{общ}}$. При диффузном возбуждении ВС (которое происходит внутри биологической ткани, освещаемой лазерным пучком (см. главы 1 и 2)) [1127]

$$\varepsilon = P_n/P_{\text{общ}} = \sin \vartheta_{\text{кр}} \quad (5.13)$$

для ВС со ступенчатым профилем показателя преломления сердцевинны,

$$\varepsilon = 0,5 \sin \vartheta_{\text{кр}} \quad (5.14)$$

для градиентного ВС с параболическим профилем. При возбуждении коллимированным пучком ступенчатого ВС

$$\begin{cases} \varepsilon = 1, & 0 \leq \vartheta < \vartheta_{\text{кр}}, \\ \varepsilon = 0, & \vartheta_{\text{кр}} < \vartheta \leq \pi/2, \end{cases} \quad (5.15)$$

градиентного с параболическим профилем

$$\begin{cases} \varepsilon = 1 - \sin \vartheta / \sin \vartheta_{\text{кр}}, & 0 \leq \vartheta < \vartheta_{\text{кр}}, \\ \varepsilon = 0, & \vartheta_{\text{кр}} < \vartheta \leq \pi/2. \end{cases} \quad (5.16)$$

При возбуждении ВС коллимированным пучком света, диаметром $2w$, с помощью линзы с фокусным расстоянием f увеличивается часть мощности источника, передаваемая направляемым модам, следовательно увеличивается эффективность ввода излучения. Для ступенчатого ВС при $f \geq w \operatorname{ctg} \vartheta_{\text{кр}}$ эффективность ввода увеличивается в $(w/a)^2$ раз по сравнению с вводом без линзы. При косом падении пучка не все лучи направляются световодом и эффективность возбуждения ухудшается. Использование линзы при диффузном освещении не позволяет увеличить эффективность ввода излучения [1127].

В случае одномодового ВС согласование лазерного пучка с соответствующей модой ВС играет решающую роль. Для гауссова лазерного пучка отношение части мощности пучка, распространяющейся в основной моде, к полной мощности пучка имеет вид [1127]

$$\frac{P_0}{P} = 4 \left[\frac{wr_0}{w^2 + r_0^2} \right]^2, \quad (5.17)$$

где $r_0 = a/(2 \ln V)^{1/2}$ — размер (радиус) пятна основной моды ВС. Видно, что только при полном согласовании размеров лазерного пучка w и моды ВС вся мощность распространяется в основной моде, $w = r_0$.

Для одномодового пучка света эффективность возбуждения основной моды ВС всегда меньше единицы [1127]:

$$\frac{P_0}{P} = 4 \left(\frac{r_0}{w} \right)^2 [1 - \exp(-w^2/2r_0^2)]^2. \quad (5.18)$$

Так, при $w = 1,6r_0$ максимальная эффективность возбуждения основной моды достигает 81 %.

Формулы (5.13)–(5.18) записаны без учета френелевского отражения от входного торца ВС, которое для $n_c = 1,5$ и $n = 1$ составляет 4 % от падающей мощности.

На рис. 5.7 и 5.8 показаны некоторые варианты схем возбуждения ВС коллимированным пучком света газоразрядного (или твердотельного) лазера или сильно расходящимся пучком полупроводникового лазера, который благодаря очень малой излучающей площади является источником, близким к точечному.

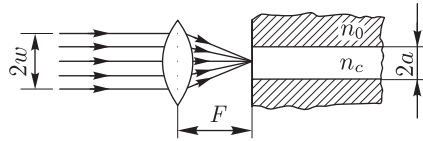


Рис. 5.7. Возбуждение ВС коллимированным пучком света диаметром $2w$ с помощью собирающей линзы с фокусным расстоянием F

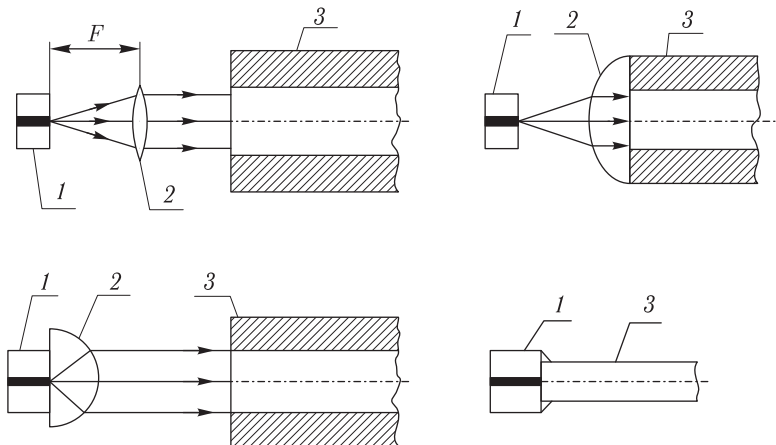


Рис. 5.8. Некоторые варианты ввода излучения полупроводникового лазера (или светодиода) в волоконный световод: 1 — лазер (или светодиод); 2 — линзовый элемент; 3 — световод

Кроме традиционных линз, объективов и микролинз для передачи света в волоконно-оптических системах используют также волоконно-оптические элементы, которые позволяют уменьшить или увеличить угловую расходимость излучения или сфокусировать пучок. На рис. 5.9 изображены два элемента — фокон и селфок-линза. В зависимости от направления падающего на фокон излучения (с широкого или узкого торца) он может расширять или сужать диаграмму направленности точечного источника (полупроводникового лазера или светодиода). Селфок-линза представляет собой небольшой отрезок градиентного ВС, равный длине фокусировки коллимированного пучка, и является плоскопараллельным линзовым элементом, удобным для конструирования компактных волоконно-оптических систем. Числовая апертура селфок-линз достигает 0,45. В качестве микролинз используются также стеклянные стержни, у которых показатель преломления изменяется по линейному закону в продольном направлении. Существуют пластиковые цилиндрические микролинзы, а также микролинзы из стекол с добавкой серебра для УФ-диапазона длин волн.

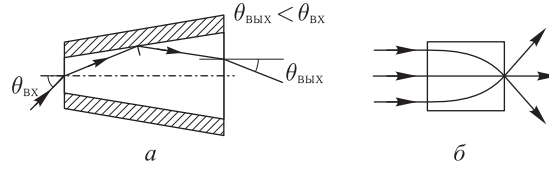


Рис. 5.9. Волоконно-оптические элементы: *а* — фокон; *б* — градиентная стержневая линза (селфок-линза)

Некоторые типичные волоконно-оптические устройства показаны на рис. 5.10. Два из них на основе сферических и селфок-линз служат для стыковки ВС. Два других решают задачи разъединения и объединения световых пучков одной и разных длин волн. Они сконструированы на основе селфок-линз. Принцип действия устройств ясен из хода лучей, показанного на рисунке, который в данном случае соответствует режиму деления. Обращение хода лучей дает режим объединения разных пучков. Разработаны и выпускаются промышленностью специальные разъемы для надежной стыковки ВС [1123–1125].

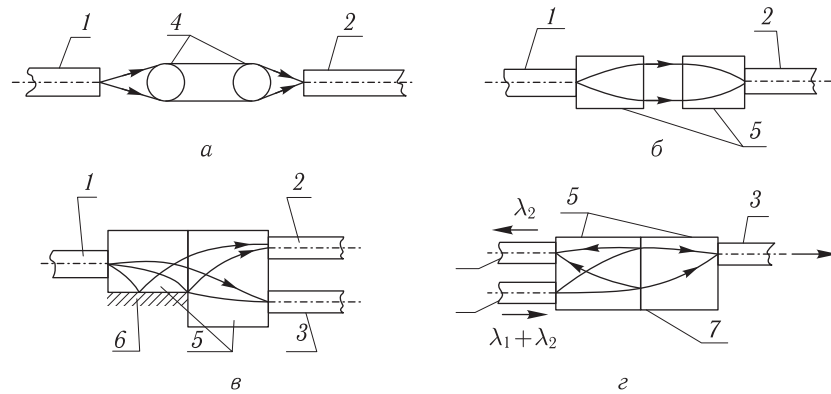


Рис. 5.10. Волоконно-оптические устройства: *а, б* — устройства стыковки ВС; *в* — делитель (разветвитель); *г* — устройство спектрального деления (или объединения). 1, 2, 3 — световоды; 4 — сферические линзы; 5 — градиентные стержневые линзы; 6 — зеркало; 7 — интерференционный фильтр, пропускающий излучение с λ_1 и отражающий излучение с λ_2

Отметим, что практические работы с волоконно-оптическими устройствами, разработка и конструирование новых устройств требуют особой тщательности исследователя, поскольку из-за малости длины волны света и геометрических размеров этих устройств они очень чувствительны к различным возмущениям механической, акустической и тепловой природы. Уровень нестабильности интенсивности и длины волны излучения в системе ВС — возбуждающий лазер (см. рис. 5.8) определяется нестабильностью оптической длины пути между торцом ВС и излучающей поверхностью. При одинаковом уровне внешних возмущений оказывается возможным путем оптимизации устройства связи добиться минимальных флуктуаций излучения при достаточно высоком уровне ввода излучения в одномодовый ВС. Соответствующие данные для шести типов различных устройств связи инжекционного полупроводникового лазера и одномодового ВС (7/125) приведены в табл. 5.2 [991]. Наилучшие результаты получаются для устройства связи, выполненного в виде вытянутого конуса длиной 15 мкм на торце ВС; при этом необходима высокая точность установки вытянутого конуса относительно лазера как по продольной (z), так и поперечным (x, y)

координатам. В то же время плоский торец допускает почти в два раза более грубую установку по всем трем координатам, однако все остальные параметры существенно хуже. Лишь небольшая настройка требуется для системы с двумя селфок-линзами (рис. 5.10, б), которая имеет минимальный уровень флуктуаций интенсивности, однако и малую эффективность возбуждения ВС (всего 46%).

Таблица 5.2. Зависимость эффективности возбуждения одномодового ВС (7/125) при различных конструкциях устройства связи

| Элемент связи | Оптимальное расстояние, z_0 , мкм | Эффективность возбуждения, P_0/P , % | Допуски, мкм | | | Относительные флуктуации мощности, $\delta P/P$, % | Сдвиг длины волны, $\Delta\lambda$, нм |
|------------------------------|-------------------------------------|--|--------------|------------|-----------|---|---|
| | | | x | y | z | | |
| Плоский торец ВС | 10 | 21 | $\pm 1,1$ | $\pm 0,9$ | $\pm 8,7$ | 73 | 4,9 |
| Закругленный торец ВС | 5–10 | 22,5 | $\pm 1,0$ | $\pm 0,9$ | $\pm 7,9$ | 68 | 3,2 |
| Микролинза на торце ВС | 10 | 59 | $\pm 0,6$ | $\pm 0,35$ | $\pm 4,2$ | 20 | 1,1 |
| Травленный конус на торце ВС | 5–10 | 63 | $\pm 0,6$ | $\pm 0,4$ | $\pm 4,0$ | 34 | 0,63 |
| Вытянутый конус на торце ВС | 30–50 | 66 | $\pm 0,7$ | $\pm 0,4$ | $\pm 6,6$ | 7 | 0,22 |
| Две селфок-линзы на торце ВС | 300 | 46 | $\pm 1,4$ | $\pm 1,3$ | ± 20 | 0,5 | 0,79 |

Для многомодовых световодов серьезным источником флуктуаций является так называемый модовый шум [558, 1116]. Причина его возникновения заключается в том, что при возбуждении ВС когерентным светом в результате интерференции большого числа мод на выходе формируется спекл-картина, которая чрезвычайно чувствительна к различным возмущениям световода: температурным, механическим, акустическим. Если в системе возникает пространственная фильтрация, например, световод неидеальным образом состыкован с другим световодом в продольном направлении, имеют место потери на микроизгибах; или если на пути до приемника излучения стоит апертурный ограничитель, то любое возмущение спекл-картины приведет к нестабильности передаваемой мощности. Коэффициент преобразования на неоднородности зависит от длины волны излучения лазера; характерный масштаб этой зависимости определяется дисперсией световода. Следовательно, нестабильности частоты (длины волны) источника также приводят к модовому шуму. На уровень модового шума существенно влияет ширина спектра источника, число мод лазера и длина световода [558].

При высокой степени когерентности излучения модовый шум оказывается значительным даже для очень длинных световодов. Для некогерентных источников света спекл-структура не формируется и модовые шумы отсутствуют. Для когерентных источников низкочастотные модовые шумы можно подавить путем принудительной фазовой модуляции распространяющегося по ВС света, осуществляемой с помощью пьезокерамического цилиндра, раскачиваемого на частотах 9–14 кГц [558].

Модовые шумы существуют также в одномодовых ВС [558]. Причиной их возникновения являются эффекты разделения и фильтрации мод источника излучения в самом световоде, приводящие к перераспределению флуктуаций в отдельных модах проходящего излучения, а также интерференция между LP_{01} - и LP_{11} -модами на

неоднородностях линии передачи. Действенным методом борьбы с шумами является использование одночастотных стабилизированных лазеров и прокладка световодов с изгибами, на которых происходит сильное поглощение паразитной моды LP_{11} .

Источниками дополнительных флуктуаций излучения, распространяющегося в одномодовых ВС, являются разнообразные поляризационные эффекты, механизм действия которых аналогичен процессам в многомодовых ВС, так как две волны ортогональных поляризаций могут быть рассмотрены как две моды. Поскольку состояние поляризации зависит от длины волны, неоднородности материала ВС и внешних возмущений, то при наличии селекции по поляризации в передающей линии возникают дополнительные шумы.

Степень двулучепреломления оказывается существенным фактором, определяющим реакцию ВС на возмущения параметров и характер спектра источника излучения. Чем слабее двулучепреломление ВС, тем выше чувствительность степени поляризации света в нем к локальному нагреву и изменению ширины спектра источника света [558].

5.2. Медицинские волоконные световоды и облучатели биотканей

В зависимости от характера решаемой задачи все типы световодов могут быть использованы в биомедицинских исследованиях: одномодовые и многомодовые малоапертурные ВС, применяемые в разнообразных физических, химических и биохимических датчиках контроля состояния биообъекта, а также многомодовые широкоапертурные ВС и жгуты, служащие для передачи высокоинтенсивного и низкоинтенсивного лазерного излучения к труднодоступным органам и обратно. По этим признакам вряд ли следует делить световоды на медицинские и немедицинские. Тем не менее, к медицинским ВС обычно относят все типы световодов, обладающих нетоксичностью, возможностью стерилизации дистального конца, достаточной гибкостью, высокой прозрачностью на сравнительно коротких длинах (1–10 м), малой степенью лучевой деградации. Как правило, медицинские ВС являются сравнительно широкоапертурными, $2a = 100\text{--}1000$ мкм.

В медицине используется лазерное излучение различных длин волн, от глубокого УФ до далекого ИК. Кварцевые ВС имеют высокую прозрачность в ближней ИК-области спектра и являются идеальными световодами для передачи излучения неодимовых лазеров ($\lambda = 1060$ нм) и полупроводниковых (700–980 нм), используемых в эндоскопии. Затухание излучения с $\lambda = 1060$ нм для ВС из кварцевого стекла КУ-1 оказывается меньше 6 дБ/км (см. рис. 5.4), что позволяет в течение нескольких часов пропускать через ВС диаметром 400 мкм излучение средней мощностью до 40 Вт без каких-либо ухудшений его оптических свойств [1129].

Особый интерес для медицины представляют два диапазона длин волн: УФ ($\lambda \leq 300$ нм), где работают импульсные эксимерные лазеры, и ИК ($\lambda \geq 2$ мкм), где работают импульсные и непрерывные лазеры (гольмиевый, эрбиевый), СО- и СО₂-лазеры. Остановимся на особенностях пропускания света этих длин волн световодами более подробно [7, 1120, 1128, 1139–1141, 1144, 1145].

Для передачи мощного импульсно-периодического УФ-излучения эксимерных лазеров используют ВС на основе кварцевого стекла. Согласно [1145], энергия импульса E_2 на выходе ВС длиной L связана с энергией E_1 на входе соотношением

$$E_2 = \eta E_1 \exp \left(- \int_0^L \chi_0 dx \right), \quad (5.19)$$

где эффективность ввода-вывода $\eta = \eta_1 \cdot \eta_2 \cdot \eta_3$; $1 - \eta_1$ и $1 - \eta_2$ — потери на отражение от входного и выходного торцов; η_3 характеризует эффективные потери, связанные с расходимостью лазерного излучения; χ_0 — установившееся на длине $L > L_0$ значение распределенных потерь при распространении света в ВС вдоль оси x .

Таблица 5.3. Параметры ВС с сердцевиной из кварца КУВИ [1145]

| Тип лазера (λ , нм) | τ_n , нс | α , дБ/м | β , (дБ/м)/ (Дж/см ²) | η | $W_{1 \max}$, Дж/см ² |
|---------------------------------|------------------|--------------------|--|-----------|--------------------------------------|
| KrF (248) | 15 | $\approx 1,3$ | $\approx 2,3$ | 0,25–0,35 | 1–2 |
| XeCl (308) | 50 | $0,5 \pm 0,05$ | ≈ 0 | 0,5–0,9 | 8–11 |
| XeF (351) | 12 | $0,14 \pm 0,015$ | ≈ 0 | 0,5–0,9 | 8–11 |

| Тип лазера | $W_{2 \max}$, Дж/см ² | $E_{2 \max}$, мДж/имп |
|------------|---|---|
| KrF (248) | 0,33 ($2a = 400$ мкм, $L \approx 0,3$ м) | 0,62 ($2a = 600$ мкм, $L \approx 0,3$ м) |
| XeCl (308) | 8,5 ($2a = 600$ мкм) | 24 ($2a = 600$ мкм) |
| XeF (351) | 6,0 ($2a = 400$ мкм) | 8 ($2a = 400$ мкм) |

Из (5.19) следует, что максимальная энергия E_2 или плотность энергии $W_2 \approx E_2/(\pi a^2)$ на выходе ВС определяется его длиной L , эффективностью ввода-вывода η и лучевой стойкостью (максимальным значением E_1 или W_1). Соответствующие экспериментальные данные для ВС с сердцевиной из кварцевого стекла КУВИ, полученные для трех типов эксимерных лазеров, представлены в табл. 5.3 [1145]. Расходимость лазерного излучения — около 3 мрад, частота следования импульсов равна 5 Гц. Излучение лазера через диафрагму и согласующую линзу направлялось на входной торец ВС так, как это изображено на рис. 5.11. Для исключения эффектов, связанных с изменением угла ввода, авторы [1145] использовали длиннофокусную линзу с $F \approx 300$ мм. При $L \geq L_0$ ($L_0 \leq 20$ см) расходимость излучения на выходе ВС в дальней зоне сохранялась постоянной и не превышала 17° . При средней плотности входной энергии ($W_1 \approx 3$ Дж/см²) распределенные потери для $\lambda = 308$ и 351 нм не зависят от W_1 , т. е. имеется лишь линейный компонент затухания.

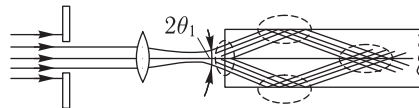


Рис. 5.11. Схема возбуждения ВС излучением большой энергии

В то же время для более коротковолнового излучения с $\lambda = 248$ нм значительными оказываются нелинейные потери,

$$\chi_0 = \alpha + \beta W_2$$

($\alpha = 3 \cdot 10^3$ см⁻¹, $\beta = 5,3 \cdot 10^{-2}$ см/Дж), которые существенно ограничивают плотность энергии на выходе (W_2).

Эффективность ввода-вывода излучения зависит от качества подготовки торца ВС и длины волны. В табл. 5.3 приведены данные для параметра η , полученные для сколотых торцов. На $\lambda = 308$ и 351 нм значения η близки друг к другу. Сильный разброс значений η определяется качеством скола. Для $\lambda = 308$ нм полировка торцов дает $\eta \approx 0,94 \pm 0,04$ при углах ввода излучения $\vartheta_1 \leq 6-7^\circ$. Однако полировка торцов снижает лучевую стойкость ВС из-за неизбежного внедрения абразива в поверхностный слой, что в конечном итоге уменьшает максимально достижимое

значение энергии на выходе. Предельно достижимые значения энергии на выходе ВС определяются не только эффективностью ввода–вывода и потерями в материале, но также и лучевой стойкостью ВС, $W_{1\max}$. Наиболее характерными видами деградации ВС являются разрушения входного и выходного торцов, боковой поверхности вблизи входного торца или на промежуточных участках. На рис. 5.11 пунктиром показаны области с повышенной плотностью энергии, где следует ожидать разрушения. Выходной торец (дистальный конец ВС) разрушается в основном из-за загрязнений, поглощающих излучение. При этом происходит скол загрязненного участка. Разрушение боковой поверхности вблизи входного торца обусловлено, главным образом, неоптимальным вводом излучения, а повреждения на промежуточных участках — оптическими неоднородностями за счет дефектов при изготовлении или микроизгибов.

Снижение лучевой стойкости ВС к излучению с $\lambda = 248$ нм (см. табл. 5.3) авторы [1145] связывают с нелинейными процессами. Вид разрушений существенно отличается от вида разрушений при более длинноволновом излучении: наблюдаются узкие трещины длиной несколько миллиметров в боковой поверхности вблизи входного торца.

Кроме рассмотренных причин снижения предельной энергии на выходе ВС существует еще одна — весьма значительная — зависимость $W_{1\max}$ от длительности импульса $\tau_{\text{и}}$. При передаче лазерного излучения с $\lambda = 308$ нм по промышленным кварцевым ВС с диаметром сердцевины 400 мкм лучевая прочность входного торца $W_{1\max} \approx 12\sqrt{\tau_{\text{и}}}$ (Дж/см²) в диапазоне $\tau_{\text{и}} \approx 10\text{--}300$ нс.

При использовании промышленного ХеСl-лазера с $\lambda = 308$ нм, с длительностью импульсов $\tau_{\text{и}} = 40$ нс и частотой повторения импульсов $f = 75$ Гц для большего, чем 10^3 , числа импульсов нетрудно обеспечить на выходе кварцевого ВС с диаметром 400 мкм и длиной 4 м плотность энергии около 6–7 Дж/см², что примерно в четыре раза превышает порог абляции ткани стенки сосудов для выбранной длины волны и ниже порога разрушения загрязненного остатками биоткани дистального конца ВС.

При фиксированной длительности импульсов с ростом длины волны лучевая стойкость переднего торца кварцевого ВС довольно значительно увеличивается, при этом отношение $W_{1\max}$ к величине порога абляции биоткани падает более чем в два раза, что казалось бы делает эффективнее использование коротковолнового излучения (табл. 5.4), однако значительные линейное и нелинейное затухания на $\lambda = 248$ нм, а также образование центров окраски в материале ВС под действием последовательных УФ-импульсов, катастрофически снижающих пропускание (до 10% первоначальной величины после нескольких тысяч импульсов), являются главными причинами, ограничивающими применение этого лазера в сочетании с промышленными световодами.

Таблица 5.4. Некоторые параметры ВС с сердцевиной из плавленного кварца ([46], с. 1772)

| Тип лазера (λ , нм) | $W_{1\max}$, Дж/см ² ($2a = 400$ мкм, $\tau_{\text{и}} \approx 30$ нс) | Отношение $W_{1\max}$ к величине порога абляции биоткани | α , м ⁻¹ ($NA \approx 0,22$) |
|---------------------------------|---|--|---|
| KrF (248) | ≈ 35 | 85 | 0,16 |
| XeCl (308) | ≈ 52 | 35 | 0,05 |
| XeF (351) | ≈ 150 | 34 | 0,03 |

В зависимости от конкретной ситуации может быть рекомендован для использования один из типов длинноволновых лазеров с $\lambda = 308$ нм или 351 нм. Если требуются длинные, до 10 м, отрезки ВС, меньшее количество импульсов для удаления патологической ткани и снижение опасности канцерогенных эффектов, предпочтение

следует отдать излучению с $\lambda = 351$ нм. Однако более тонкое послойное удаление патологической биоткани возможно лишь при использовании коротковолнового излучения.

Линейное пропускание кварцевых световодов в УФ-области спектра можно повысить при использовании технологии их вытяжки, дающей значительное содержание гидроксильных групп ОН (ВС на основе так называемого «мокрого» или «сверхмокрого» кварцевого стекла). Методы ВЧ и СВЧ плазмохимического осаждения позволяют получить кварц-кварцевые ВС с фторсиликатной оболочкой и сердцевиной из чистого кварцевого стекла с большим содержанием гидроксил-ионов, обладающие низкими потерями на $\lambda = 308$ нм, $\alpha \leq 0,17$ дБ/м [1123]. Разработанные авторами [1139] ВС предназначены для передачи высокоинтенсивного УФ- и ИК-излучения, имеют диаметр сердцевины, равный 300–600 мкм; числовую апертуру — 0,19–0,38; оптические потери на $\lambda = 308$ нм — 0,17–2,8 дБ/м и на $\lambda = 1060$ нм — $(1,7–5,7) \times 10^{-3}$ дБ/м.

Распространение импульсного УФ-излучения по кварцевым световодам имеет одну интересную особенность, которую необходимо учитывать на практике. Например, излучение азотного лазера с $\lambda = 337$ нм, длительностью $\tau_{\text{и}} \approx 6$ нс и средней мощностью импульса около 15 кВт вызывает люминесценцию центров окраски в материале сердцевины (кварцевое стекло КУВИ) в широкой области видимого спектра [1150]. Материальная дисперсия ВС определяет опережающее распространение импульса люминесценции по сравнению с импульсом накачки. Время опережения переднего фронта импульса люминесценции $t_0 = L\Delta n_c/c$; L — длина ВС; Δn_c — разность показателей преломления сердцевины на длинах волн накачки λ_0 и люминесценции λ_1 ; c — скорость света в вакууме. Для $\lambda_0 = 337$ нм и $\lambda_1 = 500$ нм $\Delta n_c \approx 5 \cdot 10^{-2}$, тогда при $L = 100$ м $t_0 = 15$ нс, следовательно, импульсы накачки ($\tau_{\text{и}} \approx 6$ нс) и люминесценции ($\tau_1 \approx 20$ нс) расходятся весьма существенно на выходе ВС.

При пропускании УФ-излучения ХеСл-лазера с $\lambda = 308$ нм ($\tau_{\text{и}} \approx 10$ нс, $f \leq 100$ Гц) через ВС типа кварц–полимер с диаметром сердцевины 400 и 600 мкм наблюдалось красное свечение ($\lambda \approx 670$ нм), обусловленное фотоиндуцированными центрами окраски с центром полосы возбуждения на $\lambda = 260$ нм [1151].

Послойное удаление биоткани можно реализовать и при использовании ИК-лазерного излучения ($\lambda \geq 2$ мкм). При этом нет опасности возникновения канцерогенных эффектов. ИК-лазеры в сочетании с ВС применяются, например, в кардиологии (ангиопластика, лечение врожденных пороков сердца), они обеспечивают эффективное рассеяние и поверхностное удаление биоткани [7, 61, 1141]. Например, промышленные кварц-полимерные ВС типа КП-400 и КП-600 с затуханием на $\lambda = 0,85$ мкм порядка 8–10 дБ/км могут быть использованы для достаточно эффективной передачи ($\geq 50\%$) излучения гольмиевого лазера ($\lambda = 2,09$ мкм) на расстояние 3–10 м [1144]. С учетом потерь на согласование (10–13%) световод длиной 3 м пропускает около 70% лазерной энергии, что составляет 6–6,5 Дж. Импульсы с такой энергией ($\tau_{\text{и}} = 10$ нс, $f = 1$ Гц) световод может передавать в течение нескольких часов (около 10^4 импульсов) без каких-либо повреждений, что достаточно для проведения многих хирургических операций и терапевтических воздействий.

Как уже было отмечено в предыдущем разделе, наиболее перспективными для медицинских применений в области длин волн 3–10 мкм являются ВС на основе галогенидов серебра (ВСГС). Они не токсичны, гибки, не растворяются в воде, достаточно эффективно пропускают как непрерывное, так и импульсное излучения с длинными и короткими импульсами.

Одним из лучших материалов для ВСГС является КРС-13 (0,25AgCl–0,75AgBr) [1120]. Прочность на разрыв экструдированных поликристаллических ВС из КРС-13

достигает 150 МПа, световод диаметром 0,5 мм допускает многократные изгибы радиусом до 7 см. Пропускание ВС диаметром 0,8 мм не изменяется при изгибах вплоть до радиуса 5 см. Полные потери для безоболочечных ВС в диапазоне длин волн 2–13 мкм определяются соотношением ([1120], с. 3)

$$\alpha = (0,5 + 16,2/\lambda^2), \text{ дБ/м.}$$

Значительный показатель преломления материала ВС, $n \geq 2$, и отсутствие отражающей оболочки приводят к большим значениям числовой апертуры и, как следствие, большим потерям за счет затухания мод высоких порядков на поверхности ВС (из-за поверхностных дефектов). Реальная числовая апертура ($NA \approx 0,3-0,4$) устанавливается на длине ВС $L_{ст} \geq 2$ м.

Большим показателем преломления обусловлено и высокое отражение света от торца (френелевские потери). Например, для CO_2 -лазера только 70% мощности проходит через ВС диаметром 0,9 мм и длиной 1 м, 8% мощности теряется за счет рассеяния и поглощения, а остальные 22% — за счет отражения [1114].

Распределение интенсивности на выходе ВС в дальней зоне имеет ширину на уровне половинной мощности порядка 30° . Поскольку при выходе из ВС амплитуды падающей и отраженной волн суммируются, то разрушениям при высоких уровнях непрерывной мощности (4–5 кВт/см²) подвержен именно выходной торец ВС. Кроме того, наличие спекл-картины на выходе (интерференция волноводных мод) с высокими значениями локальной интенсивности также способствует разрушению выходного торца. Принудительное охлаждение торца увеличивает порог разрушения до 38 кВт/см², а просветление входного и выходного торцов ВС увеличивает его пропускание на 25% и порог разрушения до 50 кВт/см² ([1120], с. 3). Порог разрушения ВС из КРС-13 с просветленными торцами для непрерывного излучения с $\lambda = 10,6$ мкм достигает 70 кВт/см² [1140]. ВСГС позволяют также пропускать короткие импульсы с большой пиковой энергией и мощностью (CO_2 - и АИГ:Ег-лазеры): $E_{и} \approx 20-50$ мДж (до 6,5 Дж/см²), $\tau_{и} = 0,1-4,2$ мкс, $P \approx 50-60$ кВт (8 МВт/см², $\tau_{и} = 0,1$ мкс) [1114, 1120]. Увеличение длительности импульса ($\tau_{и} > 100$ мкс) позволяет повысить порог разрушения до 36 Дж/см² и передавать импульсно-периодическое излучение CO_2 -лазера высокой мощности [1140]. Порог разрушения сапфировых ВС на длине волны эрбиевого лазера (2,94 мкм) превышает 1,2 кДж/см² при $\tau_{и} = 110$ мкс [1140].

Авторами [1140] разработан гибкий кабель на основе ВС из КРС-13 со специальной дистальной насадкой, передающий излучение CO_2 -лазера мощностью около 1 Вт, который может быть использован при проведении ряда хирургических операций, например для сварки сосудов.

По сравнению с поликристаллическими ВС полые металлические световоды обладают высокой прочностью и лучевой стойкостью, поэтому находят применение в ИК лазерной хирургии [1133]. Изготовленные по специальной технологии полые световоды имеют достаточную гибкость и сравнительно малые потери (0,3–2,0 дБ/м). Пропускаемая ими мощность излучения уменьшается не более чем в два раза при изгибе радиусом 5 см и скрутке на 180° . Отражающими поверхностями полых световодов являются две зеркально отполированные полоски алюминиевой или медной фольги, которые вставляются в пазы прокладок специальной конфигурации, далее вся конструкция помещается в термоусаживаемую трубку и равномерно сжимается ею [1133]. Величина пропускания световодом излучения CO_2 -лазера мощностью 30 Вт достигает 70% при его длине 1 м и внутреннем сечении $0,5 \times 8,0$ мм. Максимальная плотность мощности на выходе скальпеля, построенного на базе полого

световода, равна 10 кВт/см^2 (диаметр пятна 500 мкм, фокусировка системой двух линз — цилиндрической и сферической).

Разработаны также пластиковые полые световоды для передачи излучения CO_2 -лазера. Основой для них служат трубки из тефлона — материала, который обычно используется в медицине. Внутренняя поверхность трубки покрывается тонким (несколько микрометров) слоем металла и поверх него тонким защитным слоем диэлектрика. Световоды имеют гибкость тефлона, хорошо стерилизуются и могут быть многократно использованы для лазерной хирургии и терапии внутренних органов (полый световод с помощью линзы с $F = 12,5 \text{ см}$ согласуется с CO_2 -лазером мощностью 50 Вт).

В лазерной диагностике, хирургии и терапии требуются различные формы световых пучков на выходе волоконно-оптического облучателя и скальпеля. Торцы приемных отрезков ВС также должны быть определенным образом сформированы, чтобы эффективно передавать информационное излучение от объекта в диагностических системах. Для целей лазерной диагностики и химиотерапии тканей внутренних органов (пищевод, брюшина, желудок, мочевого пузыря, бронхи и пр.) разрабатываются разнообразные волоконно-оптические осветители [7, 61, 205, 1143, 1152–1155]. Принцип работы цилиндрического осветителя можно понять с помощью рис. 5.12 [1152].

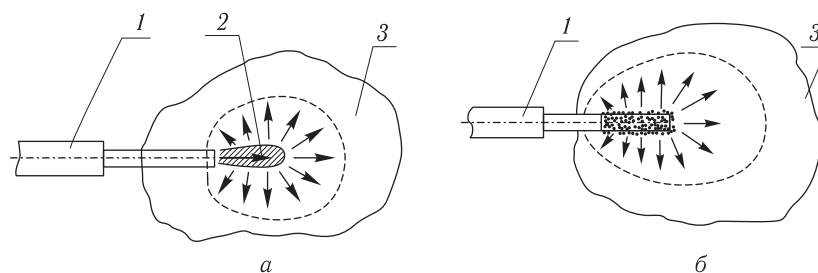


Рис. 5.12. Освещение злокачественной опухоли с помощью обычного ВС (а); ВС со специально обработанным концом (б): 1 — ВС; 2 — область высокой энергии; 3 — опухоль

В случае использования ВС с полированным или сколотым выходным торцом (рис. 5.12, а) в биоткани вблизи торца формируется очень сильный вторичный источник света, где значительная часть мощности теряется за счет бесполезного нагрева ткани. Для того чтобы уменьшить эти потери и получить равномерное распределение энергии в пространстве, используют химическое травление выходного отрезка ВС, дающее диффузно рассеивающую поверхность сердцевинки ВС (рис. 5.12, б). Травление конца ВС, длиной 15 мм, с предварительно снятой оболочкой и диаметром сердцевинки 400 мкм осуществляется в растворе фторида аммония в плавиковой кислоте в течение нескольких минут. В результате химического процесса на поверхности сердцевинки ВС формируется неоднородная структура с пространственным периодом от нескольких десятков до нескольких сотен микрометров.

Конструкция и диаграмма излучения другого типа цилиндрического осветителя показана на рис. 5.13 [1153]. Стекланный колпачок изготавливают из трубки соответствующего диаметра (боросиликатное стекло или кварц), один конец которой оплавливают так, чтобы получить полусферическую форму. Затем внутренняя часть колпачка матируется с помощью абразивного порошка, покрывается белой термостойкой эпоксидной смолой, одевается на очищенный от оболочки конец ВС, к которому колпачок приклеивается той же смолой. На рис. 5.13, б показана диаграмма распределения энергии излучения в пространстве, полученная с помощью He-Ne-лазера ($\lambda = 633 \text{ нм}$) мощностью 1 мВт.

Созданы и внедряются в медицинскую практику разнообразные волоконно-оптические облучатели биотканей, имеющие различные индикатрисы излучения и направления лазерного пучка (рис. 5.14, табл. 5.5) [7, 205, 1155]. Представленные облучатели имеют широкий спектр применений в лазерной терапии внутренних органов. Мягкий шаровой облучатель (рис. 5.15) хорошо зарекомендовал себя в фотодинамической терапии тканей головного мозга, мочевого пузыря и пр. (см. [9]).

Для повышения эффективности фотодинамической терапии, в частности кожных опухолей, можно использовать многоволоконные кварцевые вставки на рабочем конце облучателя [1154]. Вставки, состоящие из 2–4 отрезков ВС с диаметром сердцевины 400 мкм, дают улучшение однородности излучения по сравнению с моноволоконным облучателем.

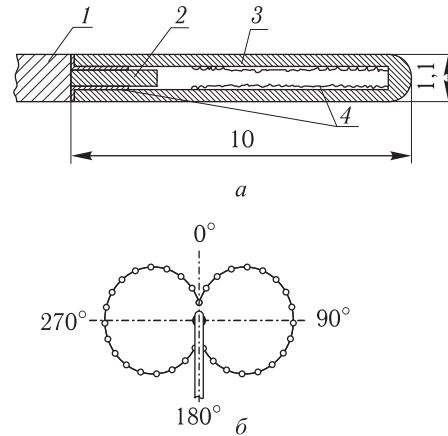


Рис. 5.13. Цилиндрический волоконно-оптический излучатель: *a* — конструкция; *б* — диаграмма излучения (1 — оболочка ВС; 2 — сердцевина ВС; 3 — стеклянный колпачок; 4 — теплостойкая белая эпоксидная смола, размеры в мм)

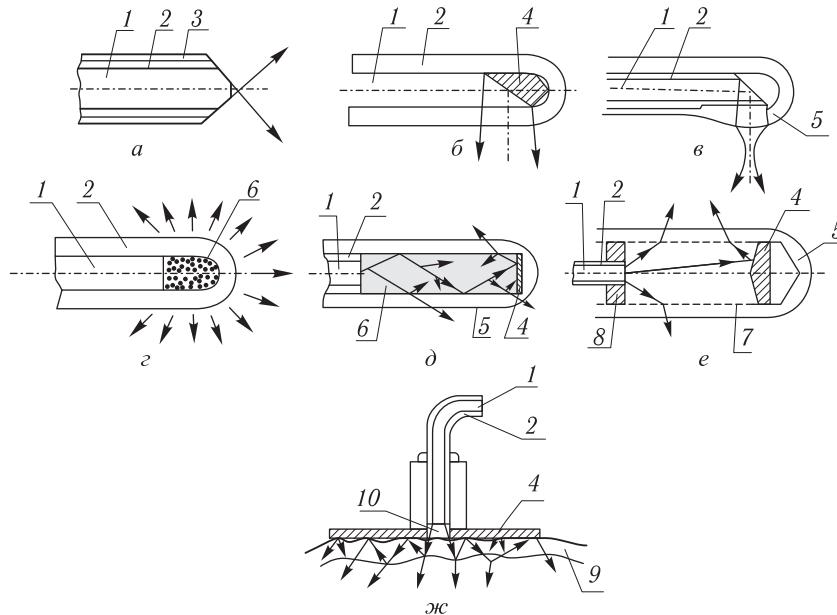


Рис. 5.14. Волоконно-оптические облучатели для наружной и внутриспостной лазерной терапии [1155]: *a* — с широкой индикатрисой излучения в виде конуса; *б* — с боковым выходом (конус в бок); *в* — с боковым выходом и линзовым окошком; *г* — со сферической индикатрисой; *д* — гибкий с цилиндрической индикатрисой; *е* — жесткий с цилиндрической индикатрисой; *ж* — для чрескожного облучения крови в сосудах (1 — сердцевина ВС; 2 — оболочка ВС; 3 — защитное покрытие ВС; 4 — металлическое зеркало; 5 — защитная прозрачная оболочка; 6 — сильно рассеивающее вещество; 7 — резьбовой рассеиватель (М6 с внутренним диаметром 5 мм); 8 — опорная гайка; 9 — биоткань (кожа); 10 — иммерсионная жидкость)

Таблица 5.5. Параметры волоконно-оптических облучателей для внутрисполостной лазерной терапии [1155]

| Тип облучателя (индикатриса) | Расходимость, град | Длина излучения, мм | Неравномерность излучения, не более раз | Коэффициент пропускания | |
|--|---|---|---|-------------------------|-----------|
| Плоский торец ВС (конус) | 18 | — | 1,5 | 0,80–0,85 | |
| Усеченный конус на торце ВС (широкий конус) | 53–55 | — | 2,0 | 0,80–0,85 | |
| Наклонный металлический отражатель на торце ВС (конус в бок) | 22–24 | — | 1,5 | 0,60–0,70 | |
| Рассеиватель на дистальном конце ВС (сфера) | 340 | 0,5–3,0 | 3,0 | 0,70–0,75 | |
| Протяженные рассеиватели с отражающим зеркалом на торце: | гибкий (цилиндр) | — | 30–100 | 2,0 | 0,70–0,75 |
| | | — | 150 | 10,0 | 0,70–0,75 |
| | жесткий с резьбовым рассеивателем (цилиндр) | — | 20–60 | 3,0 | 0,65–0,75 |
| | | жесткий с резьбовым рассеивателем и полуцилиндрическим зеркалом (полуцилиндр) | — | 20–60 | 2,5 |
| Контактный рассеиватель (цилиндр) | — | 30–150 | — | 0,70–0,75 | |

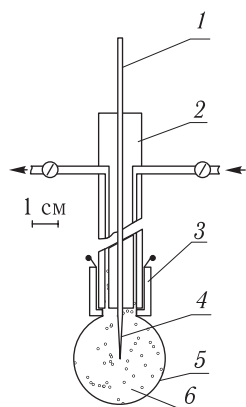


Рис. 5.15. Мягкий шаровой облучатель: 1 — волоконный световод ($2a = 400$ мкм, $NA = 0,4$); 2 — защитный цилиндрический кожух; 3 — удерживающий фланец; 4 — конец ВС в виде вытянутого конуса; 5 — резиновый шар; 6 — раствор ($1 : 10^3$) стерильного препарата Nutralipid или Intralipid (рассеиватель света)

Многоканальный волоконно-оптический разветвитель — облучатель поверхности кожи — описан в [297]. Облучатель имеет 7 каналов с длиной дистальных концов кварцевых ВС около 1,2 м. По каждому из каналов излучение может быть направлено к любой точке тела человека. Диаметр сердцевины ВС равен 400–600 мкм. Облучатель такого типа полезен при освещении больших участков тела низкоинтенсивным излучением от одного лазера и сокращении длительности некоторых процедур. Он был использован при отработке методики лазерной ПУФА-терапии псориаза и одномоментной рефлексотерапии (одновременное облучение нескольких активных точек) излучением азотного лазера с $\lambda = 337$ нм. Полные потери разветвителя на $\lambda = 337$ нм не превышали 3,2 дБ, что немного больше собственных потерь ВС. Разработанная технология позволяет увеличивать число каналов до 19.

При использовании световодов с микролинзами на торце возможно увеличение плот-

ности в зоне разреза ткани, защита торца ВС от контактов с тканью и снижение вероятности разрушения тканей благодаря быстрой расходимости излучения после фокуса [1141]. Высокая расходимость излучения в дальней зоне способствует облучению обширных участков ткани в хирургических или терапевтических целях. На рис. 5.16 показано формирование светового пучка на выходе ВС с плоским выходным торцом и двумя типами микролинз. Первая из них — дугообразная — имеет центр кривизны внутри, вторая — сферическая — вне ВС. Микролинзы формируются за счет сил поверхностного натяжения при расплавлении сердцевины ВС. В зависимости от типа материала (температуры плавления, спектра поглощения) расплавление осуществляют излучением СО- или СО₂-лазеров или нагревом в специальных печах [1141]. Удастся формировать линзы как у кварцевых, так и поликристаллических (КРС-13) волокон.

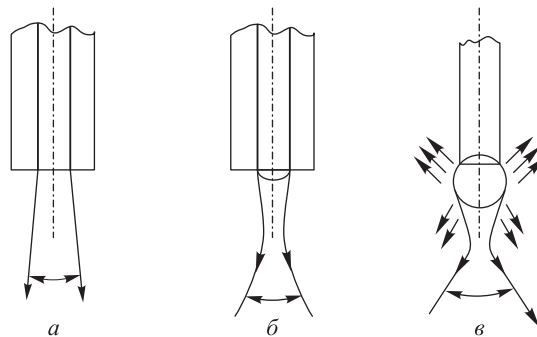


Рис. 5.16. Виды индикатрис излучения ВС: *а* — ВС с плоским выходным торцом; *б*, *в* — ВС с двумя типами микролинз (*в* — безоболочечный световод). Кроме основного пучка стрелками показано переотраженное и рассеянное излучения [1141]

Наряду с линзами используют специальные контактные наконечники из прозрачной в ближней ИК-области спектра ($\lambda = 1060$ нм) керамики на основе Al_2O_3 [2, 7, 61, 205]. Керамика существенно превосходит кварцевое стекло по температуре плавления, твердости и механической прочности. На рис. 5.17 показаны некоторые типы контактных микронаконечников, используемых для коагуляции (*а*), выпаривания (*б*) и вскрытия (*в*) биотканей, а также микростержень с широкоугольным рассеиванием для гипертермии тканей (*г*). Промышленностью выпускаются также топовидный микропорец для вскрытия слизистой оболочки и шаровидный наконечник для дробления камней в организме. Конфигурации рассмотренных наконечников

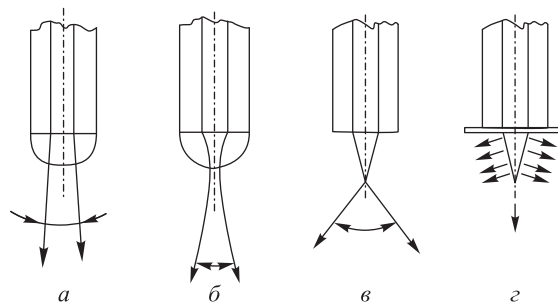


Рис. 5.17. Контактные микронаконечники для лазерной эндоскопии. Кроме основного пучка стрелками показано переотраженное и рассеянное излучения

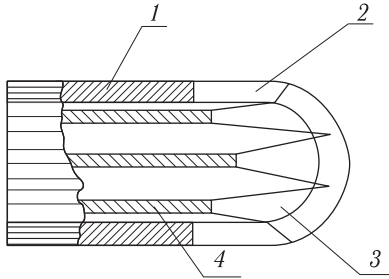


Рис. 5.18. Многоволоконный катетер для ангиопластики [69]. 1 — основа катетера; 2 — оптически прозрачный защитный колпачок; 3 — индикатриса излучения отдельного ВС; 4 — ВС, всего их 19

используется принудительное охлаждение корпуса облучателя путем прокачки через рубашку охлаждения жидкости (воды) при температуре 5–25 °С. Аппликаторы

допускают их охлаждение и защиту от прилипания ткани продувкой газа CO_2 или омыванием дистиллированной водой.

В лазерной ангиопластике применяют различные волоконно-оптические катетерные системы, включающие в себя многоволоконные облучатели, разогреваемые лазером металлические наконечники, микролинзовые элементы, кварцевые и сапфировые колпачки (рис. 5.18–5.20) [7, 61, 69, 205].

Разнообразные волоконно-оптические аппликаторы для коагуляции биотканей, применяемые в различных технологиях лазерной термотерапии, описаны в [2]. Разработаны аппликаторы с максимальной мощностью оптического излучения (1064 нм) на дистальном конце более 60 Вт. Для защиты окружающих здоровых тканей от лазерного воздействия и повышения эффективности коагуляции (за счет локального контраста температур)

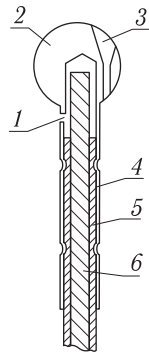


Рис. 5.19. Волоконно-оптический катетер с металлическим наконечником [61]. 1 — входной канал для газов, образующихся в результате испарения биоткани; 2 — разогреваемый излучением сферический наконечник из нержавеющей стали; 3 — канал для проводника катетера; 4 — держатель; 5 — опорный цилиндр; 6 — сердцевина ВС диаметром 300 мкм

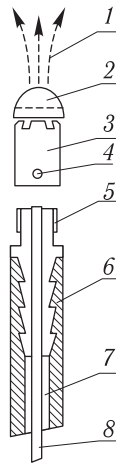


Рис. 5.20. Волоконно-оптический катетер с сапфировым колпачком [61]. 1 — лазерный пучок; 2 — колпачок из искусственного сапфира; 3 — металлический цилиндр; 4 — отверстие для выхода раствора; 5 — металлическое сочленение; 6 — струйный катетер; 7 — поступающий под давлением физиологический раствор; 8 — кварцевый световод

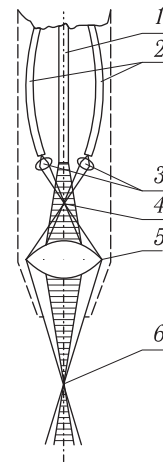


Рис. 5.21. Оптическая схема лазерного скальпеля на основе CO_2 -лазера [1143]. 1 — КРС-5-световод; 2 — ВС, подающий излучение He-Ne-лазера с $\lambda = 632,8$ нм; 3 — линзы; 4 — первая фокальная точка для излучения He-Ne-лазера; 5 — ZnSe-линза; 6 — фокальная точка для пучков CO_2 - и He-Ne-лазеров

с мощностью на дистальном конце от 1 до 35 Вт используются для коагуляции тканей простаты, печени и мозга [2].

Оптическая схема одного из вариантов CO_2 -лазерного скальпеля, рассчитанного на мощность излучения 20–40 Вт, показана на рис. 5.21 [1143]. Визуализация фокальной точки ИК излучения CO_2 -лазера осуществлена с помощью пучков излучения He–Ne-лазера. Выбранный ход лучей отражает разницу в фокальных длинах ZnSe-линзы для видимого ($\lambda = 632,8$ нм, $F_1 = 8,71$ мм) и ИК- ($\lambda = 10,6$ мкм, $F_2 = 10$ мм) излучений.

Для защиты входного и выходного торцов ВС от разрушения мощным лазерным излучением делают специальные оптические расширители на концах ВС, которые плавно меняют диаметр сердцевины, например, от 1 мм на входном торце до 0,4 мм в самом ВС и 1 мм на выходе. Расширитель приваривают к стандартным световодам; они действуют по принципу фокона (см. рис. 5.9) и имеют длину порядка 1 см. Изготавливают также световоды, у которых диаметр сердцевины плавно, на протяжении нескольких метров, уменьшается от входного конца до дистального. Преимущество таких ВС состоит в высокой концентрации энергии на дистальном конце и отсутствии сплавных соединений, на которых частично теряется мощность лазерного излучения.

5.3. Волоконные лазеры

Волоконные лазеры представляют собой широкий круг устройств, использующих различные виды оптической накачки от когерентных и некогерентных источников света. Активная среда создается за счет изготовления сердцевины из подходящих лазерных материалов, либо за счет использования нелинейных свойств материала волокна [1023, 1057, 1059, 1060, 1100–1103, 1197].

Волоконные лазеры являются перспективными для применения в биологии и медицине благодаря их компактности, совмещению функций лазера и световода, возможности создания многоканальных лазерных систем. Они с успехом могут быть использованы в лазерной микрохирургии, терапии и диагностике, в частности в генной инженерии, цитометрии, для облучения крови *in situ*, одномоментной рефлексотерапии и пр.

В типичном медицинском лазере многоцелевого назначения применяют оптические волокна с диаметром сердцевины 7–10 мкм (диаметр оболочки 25–30 мкм), изготовленные из различных лазерных материалов, причем для волокон, активированных редкоземельными элементами, длину волны излучения можно варьировать в широких пределах, от УФ до ИК (см. [52]). Излучатель лазера представляет собой световод, располагаемый спирально вокруг лампы накачки, дистальный конец которого, длиной 1–10 м, выводится в область взаимодействия излучения с биологическим объектом. При активации материала волокна неодимом в моноимпульсном режиме выходная энергия лазера на $\lambda = 1060$ нм составила 0,6–0,7 Дж при длительности импульса генерации 100–120 мкс, в квазинепрерывном режиме с частотой повторения импульсов 10–20 Гц средняя мощность равна 20–25 Вт. Малый диаметр дистального конца и значительная его длина позволяют облучать биологические микрообъекты и транспортировать излучение к труднодоступным тканям.

В волоконных лазерах необходимая для получения генерации положительная обратная связь осуществляется за счет отражения от торцов ВС и обратного рассеяния на оптических неоднородностях и микроизгибах [1123]. Использование жгутов из нескольких активных волокон позволяет реализовывать многоканальные медицинские лазерные системы.

Эффективную поперечную накачку активных волокон дают линейки светоизлучающих диодов на GaAlAs, поскольку длина волны их излучения очень близка

к одной из линий поглощения неодима (0,81 мкм). Обычно используется многослойная укладка длинных отрезков ВС (около 1 м) на линейки светодиодов [1123]. Для получения генерации на торцы ВС наносят зеркальные покрытия. Системы компактны, обладают сравнительно высоким КПД и имеют большие перспективы в медицине. Наряду с поперечной используется и продольная накачка светодиодами и различными типами лазеров. Наилучшие характеристики дают волоконные лазеры с накачкой излучением от лазерных диодов [1057, 1100–1103, 1197]. Они имеют низкие пороги генерации (≤ 100 мкВт) и большие коэффициенты усиления. В качестве активного элемента используются как одномодовые, так и многомодовые световоды. Отрезок ВС длиной 2–3 м с активированным материалом сердцевинки размещают внутри оптического резонатора (зеркала вблизи торцов или зеркальные покрытия нанесены на торцы ВС). Зеркала резонатора эффективно отражают свет на длине волны волоконного лазера и пропускают свет от лазера накачки (рис. 5.26).

Световоды, изготовленные из материалов, легированных ионами Nd^{3+} , Ho^{3+} , Er^{3+} , Tm^{3+} , Yb^{3+} используются для создания лазеров и усилителей в диапазоне 0,9–2,2 мкм. Примеси ионов других редкоземельных элементов не используются из-за многофононной релаксации, либо из-за отсутствия источников накачки [1197].

Для волоконного лазера на одномодовом кварцевом ВС, активированном неодимом, 97 % излучения лазера накачки с $\lambda = 0,82$ мкм поглощается в активной среде. Эффективность ввода излучения лазера накачки — около 25 %. Порог генерации для $\lambda = 1,088$ мкм составляет 3,7 мВт, область перестройки больше 80 нм. Такую же область перестройки можно получить и в эрбиевом лазере ($\lambda = 1,55$ мкм). В неодимовом лазере на многомодовом ВС ($\lambda = 1,088$ мкм) получена генерация с пиковой мощностью в режиме модуляции добротности порядка 10 Вт [1057]. В непрерывном режиме для световода длиной 20 м с диаметром сердцевинки, равным 28 мкм, и с концентрацией эрбия, равной 40 ррт, для продольной накачки излучением мощностью 10 Вт мощность выходного излучения на $\lambda = 1,534$ мкм составила 2 Вт (выходная связь — около 96 %) при пороговой мощности накачки порядка 100 мВт.

Узкополосные лазеры на основе трехслойного ВС, легированного неодимом $\text{Nd}^{3+}:\text{Al}_2\text{O}_3/\text{GeO}_2/\text{SiO}_2$, описаны в [1159]. Активное волокно имеет две сердцевинки — центральную диаметром 5 мкм, содержащую GeO_2 и ионы неодима с концентрацией 200 ррт, и коаксиальную — диаметром 50 мкм, содержащую GeO_2 с добавлением Al_2O_3 . Накачка осуществляется полупроводниковым лазером с длиной волны 810 нм и максимальной мощностью 650 мВт. Длина ВС равна 5 м, эффективность ввода 85 %. Один из лазеров в качестве спектрально-селективного элемента использует волоконный отражатель, составленный из двух асимметричных интерферометров Маха–Цендера, который обеспечивает ширину линии излучения лазера в 1 нм при полной выходной мощности 70 мВт. В другом лазере селекция осуществляется за счет брэгговской дифракционной решетки, в результате ширина линии снижена до 100 МГц при выходной мощности 15 мВт. Возможности эффективного (95 % и выше) сложения излучений нескольких волоконных лазеров с помощью одномодовых разветвителей X-типа продемонстрированы в [1160]. Выпускаемые промышленностью мощные волоконные лазеры на редкоземельных элементах и области их медицинских приложений представлены в табл. 1.12 [420, 1101–1103].

Волоконные лазеры, использующие нелинейные явления, не требуют активирования материала сердцевинки. Возможность их работы определяется высокой плотностью мощности лазера накачки и значительной областью взаимодействия излучения накачки с материалом сердцевинки (большие длины ВС, продольная накачка). Наиболее часто в качестве нелинейного явления используют вынужденное комбинационное рассеяние (ВКР). ВКР-волоконные лазеры на одномодовом ВС длиной в несколько сот метров при мощности лазера накачки в несколько ватт ($\lambda = 1060$ нм) дают из-

Таблица 5.6. Характерные длины волн и условия генерации ВКР волоконных лазеров

| Тип ВС | $\lambda_{\text{воз}}$, нм | $P_{\text{и}}$, кВт | $\tau_{\text{и воз}}$, нс | $\lambda_{\text{изл}}$, нм | $\tau_{\text{и изл}}$, пс | $P_{\text{и изл}}$, кВт | Примечание |
|--|-----------------------------|---|----------------------------|---|--|--------------------------|--|
| Многомодовый, градиентный, материал сердцевины $\text{SiO}_2\text{-GeO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$, $2a = 50$ мкм, $2b = 130$ мкм, $L = 50, 200$ и 1450 м [1156] | 532 | 2–15 | 10 | 545, 546, 559, 573, 575, 585, 589, 603, 605, 620–700, 740 | — — — — | — — — — | Квазиконтинуум Большие уровни накачки |
| | 1064 | | | 10^2 | 800–1000, 1119, 1175, 1239, 1306, 1365, 1390, 1500 | — — — — | — — — — |
| Многомодовый, $2a = 38$ мкм, $\Delta = 1,3 \cdot 10^{-2}$, $L = 50$ м [1157] | 1064 | 500 | $1,5 \cdot 10^{-1}$ | 1600 | $9 \cdot 10^{-2}$ | 25 | ВКР-солитонный режим, основная мода излучения |
| Одномодовый, $L = 25$ м [1157] | 1064 | 500 | $1,5 \cdot 10^{-1}$ | 1100–1300 1600 1300–1800 | — $7 \cdot 10^{-2}$ — | — 10 — | Дискретные компоненты ВКР-солитонный режим Континуум |
| Одномодовый, материал сердцевины $\text{SiO}_2\text{-GeO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$, $2a = 8$ мкм, $\lambda = 1390$ нм, $L = 0,4\text{--}20$ м [1158] | 1064 | 4,2–9,5 ($P_{\text{ср}} \approx 300$ мВт) | $\leq 10^{-1}$ | 991 | — | — | Четырехфотонное смешение, короткие ВС, $L \approx 3,5$ м |
| | | | | 1149 | 65 | 2 | |
| | | | | 1120, 1180 1210, 1280 | — — | — — | Обычное КР, длинные ВС, широкие линии |

лучение в диапазоне 1080–1130 нм для первого стоксового компонента и 1150–1175 нм для второго [980]. Характерные длины волн возбуждения $\lambda_{\text{воз}}$ и излучения $\lambda_{\text{изл}}$, а также условия генерации ВКР волоконных лазеров приведены в табл. 5.6 [1156–1158].

Экспериментальная установка на основе волоконного лазера для исследования спектров пропускания биотканей в диапазоне длин волн от 1064 до 2000 нм описана в [1190]. Излучение АИГ:Nd-лазера с акустооптической модуляцией добротности ($\lambda = 1064$ нм, $\tau_{\text{и}} = 250$ нс, $f = 250$ Гц) возбуждает многомодовый кварцевый ВС длиной в 1 км и диаметром сердцевины, равным 35 мкм. ВКР-лазер имеет набор дискретных линий с $\lambda = 1064, 1120, 1176, 1240, 1308$ и 1390 нм, а также сплошной спектр излучения, простирающийся вплоть до 2000 нм. Энергия отдельного импульса, поступающего через монохроматор (разрешение 20 нм) на биоткань, изменяется в пределах от 0,01 мДж на $\lambda = 1064$ нм до 0,001 мДж на $\lambda = 2000$ нм (соответственно, средняя мощность изменяется от 2 до 0,2 мВт).

В России выпускаются волоконно-оптические многомодовые источники дискретного по спектру когерентного излучения «Гамма-А» и «Гамма-С», которые возбуждаются излучением любых импульсных лазеров с $\lambda = 400\text{--}1100$ нм, $\tau_{\text{и}} \leq 1$ нс, $P_{\text{и}} = 0,01\text{--}1$ МВт.

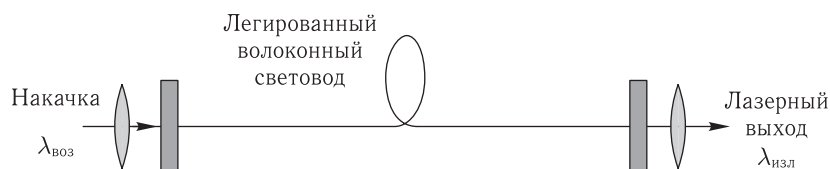


Рис. 5.22. Одна из типичных конструкций волоконного лазера: $\lambda_{\text{воз}}$ — длина волны излучения накачки, $\lambda_{\text{изл}}$ — длина волны излучения волоконного лазера [1100]

5.4. Микроструктурные световоды

В последние годы интенсивно развивается новое направление в волоконной оптике, связанное с разработкой и применением микроструктурных световодов (МСС) или фотонно-кристаллических световодов (ФКС) [1198–1217]. Оба термина считаются эквивалентными, хотя МСС представляют собой более широкий класс световодов. В таких световодах для передачи и преобразования излучения используется сплошная (рис. 5.23, *a–z*) или полая (рис. 5.23, *d, e*) сердцевина, окруженная микроструктурной оболочкой, содержащей систему ориентированных вдоль оси световода цилиндрических воздушных отверстий [1198]. Как правило, МСС изготавливаются путем вытяжки из преформ, набранных из капиллярных стеклянных или кварцевых трубок и стержней [1207, 1208].

В том случае когда МСС сконструирован так, что в нем образуются фотонные запрещенные зоны, тогда он поддерживает распространение волноводных мод за счет высокой отражательной способности оболочки в области длин волн сформированной фотонной запрещенной зоны, что позволяет существенно снизить потери при распространении света в полой сердцевине. Существенное достоинство МСС заключается в возможности конструирования новых типов световодов с заданными характеристиками для конкретных приложений в технике, биологии и медицине, поскольку изменение структуры дает возможность формировать частотный профиль собственных мод световодов, обусловленный частотным профилем дисперсии, который может сделать практически любой степени сложности. А это, в свою очередь, дает новые

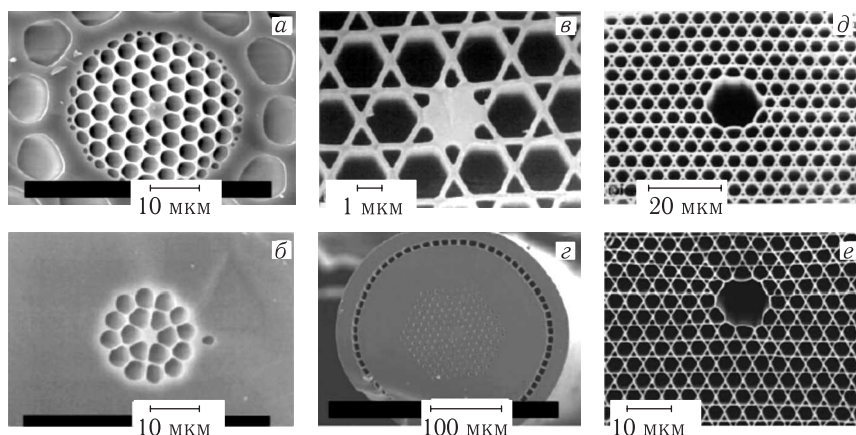


Рис. 5.23. Изображения поперечных сечений микроструктурных световодов (МСС) с высокой оптической нелинейностью за счет малых размеров и высокого контраста показателя преломления сердцевин и оболочки (*a–в*); с большой площадью сердцевин (*г*); полые (*д, е*) [1202]

режимы спектрально-временного преобразования канализируемого излучения и новые нелинейно-оптические явления. Именно высокое удельное содержание воздуха в оболочке позволяет получать высокий контраст в показателе преломления сердцевин и оболочки, что обеспечивает высокую степень локализации света в сердцевине и, соответственно, высокую эффективность нелинейных преобразований. Основные области настоящих и будущих применений МСС в биомедицине — это создание новых ярких источников белого света для оптической когерентной томографии, спектроскопии и микроскопии сверхвысокого разрешения, новых типов биосенсоров, особенно на основе МСС с полый сердцевин, и высокоинтенсивных лазерных хирургических и терапевтических систем, где необходима передача мощных сверхкоротких импульсов с формой пучка, близкой к идеальной для последующей жесткой фокусировки.

Приведем лишь два примера применений МСС. Более детальное описание как физических процессов, так и некоторых приложений можно найти в обширной литературе [1198–1217]. На рис. 5.24 показана генерация суперконтинуума с помощью МСС в виде решетки кагоме (kagomé). Представленные спектры возбуждаются в МСС излучением фемтосекундного титан-сапфирового лазера (~ 800 нм, ~ 220 фс) при примерно одинаковой внутриволоконной плотности мощности ~ 40 ГВт/см² и разных длинах волокна [1206]. Важно, что генерацию суперконтинуума можно получить в широкой области спектра от 200 до 1750 нм при использовании световодов длиной всего в несколько сантиметров. В недавней работе [1216] получена генерация суперконтинуума в диапазоне ближнего и среднего ИК от 700 до 2500 нм при возбуждении МСС со сплошной сердцевин, изготовленного из свинцово-висмутово-галлиевого стекла. Накачка от оптического параметрического генератора, настроенного на длину волны 1540 нм с длительностью импульса 120 фс, позволяла обеспечить хорошую равномерность спектра на уровне 5 дБ в диапазоне 1000–2500 нм.

Вторым примером является лазерная пикосекундная система для абляции твердых тканей зуба (рис. 5.25, цветная вклейка) [1205]. Показано поперечное сечение использованного в установке МСС с двумерной периодической оболочкой, образованной решеткой идентичных стеклянных капилляров. Оболочка поддерживает распространяющиеся в полном световоде моды за счет высокого отражения в пределах

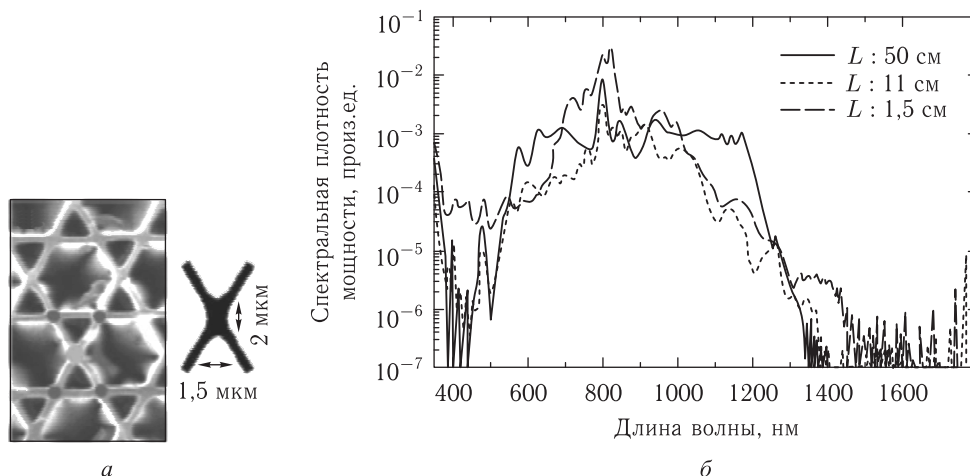


Рис. 5.24. Генерация суперконтинуума с помощью МСС в виде решетки кагоме (а) с локальными размерами $2,0 \times 1,5$ мкм; спектры, возбуждаемые в МСС излучением фемтосекундного титан-сапфирового лазера (~ 800 нм, ~ 220 фс) при примерно одинаковой внутриволоконной плотности мощности ~ 40 ГВт/см² и разных длинах волокна (б) [1206]

длин волн фотонных запрещенных зон. Сама полая сердцевина сформирована за счет извлечения семи капилляров из центральной части структуры. Период структуры оболочки составляет ~ 5 мкм, а диаметр полой сердцевины ~ 13 мкм. Излучение импульсного пикосекундного Nd:АИГ-лазера (1060 нм) пропускается через МСС и фокусируется на поверхность зуба, где производится абляция твердых тканей зуба. Возникающее при этом эмиссионное излучение образовавшейся при абляции плазмы попадает обратно в МСС и передается в систему регистрации для контроля процесса абляции. Важно, что профиль выходного пучка и МСС имеет форму, близкую гауссовой, что дает возможность его жесткой фокусировки на объект.

5.5. Биомедицинские волоконно-оптические датчики и зонды

Как уже говорилось выше, доставка лазерного излучения к биообъекту и обратно наиболее эффективно может быть осуществлена с помощью кварцевых или полимерных ВС. Малые размеры и вес ВС, химическая неактивность материала, помехозащищенность относительно электрических и магнитных полей, большая светосила и возможность сохранения поляризации излучения при использовании лазеров делают их перспективными для создания разнообразных датчиков и зондов, применяемых в биомедицине [1, 3, 7, 9, 205, 386, 436, 1069, 1070, 1114, 1122–1195]. Волоконно-оптические датчики (ВОД) и зонды безопасны для пациента, поскольку не имеют электрических контактов с телом и изготавливаются из химически неактивных материалов; благодаря малым размерам и весу они могут быть составной частью катетеров и эндоскопов для измерения параметров излучения внутри тканей, органов и кровеносных сосудов, требуют малых количеств исследуемого материала (например, крови); их невосприимчивость к внешним электромагнитным полям дает возможность проводить измерения в процессе воздействия на органы и ткани высоких электрических напряжений или СВЧ-полей.

Биомедицинские ВОД можно разделить на четыре группы. К первой группе относятся оптические датчики (основаны на измерении спектров отражения и флуорес-

ценции, интенсивности упруго и квазиупруго рассеянного света и пр.); ко второй — физические датчики (контроль микроперемещений, давления, температуры и пр.); к третьей — химические датчики (определение степени оксигенации крови, биологических тканей, парциального давления других газов: CO, CO₂ и пр.); к четвертой — биохимические датчики (определение содержания лекарственных препаратов, глюкозы, контроль иммунных проб и пр.).

ВОД миниатюрны и обеспечивают локальность анализа. Оптические схемы ВОД достаточно просты и состоят из стандартных компонентов: лазер (светодиод или другой источник света), фотодетектор, фильтры и линзы, а также волоконно-оптические элементы, широко выпускаемые промышленностью. Анализ информативного сигнала осуществляется так же, как и у электрических датчиков, с помощью стандартной аналоговой или цифровой аппаратуры, с помощью микропроцессоров или компьютеров.

Оптические ВОД используются при рефлектометрии, спектрометрии и флуориметрии биообъектов без привлечения каких-либо преобразователей на конце световода. Они применяются для спектрофотометрического анализа насыщения цельной крови кислородом, основанного на измерениях коэффициента отражения крови на $\lambda = 620$ нм (коэффициент отражения очень чувствителен к насыщению крови кислородом) и изобестической длине волны, равной 805 нм, для которой чувствительность отсутствует (см. рис. 1.7), а также для контроля скорости движения объема крови и мгновенного объема сердца за счет регистрации изменения во времени концентрации внесенного в кровь красителя (измерения на $\lambda = 660, 805$ и выше 900 нм) [1122, 1161, 1165, 1191].

Для мониторинга степени оксигенации и микроциркуляции крови в мышечных тканях животных и человека *in vivo* можно использовать передаваемое по ВС излучение нескольких полупроводниковых лазеров и светодиодов, работающих на разных длинах волн в диапазоне максимальной прозрачности кровенаполненной ткани (780–1300 нм), сопровождая эти измерения тестированием физиологических параметров пациента. Поскольку глубина проникновения излучения различных длин волн различна, то возможен пространственный скрининг измеряемых параметров. Получаемая в процессе измерений информация обрабатывается с помощью компьютера с использованием алгоритмов, разработанных на основе модельных представлений о взаимодействии света с биологическим объектом и принципа получения информационного сигнала.

В [1191] описан волоконно-оптический вычислительный комплекс для контроля кровоснабжения и метаболизма тканей, позволяющий зондировать ткань на глубину до 2 см с помощью 4–6 светодиодов и полупроводниковых лазеров, излучение которых после рассеяния в слоях биоткани (кожи и мышцах) собиралось волоконным жгутом и поступало на фотодетектор. Датчик перекрывал диапазон длин волн от 680 до 950 нм. С его помощью и специально разработанных компьютерных программ изучалась динамика отклика системы кровоснабжения кожи и прилегающей мышечной ткани на гипервентиляцию с последующей задержкой дыхания.

Разработан ВОД наличия желчи в желудочном соке, который также использует спектрофотометрический принцип и многоканальный характер приема отраженного излучения [1161, 1194]. Диапазон длин волн датчика, равный 400–700 нм (см. рис. 1.7), определяется спектром поглощения соответствующих пигментов. Аналогичный принцип заложен в волоконно-оптическом кожном эритемометре [1180], с помощью которого измеряются коэффициенты отражения кожи на двух длинах волн: соответствующей линии поглощения гемоглобина крови (555 нм) и опорной, равной 660 нм (см. рис. 1.7). Отношение этих коэффициентов отражения позволяет судить о степени покраснения кожи, вызванной различными причинами.

Важное значение для биологии и медицины имеют волоконно-оптические анализаторы микрочастиц, позволяющие осуществлять контроль геометрических и оптических параметров отдельной биочастицы в реальном масштабе времени [1168, 1169]. В [1168] описан прибор, использующий одновременную регистрацию рассеянного света для 16 углов рассеяния. Прием излучения осуществляется с помощью волоконных световодов, вмонтированных в полусферическую оболочку, ограничивающую область взаимодействия лазерного пучка с пролетающей в газовом потоке частицей. Источниками излучения являются He–Cd-лазер ($\lambda = 441,6$ нм, $P = 10$ мВт) или одноволновый Ar-лазер ($P = 10$ мВт). Диапазон диаметров частиц — 0,2–4,0 мкм, максимальная скорость счета достигает 200 частиц в секунду. В качестве примера регистрировались пять различных бактериальных клеток *Bacillus subtilis*, имеющих форму палочки диаметром около 0,5 мкм и длиной от 1,0 до 2,0 мкм. Обнаружены существенные изменения в индикатрисах рассеяния, вызванные как разницей в длинах, так и неоднородностью структуры бактерий. Последнее вызывает сильную асимметрию рассеяния и значительную деполяризацию.

Другой тип анализатора может обеспечить контроль размеров отдельной биочастицы, например микроорганизмов при воздействии на них лекарственных препаратов [1169]. Излучение лазера через одномодовый волоконный световод и градиентную линзу направляется поперек потока суспензии биочастиц, протекающего по цилиндрической кювете. Приемником рассеянного излучения является градиентная линза с пристыкованными к ней двумя волоконными световодами. Эта конструкция сделана так, чтобы по одному световоду на отдельный фотоприемник поступал свет, рассеянный под углом ϑ_i , а по другому — на другой фотоприемник свет, рассеянный под углом $\vartheta_i + \Delta\vartheta_i$, далее с помощью электронного устройства сигналы с фотоприемников делятся друг на друга и получившийся сигнал используется в качестве информационного. Для определенного соотношения показателей преломления частицы и окружающей жидкости (в [1169] соответственно 1,6 и 1,33) каждому размеру частицы соответствует свой угол ϑ_i , для которого отношение интенсивностей при ϑ_i и $\vartheta_i + \Delta\vartheta_i$ имеет резкий максимум. Имея три таких детектора рассеянного излучения при $\vartheta_i = 30^\circ, 50^\circ, 70^\circ$, $\Delta\vartheta_i = 13^\circ$ и $\vartheta_s = 2^\circ$ (определяется числовой апертурой волоконно-оптического датчика), оказывается возможным осуществить контроль размеров биочастиц в пределах от 0,3 до 0,8 мкм.

Подобные устройства могут оказаться полезными и при анализе характера пропускания лазерного излучения биотканями. Некоторые ВОД позволяют измерять трехмерное распределение интенсивности света в биотканях. В качестве облучателя биоткани обычно используется кварцевый ВС с диаметром сердцевины $2a = 400$ мкм, торец которого делается плоским и хорошо отполированным. Например, на длине волны $\lambda = 632,8$ нм излучение с торца ВС имеет коническую форму с углом раскрытия $10,4^\circ$ в воде и $9,7^\circ$ в биоткани (показатель преломления биоткани равен примерно 1,43). Приемный ВС того же диаметра очищается от оболочки на длину 2 мм от торца и углубляется в биоткань, которая располагается в кубическом боксе с малыми отверстиями для подведения приемного ВС. Другой конец ВС направляется к фотоумножителю. Таким способом, например, была измерена длина изотропии рассеяния мышечной ткани быка. Экспериментальные данные приведены в главе 3 (см. табл. 3.1).

Три типа волоконно-оптических зондов для приема рассеянного излучения показаны на рис. 5.26. Два из них являются анизотропными и собирают либо параллельные, либо сходящиеся пучки света. Область «захвата» излучения такими приемниками определяется числовыми апертурами ВС и оптической системы на входе ВС. Третий тип зонда является изотропным [210, 211, 1192], т. е. в световод

попадает излучение в телесном угле, близком к 4π стерадиан. Шарик на конце ВС изготавливают из слабо поглощающего и сильно рассеивающего материала.

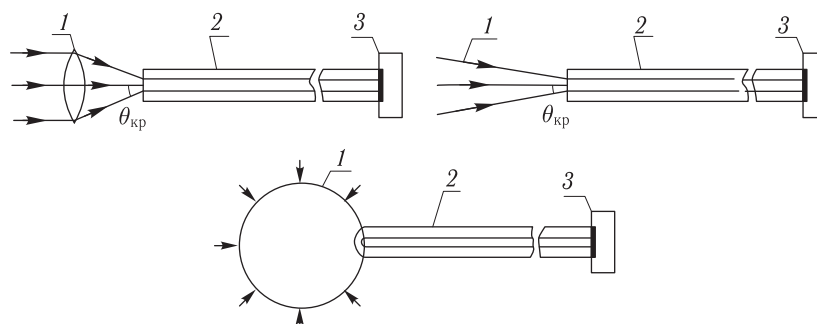


Рис. 5.26. Волоконно-оптические зонды для приема рассеянного в биоткани излучения. 1 — лазерный пучок; 2 — ВС; 3 — фотоприемник

ИК-световоды используются для наблюдения состояния внутренних органов по характеру их теплового излучения, максимум интенсивности которого для живых объектов лежит в области 10 мкм. Температурная разрешающая способность волоконного ИК-радиометра — около $0,1\text{ }^\circ\text{C}$, а пространственная определяемая диаметром сердцевины и равна примерно 1 мм [1114, 1120, 1142]. Лучшими для радиометрических зондов являются ВС на основе галогенидов серебра, которые были использованы для контроля температуры биоткани в процессе воздействия на нее мощного лазерного или СВЧ-излучения. Такие же световоды в сочетании с высокочувствительными и быстродействующими методами ИК-спектроскопии (например, фурье-спектроскопии) можно применять для детектирования газов и анализа биожидкостей внутри различных полостей человеческого тела, в частности для контроля содержания CO , CO_2 , CH_4 , H_2O , спиртов, концентрации анестезирующего газа, компонентов крови, мочи, патологических жидкостей и др. [46, 1134, 1135, 1193].

К оптическим ВОД относятся также разнообразные рефрактометры, основанные на измерении коэффициента отражения света на границе раздела торец ВС — исследуемая жидкость при изменении показателя преломления этой жидкости [1170] или изменении числовой апертуры ВС при погружении его конца в исследуемую биожидкость или биоткань [935]. В первом случае работа датчика описывается формулами Френеля. При использовании 2-милливаттного He-Ne-лазера, одномодового ВС с диаметром сердцевины $2a = 4\text{ }\mu\text{m}$ и синхронного детектора среднеквадратичная ошибка измерения n составила 0,2%. Во втором случае дистальный конец ВС с диаметром сердцевины $2a = 1000\text{ }\mu\text{m}$ освобождался от оболочки на глубину его погружения в биоткань, которая в данном случае служила оболочкой с новым показателем преломления n_0 . Регистрация углового распределения излучения на выходе ВС дала возможность рассчитать n_0 при известном значении n_c по формуле (5.1). Экспериментальные данные для тканей человека и животных приведены в главе 3 (см. табл. 3.2).

Измерение спектра флуктуаций интенсивности при квазиупругом рассеянии лазерного излучения от движущихся клеток позволяет определять скорость их движения и другие параметры [5, 403, 1138, 1163, 1164, 1175, 1176]. Схематически простейший гомодинный волоконно-оптический доплеровский измеритель скорости потока крови показан на рис. 5.27, а. Он может быть использован для неинвазивной оценки скорости движения потока крови, если излучение хорошо пропуска-

ется стенкой сосуда, а также для измерения профиля скорости движения потока с пространственным разрешением 0,1 мм при введении волоконно-оптического зонда внутрь сосуда. Однако следует учитывать, что зонд внутри сосуда достаточно сильно возмущает поток [1176].

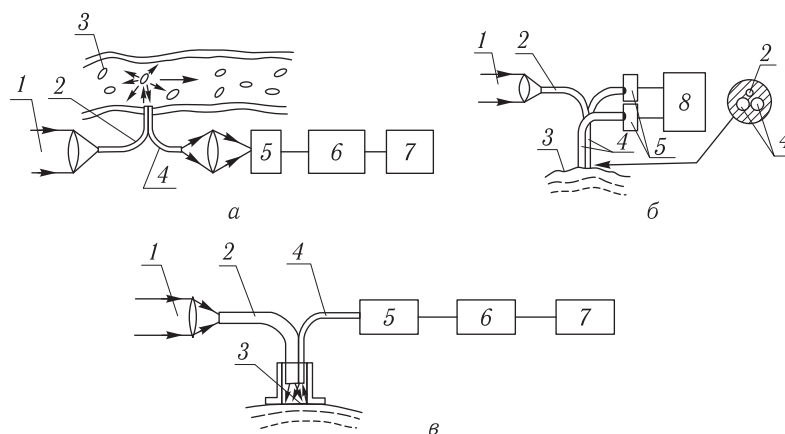


Рис. 5.27. Схемы волоконно-оптических доплеровских измерителей скорости кровотока в сосудах (а); в биотканях (б, в): 1 — лазерное излучение; 2 — облучающий ВС; 3 — кровеносный сосуд или биоткань; 4 — приемный ВС; 5 — фотоприемник (фотодиод или ФЭУ); 6 — анализатор спектра; 7 — компьютер; 8 — аналоговый процессор

Трехволоконный дифференциальный доплеровский измеритель микроциркуляции крови в биотканях (рис. 5.27, б) работает на двух длинах волн ($\lambda = 633$ и 780 нм) поочередно, что позволяет повысить надежность измерений *in vivo* [1163]. Усредненные характеристики кровотока в коже можно получить с помощью анализа временных свойств спекл-поля, образованного при отражении когерентного лазерного излучения от кожи (рис. 5.26, в) [403]. Лазерное излучение с $\lambda = 633$ нм поступает на поверхность кожи через многомодовый световод с диаметром сердцевины, равным 80 мкм, отраженное излучение (небольшой фрагмент спекл-поля) принимается одномодовым ВС и далее фотоумножителем с усилителем. Временные реализации спекл-поля, несущие информацию о характере кожного кровотока, обрабатываются с помощью анализатора спектра и компьютера.

Типичная схема дифференциального волоконно-оптического доплеровского измерителя скорости потока биожидкости показана на рис. 5.28. Характерной его особенностью является использование одномодовых ВС с сохранением поляризации и градиентных линз для получения интерференционных полос высокого качества в области протекания жидкости. На данной схеме показана регистрация рассеянного вперед света, хотя можно использовать рассеяние назад и по другим направлениям в зависимости от решаемых задач и условий исследования [1138]. В качестве приемного ВС служит градиентная линза, состыкованная с многомодовым световодом.

Рассмотренная схема требует тщательной юстировки и в значительной мере подвержена влиянию внешних акустических возмущений [1138]. Влияние этих возмущений может быть снижено за счет использования многоканальных анизотропных одномодовых ВС с идентичными слабосвязанными каналами (сердцевинами) в общей оболочке из кварцевого стекла [1171]. Такие ВС обладают следующими свойствами, важными для построения доплеровских измерителей скорости: сохраняют взаимную когерентность излучения в каналах, т. е. дают стабильную интерференционную кар-

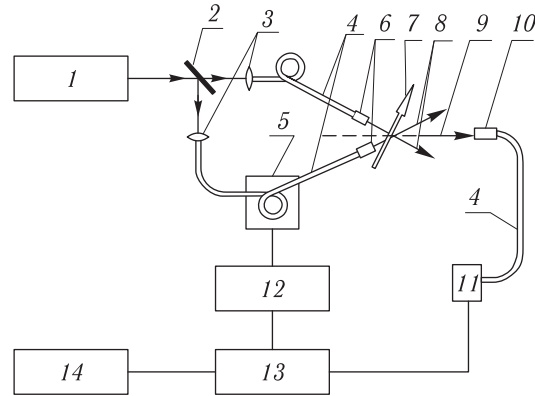


Рис. 5.28. Схема дифференциального волоконно-оптического доплеровского измерителя скорости потоков биожидкостей [1138]. 1 — лазер; 2 — расщепитель пучка; 3 — согласующая микролинза; 4 — одномодовый ВС; 5 — фазовый модулятор; 6 — выходная градиентная линза; 7 — исследуемый поток биожидкости; 8 — лазерный пучок; 9 — рассеянный свет; 10 — входная градиентная линза; 11 — фотоприемник; 12 — электронное управляющее устройство; 13 — коррелятор; 14 — компьютер

тину на выходе; имеют одинаковую ориентацию осей двулучепреломления в диаметрально противоположных каналах; избирательны к направлению деформации.

Когерентный волоконно-оптический фотон-корреляционный спектрометр для ранней диагностики катаракты описан в [386]. В основе датчика — два волоконных световода: один одномодовый, служит для передачи гауссова пучка He-Ne или полупроводникового лазера к объекту, а другой — многомодовый или также одномодовый — для сбора обратно рассеянного излучения под определенным углом и передачи его на фотодетектор (рис. 5.29) и далее на электронный коррелятор. Мощность излучения He-Ne-лазера (633 нм) порядка 1 мВт с размером пучка на хрусталике около 150 мкм, углы приема рассеянного излучения 155° (датчик 1) и 143° (датчик 2). Определение по измеренным автокорреляционным функциям флуктуаций интенсивности рассеянного света размеров рассеивателей в хрусталиках человека в зависимости от возраста показывает достаточно высокую чувствительность метода для мониторинга возрастных изменений в структуре хрусталика, связанных с ростом размеров агрегированных белковых компонентов. Возможен клинический вариант измерительной системы для ранней диагностики катаракты. Оценки показывают, что для времени измерения автокорреляционной функции флуктуаций интенсивности около 2 мин ожидаемое значение плотности мощности на ретине должно быть не

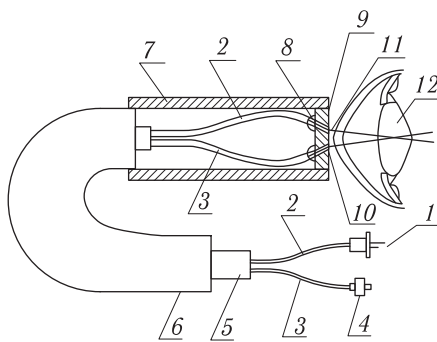


Рис. 5.29. ВОД для фотон-корреляционной спектроскопии хрусталика глаза человека: 1 — оптический разъем, соединяющий с гелий-неоновым или полупроводниковым лазером малой интенсивности; 2 — одномодовый ВС; 3 — принимающий ВС; 4 — оптический разъем, соединяющий с электронным автокоррелятором; 5 — тефлоновая трубка; 6 — внешняя защитная оболочка; 7 — корпус; 8 — клеевое крепление; 9 — фланец с прецизионными отверстиями 10 и 11; 12 — хрусталик [386]

более $0,05 \text{ мВт/мм}^2$, что почти на три порядка ниже порога повреждения сетчатки. В дальнейшем этот датчик использовался для изучения действия лекарственных препаратов против катаракты, показав свою высокую чувствительность к малым изменениям рассеяния света в хрусталике экспериментальных животных [764].

Портативный волоконно-оптический фотон-корреляционный спектрометр на основе He-Ne-лазера (633 нм), одномодовых световодов, фотоумножителя, работающего в режиме счета фотонов, 288-канального коррелятора, работающего в реальном времени с выборкой 200 нс, описан в [1195]. Он позволяет проводить исследования *in vivo* хрусталиков пациентов. В этой работе также была подтверждена бимодальность распределения рассеивателей в ткани хрусталика человека, например для здоровых глаз в возрасте 39–43 года (6 глаз, три пациента, женщины) мелкодисперсная фракция имеет средний радиус $4,25 (\pm 1,7) \text{ нм}$, а крупнодисперсная — $497 (\pm 142) \text{ нм}$. Для катарактальных хрусталиков средний радиус мелкодисперсной фракции стремится к 160 нм, а крупнодисперсной — к 1000 нм (см. главу 2). Волоконно-оптический спектрометр позволяет находить распределение частиц по размерам для разных локализаций измерительного объема.

В настоящее время в литературе описано достаточно много схем волоконно-оптических когерентных томографов (ВОКТ) биотканей [1, 12, 13, 16, 19, 21, 29, 31, 33, 125, 432–438]. Типовая схема на основе волоконно-оптического интерферометра Майкельсона, собранного с использованием 50%-го одномодового разветвителя X-типа, представлена на рис. 5.30. В работе [436] описан ВОКТ, использующий в качестве низкокогерентного излучателя суперлюминесцентный диод ($\lambda = 830 \text{ нм}$, $\Delta\lambda = 30 \text{ нм}$) и одномодовый волоконный интерферометр Майкельсона. Мощность ИК-излучения на поверхности ткани около 30 мкВт. Интерференционный сигнал на доплеровской частоте, определяемой скоростью сканирования зеркала в опорном плече $f = 2\nu/\lambda$ (см. рис. 5.30), пропорционален коэффициенту отражения нерассеянного компонента от оптической неоднородности внутри биоткани. Локализация неоднородности в продольном направлении определяется по равенству длин сигнального и опорного плеч интерферометра в пределах длины когерентности источника света ($\sim 10 \text{ мкм}$), поперечное разрешение при сканировании пучка вдоль поверхности образца — радиусом фокального пятна зондирующего излучения w (обычно $w \leq 20 \text{ мкм}$, что должно соответствовать требуемой продольной длине зондируемой области, определяемой длиной перетяжки $2n\pi w^2/\lambda$). В зависимости от способа продольно-

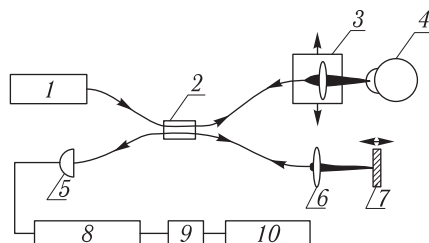


Рис. 5.30. Волоконно-оптический когерентный томограф: 1 — источник низкокогерентного излучения (суперлюминесцентный диод или фемтосекундный лазер), 2 — одномодовый волоконно-оптический интерферометр Майкельсона, 3 — сканируемый в поперечном направлении облучатель биоткани (отдельный слой ткани может быть представлен как диффузно отражающее «зеркало» в рабочем плече интерферометра), 4 — объект, 5 — фотодетектор, 6 — согласующая линза в опорном плече интерферометра, 7 — перестраиваемое в продольном направлении зеркало интерферометра, 8 — демодулятор, 9 — аналого-цифровой преобразователь, 10 — компьютер [1]

го сканирования (механический или пьезоэлектрический) двумерные изображения распределения коэффициента отражения ткани (томограммы) размером $4 \times 1,5$ мм (длина–глубина) с разрешением 15 мкм получали за время от 5 до 20 с. На рис. 5.31 в качестве примера представлены томограммы и соответствующие гистологические срезы нормальной и псориатической кожи человека [436]. Такие томографы хорошо сопрягаются со стандартными эндоскопами и позволяют получать томограммы поверхностных слоев внутренних органов (до нескольких миллиметров): желудка, шейки матки, простаты и пр. Более того, чувствительность метода к скорости движения рассеивающих объектов позволяет регистрировать скорость кровотока в отдельных поверхностных сосудах, распределение скорости поперек сосуда и даже направление скорости [433, 438, 832–836, 843].

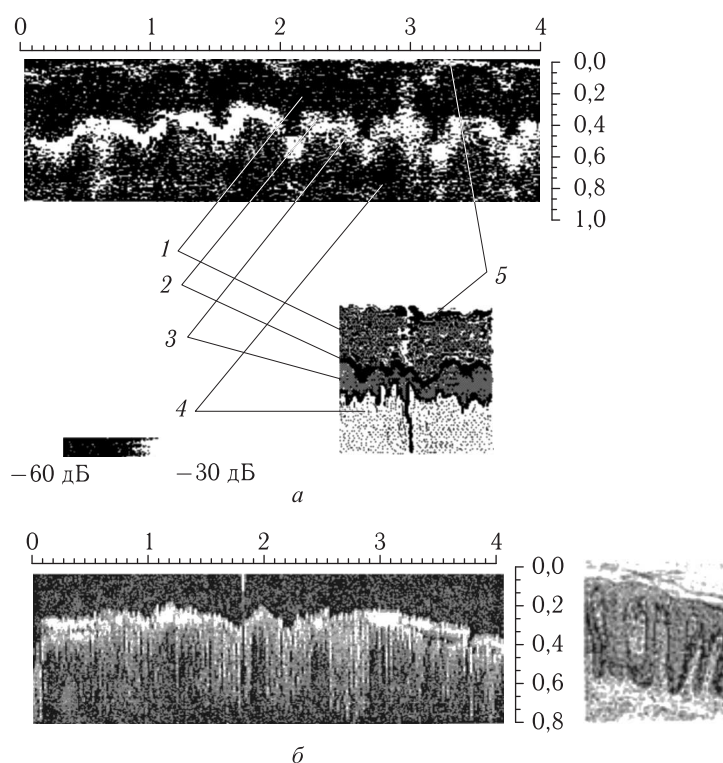


Рис. 5.31. Двумерные ОКТ-томограммы кожи человека *in vivo* и соответствующие гистологические срезы: *а* — в норме (1 — роговой слой, 2, 3 — эпидермальные слои клеток, 4 — папиллярный слой дермы, 5 — поверхность кожи (ср. рис. 2.1)) (ОКТ-томограмма — сверху, гистологический срез — справа); *б* — при псориазе (ОКТ-томограмма — слева, гистологический срез — справа); на ОКТ-томограммах все размеры даны в миллиметрах [436]

Большие потенциальные возможности имеет метод лазерной микрофлуориметрии при использовании ВС для изучения тканей и клеток крови *in vivo*. Исследование флуоресценции НАДН используется для изучения биохимии и физиологии биотканей путем анализа протекания окислительно-восстановительных реакций. Волоконно-оптический микрофлуориметр (ВОФ) позволяет исследовать микрообъемы тканей в различных областях их локализации [1134, 1135, 1161, 1162, 1165, 1181]. Одна из схем ВОФ показана на рис. 5.32 [1181]. Возбуждение флуоресценции

осуществляется лазером на красителях с накачкой от азотного лазера. Длина волны лазера $\lambda = 480$ нм, частота повторения импульсов — 60 Гц, пиковая мощность — 25 кВт, средняя мощность — 8 мВт. Для эффективного подавления отраженного от биообъекта лазерного излучения и пропускания света флуоресценции использованы дихроичные фильтры.

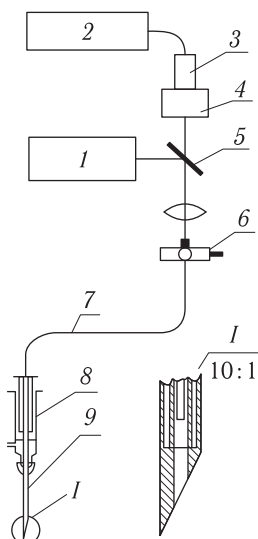


Рис. 5.32. Схема волоконно-оптического микрофлуориметра: 1 — лазер; 2 — счетчик импульсов; 3 — фотоумножитель; 4 — монохроматор или оптический фильтр; 5 — дихроичный фильтр; 6 — устройство для позиционирования ВС; 7 — ВС; 8 — волоконно-оптический зонд; 9 — передняя часть зонда

сбор и передачу излучения флуоресценции (угол приема ВС равен 25°). В ВОФ предусмотрено точное позиционирование торца световода относительно сфокусированного лазерного пучка. ВС с целой оболочкой пропускается через пластиковый шприц; рабочий кончик ВС освобождается от оболочки вплоть до сердцевины и вставляется внутрь тонкой иглы; боковое отверстие шприца с ВС соединяет его с другим пластиковым шприцем объемом 3,0 мл. Забор и выпуск жидкости осуществляется синхронными движениями плунжеров обоих шприцев. Положение плунжера шприца с ВС определяет положение рабочего кончика ВС, удаление которого на некоторое расстояние формирует хорошо воспроизводимый измерительный объем (своеобразную кювету) внутри иглы. При удалении торца ВС на 3 мм от края иглы требуется всего 0,4 мкл жидкости для равномерного заполнения ею измерительного объема. Повышение чувствительности флуоресцентного зонда возможно при изготовлении рабочего кончика ВС в виде микролинзы или присоединения к нему

Описываемый ВОФ позволяет изучать как однофотонную, так и двухфотонную флуоресценцию. Благодаря сильному синему сдвигу длины волны флуоресценции двухфотонного процесса он обладает большей спектральной селективностью, чем однофотонный. Интенсивность двухфотонной флуоресценции

$$I_{\Phi}^{(2)} \sim \frac{P^2}{s} N,$$

где P — мощность лазерного излучения; s — площадь поперечного сечения пучка в образце; N — концентрация исследуемой примеси.

В установке использованы два типа дихроичных фильтров: для однофотонной методики — фильтр с пропусканием 40% на длине волны возбуждения и 90% на длине волны флуоресценции; для двухфотонной методики — фильтр с пропусканием 2 и 70% соответственно. Флуоресценция при однофотонном возбуждении выделяется с помощью отрезающего фильтра и монохроматора с полосой 6 нм, двухфотонная флуоресценция — с помощью трех фильтров и двухсантиметровой кюветы с раствором CuSO_4 (полоса — около 50 нм с центром вблизи $\lambda = 360$ нм и пиковым пропусканием, равным 20%). Сигнал флуоресценции регистрируется с помощью фотоумножителя и счетчика импульсов. Поскольку интенсивность двухфотонной флуоресценции мала, приходится охлаждать фотоумножитель сухим льдом, чтобы снизить его шумы.

Для фокусировки лазерного пучка на торец кварцевого световода с диаметром сердцевины 200 мкм используется линза с фокальной длиной 25 мм. Один и тот же световод осуществляет передачу лазерного излучения,

сапфирового шарика с целью фокусировки лазерного пучка и более эффективного сбора излучения флуоресценции.

Рассмотренный ВОФ был использован для определения концентрации антиопухолевых препаратов в свежей крови и спинномозговой жидкости. Для однофотонной флуоресценции предельный детектируемый уровень составил $(1,3-2,5) \cdot 10^{-7}$ моль, а для двухфотонной — $(4-16) \cdot 10^{-8}$ моль [1181]. ВОФ, предназначенные для исследования биологических тканей *in vitro*, описаны в [46] (см. также главу 8). ИК-волоконный микрофлуориметр для исследования сенсibilизированных здоровых и патологических тканей разработан авторами [310].

В медицине и экологии важное место занимают датчики ионизирующего излучения (потоков нейтронов, рентгеновского и гамма-излучения). ВОД ионизирующего излучения основаны на регистрации наведенных радиацией оптического поглощения, изменения показателя преломления и геометрических размеров, люминесценции и свечения Вавилова–Черенкова [1183]. Их достоинствами являются высокая чувствительность 0,4–1,2 дБ/(км·рад) и дистанционность. При построении датчиков наиболее часто используют в качестве информационного сигнала наведенное оптическое затухание, возникающее за счет создания центров окраски в материале ВС под действием радиации. Величина затухания и скорость восстановления прежних потерь после прекращения действия радиации зависят от типа излучения, полной дозы, мощности, состава, типа и содержания примесей и легирующих добавок в материале ВС. Скорость спада затухания лежит в диапазоне 0,001–10 с.

Как правило, физические ВОД используют разнообразные преобразователи на рабочем конце ВС. Наибольший интерес для биомедицинских применений имеют датчики температуры и давления, которые оказываются наиболее разработанными в настоящее время [1161, 1162, 1165, 1182]. ВОД температуры находят применение, например, для контроля температуры биоткани при лечении раковых заболеваний с помощью СВЧ-терапии, когда электронные датчики оказываются не пригодными. Кроме того, малые размеры ВОД, достаточная чувствительность ($\pm 0,1^\circ\text{C}$ в физиологическом диапазоне температур), возможность одновременного контроля температуры в различных частях объекта делают их привлекательными во многих случаях. Лучшие ВОД-термометры имеют чувствительность порядка 10^{-5}°C и погрешность измерений 0,0025 %, что превышает потребности биомедицинских исследований сегодняшнего дня.

Один из наиболее простых температурных ВОД состоит из тонкой пленки жидкого кристалла на дистальном конце ВС. В зависимости от температуры пленки изменяется коэффициент отражения на определенной длине волны, что и является информационным сигналом. Такая жидкокристаллическая термометрия может быть использована и для определения параметров циркуляции крови. В некоторых температурных ВОД используется зависимость от изменения температуры форм мениска или показателя преломления жидкости, что регистрируется с помощью отраженного света, или температурная зависимость интенсивности флуоресценции флуорофора, размещенного внутри дистального конца катетера. В качестве эталонного температурного ВОД может служить датчик с миниатюрным оптическим резонатором на рабочем конце ВС, коэффициент отражения которого сильно изменяется при смещении резонансной частоты, обусловленном вариациями температуры. Возможны и другие типы термометров, использующие зависимости от температуры спектра интенсивности флуоресценции, состояния поляризации и поглощения света разнообразных преобразователей на рабочем конце ВС [1161, 1162, 1165, 1182].

Для медико-биологических применений перспективен ВОД, который не имеет никаких преобразователей, а его чувствительность к температуре возникает за счет крутого изгиба ВС (рис. 5.33) [1131, 1132]. В области крутого изгиба с радиусом,

меньшим некоторого критического, все излучение покидает сердцевину ВС и выходит в оболочку (нарушенное полное внутреннее отражение (см. (5.5)), затем падает на границу раздела «оболочка — исследуемая среда» и (в зависимости от соотношения коэффициентов преломления оболочки и среды) частично или полностью уходит в среду (ход лучей в области крутого изгиба ВС показан на рис. 5.5). Чувствительность датчика к температуре может определяться как зависимостью показателя преломления, так и зависимостью коэффициента поглощения исследуемой среды от температуры. Возможно построение изогнутых датчиков и при полностью снятой оболочке в области изгиба (см. (5.6)) [1132].

ВОД давления успешно используют для контроля внутричерепного и внутрисердечного давления. Пробный зонд может быть локализован под твердой мозговой оболочкой или в области родничка у младенца. В основе работы таких ВОД лежит измерение степени натяжения мембраны, возникающее из-за изменения давления, путем регистрации изменений в распределении отраженного мембраной (или закрепленным на ней зеркалом) света с помощью систем из двух собирающих отрезков ВС. Возможны и другие варианты волоконно-оптических измерителей прогиба мембраны [1166, 1184] (см. рис. 5.34 и 5.35).

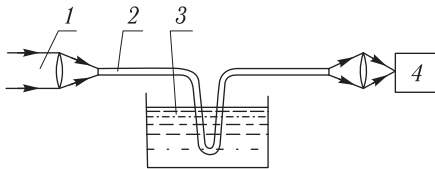


Рис. 5.33. Схема ВОД с крутым изгибом ВС: 1 — лазерное излучение; 2 — ВС; 3 — исследуемая жидкость; 4 — фотоприемник

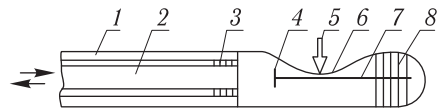


Рис. 5.34. Медицинский датчик давления: 1 — катетер; 2 — ВС; 3 — крепление ВС; 4 — зеркало; 5 — стрелка, указывающая направление силы; 6 — гибкая мембрана; 7 — плавящийся стержень; 8 — крепление стержня

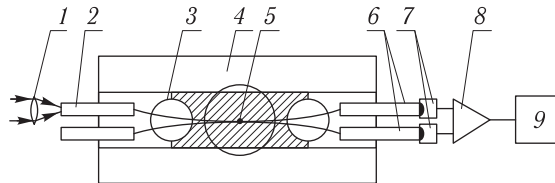


Рис. 5.35. Волоконно-оптический датчик на основе X-разветвителя [532]. 1 — лазерное излучение; 2, 6 — одномодовые ВС; 3 — эпоксидная смола; 4 — толстая мембрана; 5 — сплавной разветвитель; 7 — фотодиоды; 8 — операционный усилитель; 9 — регистрирующее и отображающее устройства

Чувствительным элементом датчика (рис. 5.35) является сплавной X-разветвитель на основе одномодового ВС [1166]. Воздействие на толстую мембрану, на которой смонтирован разветвитель, приводит к разбалансу мощности в приемных ВС, что и является информационным сигналом. Отсутствие низкочастотных собственных шумов датчика позволяет проводить измерения акустических и механических колебаний тела в диапазоне 0–30 Гц. Полностью диэлектрический датчик был использован для контроля пульса в области груди, шеи и на запястье в условиях визуализации внутренних органов с помощью техники магнитного резонанса. Сигнал

с датчика запускал аппаратуру для визуализации в нужной фазе колебаний сердца, что позволило получать высококачественные изображения внутренних органов. Авторами [1166] была продемонстрирована универсальность датчика при регистрации перепадов давления в потоках, измерений влажности (при использовании специального сенсора на основе пористого стекла).

Наряду с мембранными ВОД давления разрабатываются поляризационные и интерферометрические. В основе поляризационных датчиков лежит зависимость степени двойного лучепреломления у некоторых материалов от давления. Один из вариантов интерферометрического ВОД давления представлен в главе 7 и работе [329]. Датчики давления используют также регистрацию изменений геометрических размеров ВС, их числовой апертуры или потерь света при микроизгибах. Например, микроизгибный датчик для регистрации венозного кровотока в конечностях описан в [1174].

ВОД на основе U-образного отрезка градиентного ВС длиной 10 см, служащего в качестве интерферометра Фабри–Перо, применяется как датчик деформаций внутренних органов человека ([1161], с. 357). Неинвазивный датчик быстрых перемещений стенки грудной клетки, основанный на изменении оптической связи двух отрезков ВС (излучающего и приемного) при отражении от движущейся поверхности и использованный для высокочастотной принудительной вентиляции легких, описан в работе [1177].

Для измерений микроперемещений, деформаций и колебаний биотканей можно рекомендовать ВОД автогенераторного типа с оптической линией задержки (рис. 5.36) [1167]. Его существенным достоинством является частотная индикация полезного сигнала. В замкнутой в кольцо оптоэлектронной системе «лазер — волоконно-оптическая линия задержки (два отрезка ВС) — фотодетектор — резонансный усилитель радиодиапазона — цепь питания лазера» возникают автоколебания интенсивности излучения, частота которых определяется длиной линии задержки и частотой резонансного усилителя. При длине линии задержки, равной 30 м, колебания интенсивности происходят в диапазоне частот 28–30 МГц. Перестройка частоты осуществляется регулированием числа возбужденных мод в многомодовом ВС (максимальное число мод равно примерно 500). Поперечное смещение относительно друг друга концов ВС двух частей оптической линии задержки позволяет легко регулировать число возбужденных мод. Таким способом формируется информационный сигнал (сдвиг частоты колебаний, пропорциональный относительному смещению концов ВС). Возможно совмещение такого ВОД с разнообразными типами биосенсоров. Автогенераторный ВОД позволяет измерять колебания поверхности тела и биомембран с амплитудой 0,01–9 мкм в диапазоне частот 0–2 кГц, точность измерения перемещений (деформации) биообъектов на уровне 0,01 мкм. Он был также использован для измерений показателя преломления растворов биожидкостей, перспективен для контроля температуры, счета частиц и пр. [1167].

Бесконтактные ВО биовиброметры и визуализаторы полей вибраций поверхности кожи, компонентов внутреннего уха, голосовых связок и пр. используют разнообразные интерферометры, спекл-интерферометры или сложную, зависящую от времени спекл-модуляцию отраженного пучка [176, 346, 1184]. В наиболее простой спекл-модуляционной схеме на основе отрезков многомодовых ВС излучение лазера пропускается через многомодовый ВС, который осуществляет доставку спекл-модулированного излучения (за счет многомодовости ВС) на поверхность подвижной мембраны (поверхность кожи и пр.) через фокусирующую линзу с фокусом на поверхности объекта; рассеянное динамическое спекл-поле содержит информацию о различных компонентах движения мембраны (продольных, поперечных и угловых, вклад каждого из компонентов должен зависеть от взаимной ориентации падающего

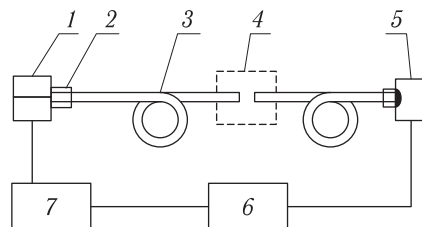


Рис. 5.36. Автогенераторный ВОД перемещений с оптической линией задержки [1167]: 1 — полупроводниковый лазер; 2 — оптический разъем; 3 — волоконно-оптическая линия задержки на основе многомодового ВС; 4 — сенсор; 5 — быстродействующий фотодиод; 6 — высокочастотный резонансный усилитель; 7 — устройство питания лазера

и регистрируемого пучков света). Временные реализации флуктуаций интенсивности рассеянного поля, зарегистрированные с помощью еще одного многомодового ВС и сопряженного с ним фотоприемника, соответствуют временным перемещениям исследуемой мембраны. Датчик чрезвычайно прост, однако требует калибровку и в ряде случаев использования специальных покрытий поверхности объекта исследований с заданными статистическими свойствами, поскольку связь измеряемых величин с реальным движением объекта является нелинейной и статистической. Такой датчик

был разработан для получения пульсограмм человека в области запястья [400, 407].

Типичные схемы химических ВОД показаны на рис. 5.37–5.39 [1134, 1135, 1152, 1185, 1193]. Успешная работа ВОД заключается в подборе устойчивого химического индикатора (колориметрического или флуоресцентного) и нанесении его на дистальный торец ВС или боковую стенку световода или помещении индикатора в сопряженный с осветительным и измерительным ВС контейнер с полупроницаемыми стенками или другой тип контейнера, в который обеспечивается подача исследуемого вещества. В качестве контейнера широко используют пористое стекло. Изготавливают также и сам ВС на основе пористого стекла, что обеспечивает высокую чувствительность химических ВОД и хорошее сопряжение с исследуемым объектом.

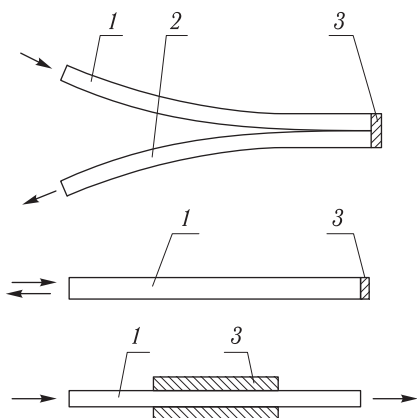


Рис. 5.37. Химические биосенсоры: 1, 2 — ВС; 3 — индикаторное вещество

В настоящее время разработано огромное количество химических индикаторов, применяемых в различных областях биомедицинской практики, которые можно использовать при конструировании новых типов химических ВОД.

Одним из первых применений химических ВОД в медицине было определение растворенных в крови газов *in vivo* [1193]. Например, для определения рН в качестве индикатора был взят краситель фенол красный, который имеет две таутомерические формы, каждая со своим спектром поглощения. Краситель является слабо ионизированной кислотой, соотношение его щелочного компонента (поглощение в зеленой области) и кислотного (поглощение в синей области) изменяется с изменением рН. В датчике используется зеленое излучение с $\lambda = 560$ нм и красное с $\lambda = 600$ нм. Зеленое излучение поглощается щелочным компонентом красителя и дает информацию о рН среды, а поглощение красного излучения не связано с рН среды и является

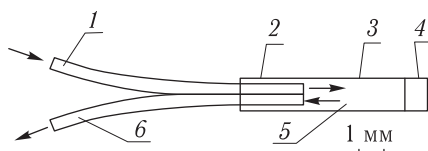


Рис. 5.38. Химический ВОД: 1 — ВО-осветитель; 2 — защитная оболочка; 3 — полупроницаемая оболочка; 4 — защитный колпачок; 5 — индикаторная система красителей; 6 — измерительный ВО (передача излучения к измерительному устройству)

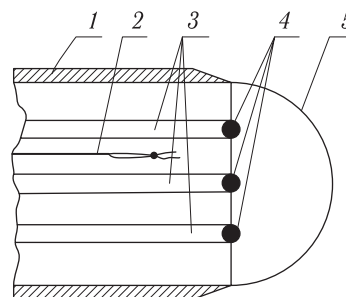


Рис. 5.39. Многоканальный пробник газового состава крови: 1 — корпус катетера; 2 — термопара; 3 — ВС; 4 — флуоресцирующие вещества, каждое из которых является отдельным индикатором рН, рСО₂ и рО₂; 5 — полупроницаемая оболочка

опорным. В качестве материала полупроницаемой оболочки используется целлюлоза. Датчик позволяет измерять рН в физиологической области (7,0–7,4) с точностью порядка $\pm 0,01$ рН. Усовершенствование процедуры измерений с привлечением более точной калибровки и компьютерной обработки данных позволяет повысить точность до $\pm 0,001$ рН [1162, 1193].

Содержание газов О₂ и СО₂ в биосистемах определяется с помощью аналогичных датчиков, использующих изменяющуюся в присутствии этих газов флуоресценцию соответствующих красителей [1134, 1135, 1162, 1193]. По О₂ диапазон измерений составляет $(0,5-300) \cdot 133$ Па с точностью 133 Па, а по СО₂ диапазон измерений равен $(0,5-100) \cdot 133$ Па (табл. 5.7). Многоканальный волоконно-оптический флуоресцентный пробник позволяет одновременно определять парциальные давления газов Н, СО₂ и О₂ в крови (см. рис. 5.39).

Таблица 5.7. Примеры применения медицинских ВОД

| Определяемый параметр | Диапазон измерений | Принцип работы |
|----------------------------|---------------------------------------|--|
| Количество О ₂ | $(0,5-300,0) \cdot 133$ Па | Тушение флуоресценции |
| Количество SO ₂ | 70–500 ppm | Тушение флуоресценции |
| Количество СО ₂ | $(0,5-100,0) \cdot 133$ Па | Индикация рН в матрице |
| Количество СО | 1–100% в атмосфере N ₂ | Химический индикатор в матрице полимерного ВС |
| Количество СН ₄ | 0,01–100% | ИК-поглощение на частоте 3016 см ⁻¹ |
| Влажность | 0,01–80,00% относительной влажности | СоСl ₂ в пористом стекле |
| Количество глюкозы | 2,8–27,8 мМ | Иммобилизованный фермент и регистрация флуоресценции |
| Количество пенициллина | 0,1–100,0 мМ | Фермент с чувствительным к рН флуоресцирующим красителем |
| Ионизирующее излучение | 10 ⁻⁴ –10 ⁸ рад | Поглощение центров окраски |

Волоконно-оптический датчик парциальных давлений O_2 и CO_2 в жидких и газообразных биологических средах, использующий целый ряд современных оптических методов и технологий, описан в [1196]. Во-первых, он использует фазовый метод (см. гл. 2, на примере исследования оптических свойств биотканей) анализа флуоресцентного отклика химического маркера исследуемого газа в среде, т. е. реагирует на изменение временных характеристик флуоресценции, что повышает надежность измерений. Во-вторых, для возбуждения флуоресценции используется полупроводниковый лазер с удвоением частоты, с результирующей длиной волны 425 нм, это излучение эффективно возбуждает одномодовые световоды и достаточно простыми средствами модулируется по интенсивности до частот порядка 200 МГц, что необходимо для реализации методик измерений флуоресценции с временным разрешением.

Определение влажности возможно с помощью ВОД на основе пористого стекла, пропитанного хлоридом кобальта. Измеряемой величиной является коэффициент отражения пористого стекла в диапазоне длин волн 500–700 нм, который существенно зависит от относительной влажности (см. табл. 5.7). Время измерений определяется скоростью проникновения воды в стекло и составляет несколько минут.

Биохимические датчики служат для определения концентрации глюкозы, белков, пенициллина, токсинов и микроорганизмов. Их работа основана на принципе специфического связывания компонентов биохимической системы и оптической индикации этого процесса [1134, 1135, 1162, 1178, 1179] (см. также табл. 5.7).

Принцип работы биохимического ВОД с ферментативным активатором исследуемого вещества и флуоресцентной индикацией основан на изменении pH среды под действием фермента, внедренного в полиакриламидную матрицу на торце ВС (рис. 5.40). В свою очередь, увеличение pH приводит к тушению флуоресценции, внедренного в эту матрицу красителя. Рассмотренный датчик был применен к определению содержания пенициллина (см. табл. 5.7).

В биохимических ВОД используются разнообразные типы взаимодействия (поглощение, упругое и неупругое рассеяние, флуоресценция, нелинейные преобразования) волноводных мод, распространяющихся в тонкой пленке на границе «сердцевина ВС — исследуемая жидкость» [1178, 1179, 1186, 1187].

На рис. 5.41 показан один из вариантов такого датчика, рабочий участок которого получен за счет удаления материала оболочки на некоторой

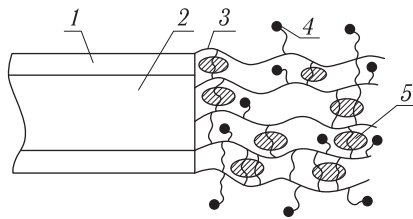


Рис. 5.40. Ферментативный оптический пробник. 1 — оболочка ВС; 2 — сердцевина ВС; 3 — полиакриламид; 4 — индикаторный флуоресцирующий краситель; 5 — фермент

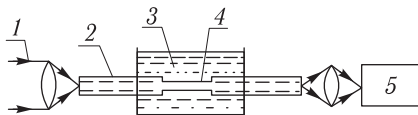


Рис. 5.41. Один из вариантов иммунного ВОД: 1 — лазерное излучение; 2 — ВС; 3 — исследуемая жидкость; 4 — рабочий участок ВС; 5 — фотоприемник

длине ВС. Он был применен для создания методики иммунной пробы без разделения компонентов образца. Антитела из образца садятся на рабочей поверхности сердцевины ВС. Появление в результате специфической реакции антиген–антитело соответствующих компонентов в образце приводит к изменению спектральных характеристик излучения на выходе ВС (поглощение, флуоресценция, КР и пр.), что служит мерой локально протекающей иммунной реакции с минимальным влиянием остального раствора. Такая идея использования нарушенного полного внутреннего

отражения (НПВО) оказалась очень плодотворной и широко используется в ВОД, включая эллипсометрические [1187], разнообразные конические и многоканальные датчики [1178, 1179]. Отметим, что датчик с крутым изгибом (см. рис. 5.33) также может выполнять указанные задачи.

Использование иммобилизованных люминесцирующих ферментов позволяет построить простые биолюминесцентные ВОД без источника света для определения концентрации АТФ, НАДН и H_2O соответственно в диапазонах $2,8 \cdot 10^{-10}$ – $1,4 \cdot 10^{-6}$, $3 \cdot 10^{-10}$ – $3 \cdot 10^{-6}$ и $2 \cdot 10^{-8}$ – $2 \cdot 10^{-5}$ М, а также контролировать протекание реакций антиген–антитело в объектах *in vitro* [1185, 1189].

Перспективными для биохимических исследований являются ВОД с биосенсором в виде ориентированных монослоев органических молекул, полученных методом Ленгмюра–Блоджетта.

Очевидно, что микроструктурные световоды (МСС) являются перспективными чувствительными элементами для биосенсоров [1202, 1207–1209, 1213–1215, 1217–1222]. Многие из известных методов волоконно-оптической биосенсорики, кратко изложенные выше, постоянно совершенствуются и осваивают новые приложения в биомедицине и могут быть реализованы с помощью МСС. Важными достоинствами МСС являются их высокая нелинейность на единицу длины, что дает компактность при использовании нелинейных явлений в сенсорах и возможность использования полых МСС в качестве интеллектуальных микрокувет/нанокювет со сравнительно большой длиной взаимодействия. В простейшем случае такие кюветы позволяют легко управлять спектром пропускания МСС при их заполнении жидкими средами с определенной дисперсией и зависящим от длины волны поглощением. Очевидно, что и характерное для исследуемого вещества зависящее от длины волны рассеяние (например, возникшее в результате биохимической или иммунологической

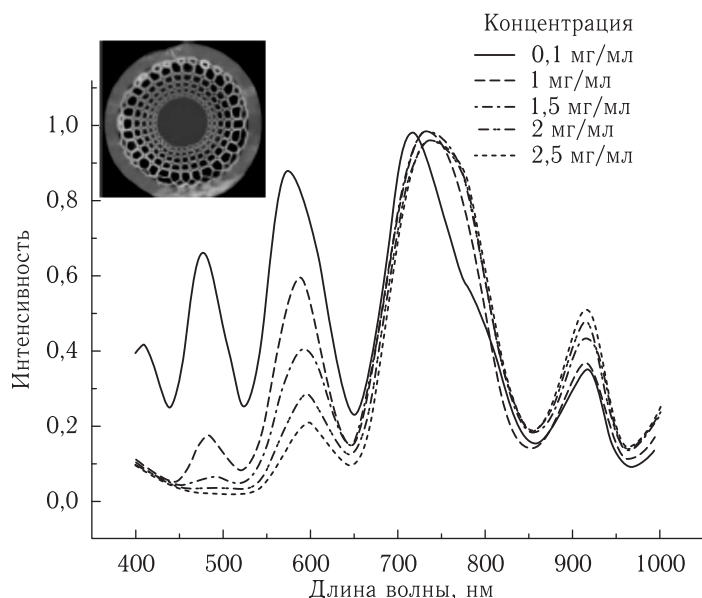


Рис. 5.42. Спектры пропускания идентичных микроструктурных световодов (МСС), заполненных водным раствором белка — холерогена при разных концентрациях, в интервале от 0,1 до 2,5 мг/мл; структура МСС показана на врезке, диаметр полых сердцевин составляет 150 мкм, а наружный диаметр — 750 мкм [1215]

реакции) также влияет на спектр пропускания МСС. В качестве примера на рис. 5.42 представлены спектры пропускания идентичных полых МСС (диаметр полый сердцевины 150 мкм), заполненных водным раствором белка — холерогена при разных концентрациях в интервале от 0,1 до 2,5 мг/мл [1215]. В данном случае деформация спектра пропускания при разных концентрациях белка в основном связана с изменением показателя преломления среды. Поэтому такой сенсор может быть квалифицирован как широкополосный рефрактометр, однако для решения обратной задачи и восстановления дисперсии исследуемого вещества требуются модельные представления о взаимодействии света разных длин волн с МСС, заполненным дисперсионной средой.

Пока не так много разработано биосенсоров с использованием МСС, есть газовые сенсоры на метан, интерферометрические сенсоры механических напряжений, сенсоры, использующие методы нелинейной спектроскопии биомолекул и др., однако эта область исследований представляется перспективной [1202, 1207–1209, 1213–1215, 1217–1222].

Глава 6

ЛАЗЕРНАЯ СПЕКТРОФОТОМЕТРИЯ И ФУРЬЕ-СПЕКТРОСКОПИЯ

6.1. Введение

При решении многих диагностических задач в биологии и медицине хорошо себя зарекомендовали *абсорбционные* методы, которые широко применяются в лазерной аналитической спектроскопии или спектроскопии ультрабыстрых процессов [1–3, 5, 9, 10, 12, 13, 17, 18, 25, 34–36, 40, 41, 53, 57, 80, 83, 88, 130–148, 151, 157–161, 205, 293, 294, 530, 551, 564–568, 712, 902, 968, 971, 1223–1273]. Они являются методами *микродиагностики*, так как дают информацию об атомной и молекулярной структуре исследуемого вещества биообъекта либо среды его обитания. К абсорбционным методам, использующим эффект поглощения света в веществе, относятся как *абсорбционно-трансмиссионные* методы, так и методы, основанные на регистрации поглощенной энергии путем измерения нагрева биообъекта ΔT (*оптико-калориметрические* методы) или интенсивности его флуоресценции $I_{\text{фл}}$ (*лазерный флуоресцентный анализ*) (рис. 6.1, 6.2). Применительно к биотканям, особенно при исследованиях *in vivo*, не всегда возможно обеспечить условия измерений на пропускание из-за сильного рассеяния (см. главы 1 и 2), поэтому абсорбционная спектроскопия реализуется в виде исследования обратно рассеянного (прошедшего толщину ткани туда и обратно) излучения, возможны и более сложные геометрии спектроскопических исследований (под одним или несколькими углами, при разной толщине, или добавлении дополнительных слоев с известными поглощающими и рассеивающими свойствами и пр.). Все это делается для того, чтобы исключить или, наоборот, учесть влияние рассеяния и неоднородности распределения поглотителей в среде, что необходимо для восстановления истинных спектров поглощения хромофоров и определения их локализации.

Методы абсорбционной спектроскопии пропускания и обратного рассеяния можно разделить на ряд групп по типу решаемых задач и используемой методики измерений. К первой группе можно отнести все *спектрофотометрические* методы, с помощью которых, в конечном итоге, получают спектр поглощения объекта ($\mu_a(\lambda)$), который, в свою очередь, можно использовать для определения концентрации отдельных хромофоров и тем самым контролировать ход метаболических процессов, развития патологий и пр. Спектрофотометрия включает в себя методы дифференциальной (разностной), производной, поляризационной и модуляционной спектроскопии, использует многопроходные методы исследования (для слабо поглощающих объектов и газов) и пр. В частности, временной и фазово-модуляционный методы диагностики биотканей, подробно описанные в главе 2, относятся именно к спектрофотометрии, так как в конечном итоге дают спектр поглощения ($\mu_a(\lambda)$), а временное разрешение используется для разделения вкладов поглощения и рассеяния.

Специфически лазерной является так называемая внутривибрационная спектроскопия [1228], которая может быть реализована в виде методов внесенных линейных потерь, индуцированной конкуренции мод или нелинейного поглощения. Казалось бы, что при исследовании биотканей и других биологических сред хорошо раз-

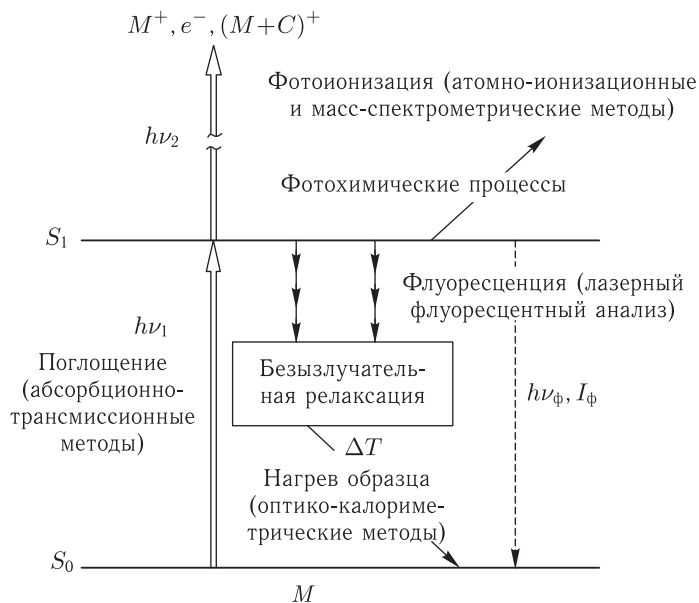


Рис. 6.1. Схема процессов возбуждения, ионизации и релаксации биомолекул M , лежащих в основе методов микродиагностики [5, 293, 294]: S_0 , S_1 — основное и возбужденное синглетные состояния молекулы M ; $h\nu_1$, $h\nu_2$ — энергии квантов возбуждающего и ионизирующего излучений; M^+ , e^- , $(M+C)^+$ — продукты ионизации; C — молекула другого типа; $h\nu_\phi$ — энергия кванта флуоресценции; I_ϕ — интенсивность флуоресценции; ΔT — приращение температуры биообъекта

витые в аналитических исследованиях методы внутривибрационной спектроскопии [293, 1225, 1226] являются непрактичными и сложными для реализации, однако использование автодинного эффекта (вариант внутривибрационной спектроскопии с внешним резонатором, когда поверхность или внутренние слои биоткани образуют внешнее дополнительное «зеркало» лазера) для исследования гемодинамики [390, 1264] или контроля абляции биотканей [1229], а также возможность получения индуцированного излучения на сенсibilизированных красителями биотканях [1230] позволяют считать этот вид лазерной спектроскопии вполне полезным и практичным. Более того, описанные в главе 5 волоконные лазеры являются по сути дела высокочувствительными датчиками разнообразных возмущений, действующих (со стороны живого объекта) непосредственно на потери в резонаторе. Эффекты конкуренции мод и поляризации в волоконном лазере также могут быть использованы для построения компактных биомедицинских датчиков.

Фурье-спектроскопия в принципе дает информацию, аналогичную спектрофотометрии, однако существенная светосила и быстроедействие фурье-спектрометров делают такой метод очень полезным в ИК-диапазоне длин волн именно в биомедицинских исследованиях [1231].

Методы *абсорбционной спектроскопии с временным разрешением* основаны на дискриминации отдельных хромофоров не по их спектрам поглощения, а по временам, отвечающим за внутреннюю динамику молекул. Помимо концентрации отдельных компонентов исследуемой среды временные методы дают принципиально иную информацию, например о скорости протекания биохимических процессов, скорости передачи возбуждения между молекулами и пр. [293, 294]. Методы абсорбционной

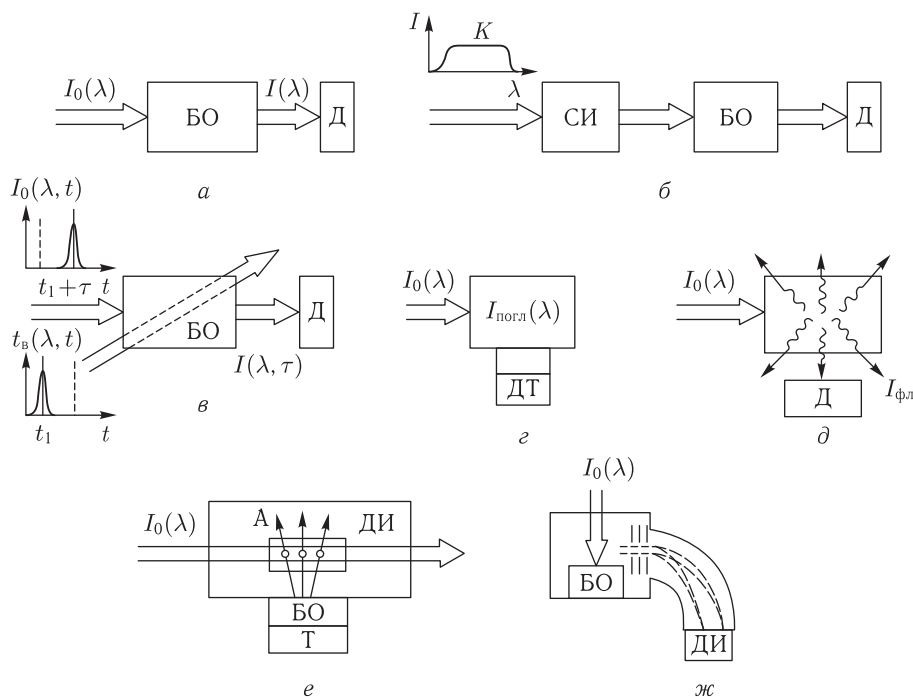


Рис. 6.2. Схемы устройств для микродиагностики: *a* — абсорбционно-трансмиссионный спектрометр; *б* — фурье-спектрометр; *в* — абсорбционный спектрометр с временным разрешением; *г* — оптико-калориметрический спектрометр; *д* — флуоресцентный спектрометр; *е* — атомно-фотоионизационный анализатор; *ж* — масс-спектрометр с фотоионизацией. БО — биологический объект; Д — детектор фотонов; К — континуум; СИ — сканирующий интерферометр; ДТ — датчик температуры; ДИ — детектор ионов; I_0 , I , I_B , $I_{\text{погл}}$, $I_{\text{фл}}$ — интенсивности падающего, прошедшего, возбуждающего, поглощенного и флуоресцентного потоков излучения; Т — нагревательный тигель; А — поток атомов; τ — время задержки зондирующего импульса света относительно возбуждающего [5, 293, 294]

спектроскопии с временным разрешением имеют различные модификации, включая использование широкополосных лазерных источников для создания пробных пучков, переменных линий оптической задержки, одиночных возбуждающего и пробного импульсов, дифференциальные и поляризационные методики.

6.2. Спектрофотометрия

Измерение спектров пропускания веществ в различных агрегатных состояниях является основой спектрофотометрии, отличающейся чрезвычайной простотой, универсальностью, сравнительно высокой чувствительностью и точностью анализа, вполне достаточных при решении многих задач фундаментальной и прикладной медицины. Измерение спектров пропускания основано на регистрации интенсивности падающего I и прошедшего в поглощающей среде путь z света I в зависимости от длины волны λ :

$$I(\lambda, z) \equiv I_0(\lambda) \cdot \exp[-\mu_a(\lambda)z], \quad (6.1)$$

$$\mu_a(\lambda) = \sigma_a(\lambda)N, \quad (6.2)$$

где $\mu_a(\lambda)$ — коэффициент поглощения; $\sigma_a(\lambda)$ — эффективное поперечное сечение поглощающих частиц, см²; N — их плотность, см⁻³. Предполагается, что интенсивность падающего света очень мала. Для небольших коэффициентов поглощения, когда $\exp[-\mu_a(\lambda) \cdot z] \approx 1 - \mu_a(\lambda) \cdot z$, легко найти, что

$$\mu_a(\lambda) \approx \frac{I_0(\lambda) - I(\lambda, z)}{I_0(\lambda)} \cdot z \equiv \frac{\Delta I(\lambda, z)}{I_0(\lambda) \cdot z}. \quad (6.3)$$

В нелазерных спектрофотометрах используются широкополосные источники света, а перестройку по длинам волн осуществляют с помощью призм или дифракционных решеток. Они имеют разрешающую способность, $\Delta\lambda$, от нескольких до сотых долей нанометра. Если ширина линии поглощения равна $\delta\lambda$, а $I_0(\lambda)$ несильно меняется в интервале $\Delta\lambda$, то

$$\Delta I/I_0 \sim \mu_a(\lambda) \delta\lambda / \Delta\lambda, \quad (6.4)$$

где $\mu_a(\lambda)$ — коэффициент поглощения, усредненный по всей линии поглощения [980]. Отсюда следует вывод, что для узких линий поглощения чувствительность зависит не только от способности прибора зарегистрировать малые изменения ΔI на фоне значительного прошедшего сигнала, но и от разрешающей способности прибора. Обычно предельная чувствительность достигается при $\Delta I/I \geq 10^{-4} - 10^{-5}$.

Отметим, что методы измерения пропускания или поглощения света веществом, как правило, являются дифференциальными, так как в процессе измерений происходит сравнение свойств исследуемого объекта с контрольным образцом, которое реализуется как в однолучевых, так и двухлучевых дифференциальных спектрометрах [551, 1224].

Большинство биологических объектов представляет собой гетерогенные вещества со сложными спектрами поглощения, в которых спектральные линии отдельных компонентов сильно перекрываются и имеют различные параметры, что затрудняет количественное определение концентрации этих компонентов. В качестве примера на рис. 1.12 [209] представлен спектр пропускания 3 мм слоя ткани молочной железы; видны линии поглощения оксигемоглобина, жировой ткани и воды. Для разделения вкладов отдельных компонентов в результирующий спектр используются методы производной спектрофотометрии, основанные на применении разнообразных алгоритмов, аналоговых и цифровых устройств дифференцирования спектров, позволяющие существенно повысить информативную способность спектрофотометрии при изучении биообъектов [1224, 1227, 1232].

Более тонкие разновидности абсорбционно-трансмиссионной спектроскопии биообъектов связаны с исследованиями поляризационных характеристик их поглощения. Они дают информацию о взаимной ориентации поглощающих молекул, конформации биомолекул, путях миграции энергии и пр. Основу поляризационных методов составляют методы линейного и кругового дихроизма и дисперсии оптического вращения [1224].

Прежде чем обсуждать преимущества использования лазеров при снятии спектров пропускания, отметим, что в распоряжении исследователей имеется широкий набор лазеров, перекрывающих весь мыслимый диапазон длин волн от рентгеновского до дальнего ИК-излучения (см. главу 4). Лазеры имеют чрезвычайно узкие линии и высокие значения спектральной плотности мощности излучения, на многие порядки величины превосходящие аналогичные характеристики для тепловых источников. Для многих применений, особенно когда речь идет о простых устройствах медицинской диагностики, перспективны лазеры, работающие на фиксированных длинах волн, особенно те из них, которые работают на нескольких длинах волн одновременно.

Итак, использование лазеров позволяет: 1) существенно повысить спектральную разрешающую способность метода, определять даже форму и структуру линий поглощения молекул; 2) для узких линий поглощения несколько повысить чувствительность; 3) в некоторых случаях упростить и удешевить экспериментальную установку, поскольку монохроматор (обычно составляющий наиболее объемную и дорогую часть установки) при наличии лазера оказывается ненужным (следует, однако, помнить, что некоторые перестраиваемые лазеры также представляют собой технически сложные и дорогие устройства); 4) за счет высокой спектральной плотности излучения лазеров снизить влияние шумов фотоприемного устройства (сам лазер из-за нестабильности выходной мощности и частоты может внести погрешности в результаты измерений, поэтому необходим контроль или стабилизация параметров лазера, что довольно просто реализуется на практике); 5) за счет высокой направленности и пространственной когерентности лазерного излучения осуществить дистанционные и трассовые измерения поглощения. В случае слабого поглощения в газах и жидкостях можно применять многоходовые кюветы, насчитывающие 30–100 проходов [293], а также полые стеклянные и кварцевые волокна длиной до 150 м [1223]. Преимущества лазерных источников света особенно проявляются в ИК-области спектра при исследованиях отдельных вращательных линий колебательных полос, которые обычными спектральными приборами не разрешаются.

Итак, пороговая чувствительность абсорбционного метода определяется способностью аппаратуры определять наименьшее значение отношения $\Delta I_{\min}/I$ (см. (6.3)). Порог чувствительности может быть охарактеризован по оптической плотности [293]:

$$D_{\min} \equiv (\mu_a d)_{\min} \approx \Delta I_{\min}/I, \quad (6.5)$$

или по коэффициенту поглощения:

$$(\mu_a)_{\min} = (1/d)\Delta I_{\min}/I, \quad (6.6)$$

где d — длина образца. Обычно система регистрации с использованием лазеров обеспечивает $\Delta I_{\min}/I = 10^{-5}$. Минимальное количество детектируемых на пути лазерного пучка радиусом w примесных молекул

$$M_{\min} = (\pi w^2/\sigma_a)(\Delta I_{\min}/I), \quad (6.7)$$

их абсолютная концентрация определяется соотношением

$$N_{\min} = (1/\sigma_a d)(\Delta I_{\min}/I), \quad (6.8)$$

а относительная (минимально обнаружимая) концентрация

$$c_{\min} = (1/\sigma_a d N_0)(\Delta I_{\min}/I). \quad (6.9)$$

При $w = 0,6$ см, $\sigma_a = 10^{-17}$ см², $d = 10$ см, $N_0 = 10^{18}$ см⁻³ (полное число молекул смеси), $\Delta I_{\min}/I = 10^{-5}$, $M_{\min} \approx 10^{12}$, $N_{\min} \approx 10^{11}$ см⁻³, $c_{\min} \approx 10^{-7}$ (100 ppb), $(\mu_a)_{\min} \approx 10^{-6}$ см⁻¹.

Применение многоходовых кювет, модуляционных и дифференциальных методов измерения полезного сигнала позволяет существенно повысить чувствительность [293]. Если амплитудная модуляция интенсивности зондирующего излучения и модуляция поглощения могут быть реализованы при использовании любых источников света, то многократное прохождение среды (до 100 раз) и частотную модуляцию зондирующего излучения можно осуществить только при использовании лазеров. Таким способом была получена рекордная для ИК-спектрометров на инжекционных лазерах пороговая чувствительность $(\mu_a)_{\min} = 3 \cdot 10^{-10}$ см⁻¹. Для лазерных спектрометров из-за высокой когерентности света сильным мешающим

фактором являются интерференционные эффекты в оптической схеме устройства, что, в основном, и определяет достигнутые значения $(\mu_a)_{\min}$. Тщательная юстировка спектрометра, устранение обратных отражений и рассеянных потоков, а также использование корреляционных методик обработки полезного сигнала позволяют снизить этот порог.

Отметим, что в ряде случаев, например при использовании газов, возможно построение лазерных спектрометров для абсолютных измерений концентрации с относительной погрешностью в 1–3% [1225, 1226]. Разработка абсолютных методов измерения необходима для анализа нестабильных газов или сверхмалых их количеств, когда нет возможности создания или хранения эталонов.

Существенно повысить чувствительность (в 10^2 – 10^5 раз) можно при использовании внутрирезонаторного поглощения, когда кювета с исследуемым веществом размещается внутри резонатора [293, 980, 982, 1223], поскольку автоматически реализуется большое число проходов (до нескольких сотен, если исследуемый объект не вносит значительных потерь) и измеряется не отношение $\Delta I/I$, а само значение ΔI . Кроме того, в режимах генерации связанных волн (многомодовый двухзеркальный лазер или кольцевой лазер) эффекты конкуренции волн существенно повышают чувствительность лазеров к изменениям потерь внутри резонатора. Однако существуют факторы, несколько снижающие чувствительность метода (например, технические флуктуации лазера [982, 993]) или вообще не позволяющие его использовать (сильно поглощающие или сильно рассеивающие биообъекты). Внутрирезонаторный метод перспективен для регистрации очень слабых линий поглощения веществ, загрязняющих атмосферу, короткоживущих продуктов биохимических реакций, радикалов и нестабильных молекул [293]. Для создания высокочувствительных спектрометров, работающих на принципе измерения внутрирезонаторного поглощения, в большей степени подходят перестраиваемые лазеры с широкими линиями и значительным запасом по усилению. В видимой области — это лазеры на красителях, в ИК-области — лазеры на центрах окраски [666] (см. главу 4).

Внутрирезонаторная спектроскопия с призмой полного внутреннего отражения внутри резонатора, когда внешняя часть трехзеркального резонатора образуется призмой полного внутреннего отражения (ПВО) с нанесенным на рабочую поверхность исследуемым материалом, может быть использована для высокоточных измерений показателя преломления жидких биологических сред, например образцов крови [1265]. Ряд схем внутрирезонаторной спектроскопии с ПВО-призмой, описан в работе [1266]. Метод был использован для исследований различий в показателе преломления образцов крови от здоровых и больных пациентов, а также при воздействии лазерного излучения терапевтических доз на кровь. Очевидно, что он может быть использован и для измерения комплексного показателя преломления, т. е. поглощения (см. выражение (1.2)).

Абсорбционно-трансмиссионный анализ весьма универсален и с успехом применяется при исследовании биологических сред в различных агрегатных состояниях. Газовый анализ, например, необходим при определении газообразных компонентов жизнедеятельности живых организмов, следовых концентраций загрязняющих веществ и пр. Для лазерного контроля загрязнений атмосферы разработаны многочисленные средства, многие из которых основаны на измерении поглощения [293, 982]. Контроль осуществляют путем отбора проб с последующим абсорбционным анализом в многоходовых кюветах пониженного давления. Проводят также трассовые измерения поглощения загрязняющих компонентов. Обычно загрязнители имеют характерные линии поглощения в ИК-области спектра, поэтому наиболее часто используются лазерные спектрометры на основе диодных и молекулярных лазеров, обеспечивающих необходимую перестройку в диапазоне длин волн 2,5–46,2 мкм.

Для диодных лазерных спектрометров порог обнаружения таких загрязнителей воздуха, как SO_2 , N_2O , NH_3 и NO_2 , находится в пределах от 1 ppb до 10 ppt (ppb = 10^{-7} %; ppt = 10^{-4} %), для HCl — около 0,1 ppm, для HF — около 0,5 ppm. Можно определять содержание HCN , H_2O , CH_4 , C_2H_6 в сигаретном дыме, а также содержание токсических примесей в выхлопных газах автомобилей, например бензола, на уровне 1 ppm [293]. Диодная лазерная спектроскопия успешно применяется для анализа содержания CO , NO , $^{14}\text{NH}_3$, $^{15}\text{NH}_3$, C_2H_4 , C_2H_2 в выдыхаемом человеком воздухе [1233, 1267, 1268]. Высокие чувствительность и быстродействие спектрометров позволили, например, изучить динамику газообмена в легких курильщика и спортсмена. С привлечением анализа содержания в выдыхаемом воздухе других газов, например NH_3 , изотопов ^{12}CO и ^{13}CO , существует возможность контроля некоторых биохимических процессов в организме человека, а также диагностики ряда заболеваний — диабета, дисфункции кишечника, легких, печени и пр. В зависимости от регистрируемых газов требуемая чувствительность составляет 0,5–50 ppb и быстродействие — 0,1–5 с.

Применение непрерывно перестраиваемого ИК лазерного источника (2,7–4,5 мкм) на основе нелинейного смешения излучения лазера на красителе (550–660 нм) с излучением второй гармоники АИГ:Nd-лазера (532 нм) позволило регистрировать концентрации ацетона в воздухе, меньшие 50 мкг/л, при длине кюветы в 1 м [1234]. Увеличение длины кюветы до 10 м дает возможность регистрировать концентрации ацетона на уровне его содержания в выдыхаемом воздухе здорового человека (3 мкг/л), а также больных диабетом детей (20–370 мкг/л) и взрослых (3–50 мкг/л). Для CO_2 -лазера с дискретной перестройкой частоты измерения при атмосферном давлении методом дифференциального поглощения (зондирование атмосферы на двух длинах волн) дают порог обнаружения типичных органических молекул загрязнителей порядка $2,5 \cdot 10^{-10}$ – $3,0 \cdot 10^{-7}$ %/м [982].

Биологические объекты большей своей частью представляют конденсированные среды. Линии поглощения таких сред значительно уширены, поэтому высокая степень монохроматичности лазерного излучения не требуется. Однако лазеры и в этих случаях оказываются весьма полезными. Во-первых, узкая линия их излучения позволяет отстраиваться от центра линии поглощения сред с высокой оптической плотностью и тем самым обеспечивать линейную зависимость поглощения от концентрации. Во-вторых, высокая спектральная яркость лазеров позволяет проводить измерения поглощения в оптически плотных образцах. Например, для инжекционных лазеров $D_{\max} \equiv (\mu_a d)_{\min} \approx 12$ [293].

Содержание кислорода, углекислого газа, окиси углерода, воды и других веществ (включая различные продукты метаболизма: мочевину, глюкозу, ацетон и пр.), растворенных в крови человека, является важнейшей информацией о жизненно важных процессах, происходящих в организме [34]. Измерение степени насыщения крови кислородом основано на значительных изменениях в спектрах поглощения насыщенной и ненасыщенной кислородом крови. Например, потеря гемоглобином крови кислорода приводит к шестикратному увеличению коэффициента поглощения цельной крови на ИК-линии с $\lambda = 960$ нм (см. табл. 3.1). Это дает возможность определять содержание кислорода в крови при использовании ИК-полупроводниковых лазеров или светодиодов, излучение которых глубоко проникает в биоткань. Для повышения точности, а также обеспечения абсолютных измерений концентрации гемоглобина и оксигемоглобина используют измерение диффузного отражения на нескольких длинах волн в видимой и ближней ИК-области спектра, включая изобестическую длину волны с $\lambda = 805$ нм, для которой коэффициенты поглощения насыщенной и ненасыщенной кислородом крови совпадают (см. табл. 3.1).

Можно измерять коэффициент пропускания тонкого слоя ткани в области между большим и указательным пальцем человека, в ушной раковине и т. д., либо использовать призму полного внутреннего отражения в виде пластины с несколькими отражениями, по которой пропускается свет и которая прикладывается к исследуемому объекту (кожа, язык и пр.). Отражательные методики являются более универсальными и, как правило, используют волоконно-оптические пробники для сопряжения с измерительным блоком, в частности, при исследовании внутренних органов применяют волоконно-оптические зонды [80].

Оптическая неоднородность биологических сред в значительной мере усложняет или даже делает невозможным измерение спектров пропускания, вызывает необходимость переходить к другим способам измерения спектров поглощения. При наличии рассеяния коэффициент $\mu_a(\lambda)$ из (6.1), (6.2) имеет уже смысл коэффициента ослабления и определяется концентрацией не только поглотителей, но и рассеивателей на пути лазерного пучка. Выражения (6.1) и (6.2) сохраняют свою форму при $\sigma_a = \sigma_t$. Эффективное сечение ослабления учитывает как поглощение, так и рассеяние:

$$\sigma_t = \sigma_a + \sigma_s. \quad (6.10)$$

Для сферических частиц радиуса a

$$\sigma_t = (Q_a + Q_s)\pi a^2. \quad (6.11)$$

Коэффициенты Q_a и Q_s в общем случае определяются на основании теории Ми. Для малых частиц ($a \ll \lambda$, $|m|2\pi a/\lambda \ll 1$, m — комплексный показатель преломления частицы) в приближении Рэлея

$$\begin{aligned} Q_a &= -4(2\pi a/\lambda) \operatorname{Im}[(m^2 - 1)/(m^2 + 2)], \\ Q_s &= (8/3)(2\pi a/\lambda)^4 [(m^2 - 1)/(m^2 + 2)]^2. \end{aligned} \quad (6.12)$$

Максимальное значение Q_a и Q_s достигается при $a \sim \lambda$ и составляет примерно 1–5, что следует из теории Ми. При наличии многих компонентов, поглощающих и рассеивающих свет, что также характерно для биосистем, (6.2) имеет вид

$$\mu_t(\lambda) = \sum_i \sigma_{ti}(\lambda) N_i, \quad (6.13)$$

где $\sigma_{ti} = \sigma_{ai} + \sigma_{si}$; N_i — плотность частиц i -го компонента.

Очевидно, в таких условиях в рамках спектрофотометрической методики поглощение не может уже быть определено без привлечения характеристик рассеяния, рассмотренных в главах 1 и 2. Для сравнительно прозрачных сред используют комбинированные методики, в основе которых лежит измерение спектров диффузного отражения биообъектов и спектров пропускания. Например, при исследованиях параметров крови (определении процентного содержания кислорода в цельной крови, концентрации общего (тотального) гемоглобина крови, концентрации метгемоглобинов) представляет большой интерес метод, использующий измерение диффузного коэффициента отражения R_d и относительного пропускания слоев крови разной толщины τ_{12} [1235, 1236]. В этом случае показатель поглощения единичной толщины

$$\mu_a(\lambda) = y(\lambda) \ln \tau_{12}(\lambda)/(d_2 - d_1), \quad (6.14)$$

где d_1 и d_2 — толщины двух слоев; y — параметр, определяемый по измеренному коэффициенту отражения:

$$R_d(\lambda) = \frac{0,51 \exp\{-5,2y(\lambda)\}}{1 - 0,48 \exp\{-4y(\lambda)\}}. \quad (6.15)$$

При исследовании толстых тканей (например, молочной железы) в условиях многократного рассеяния коллимированное пропускание может быть описано на основании достаточно простых соображений, учитывающих, что за счет многократного рассеяния эффективный путь фотона в среде до его поглощения будет больше, чем толщина ткани. А именно, согласно [491]], для плоского слоя толщиной d в диффузионном приближении средняя длина пробега фотона

$$L = \frac{\mu_d}{2\mu_a\mu'_s} \cdot \frac{(\mu'_s d - 1) \exp(2\mu_d/\mu'_s) - (\mu'_s d + 1)}{\exp(2\mu_d/\mu'_s) - 1}, \quad (6.16)$$

где μ_d определяется соотношением (2.7). С учетом (6.1) и (1.1) при согласовании показателей преломления на границах ($n = 1$) коллимированное пропускание может быть записано в виде [506]

$$T_c(\lambda) = x_1 \exp[-\mu_a(\lambda)L(\lambda)x_2], \quad (6.17)$$

где $L(\lambda)$ отражает зависимости $\mu_a(\lambda)$ и $\mu'_s(\lambda)$; x_1 и x_2 — не зависящие от длины волны подгоночные параметры, необходимые для согласования с абсолютными значениями спектральных составляющих измеренных спектров пропускания, x_1 учитывает геометрию эксперимента и потери рассеянных фотонов, которые не попадают на фотодетектор, x_2 компенсирует неточности в определении толщины ткани и редуцированного коэффициента рассеяния μ'_s .

Полуэмпирическое соотношение (6.17) успешно использовалось для восстановления спектров поглощения тканей молочной железы из измерений спектров коллимированного пропускания *in vivo* и определения концентрации отдельных поглотителей в тканях: воды (H_2O), жира (f), гемоглобина (Hb) и оксигемоглобина (HbO) [506]:

$$\mu_a = c_{\text{H}_2\text{O}}\sigma_{\text{H}_2\text{O}} + c_f\sigma_f + c_{\text{Hb}}\sigma_{\text{Hb}} + c_{\text{HbO}}\sigma_{\text{HbO}}, \quad (6.18)$$

где σ_i — сечение поглощения i -го компонента.

При варьировании концентрации отдельных компонентов измеренные спектры пропускания хорошо описывались с помощью соотношения (6.17), коэффициенты корреляции всегда были больше 0,99. На рис. 6.3 показан спектрометр для измерений спектров коллимированного пропускания молочной железы *in vivo*, а также примеры измеренных спектров для нормальной и патологической ткани (раковая опухоль) и соответствующие восстановленные спектры поглощения для определенного набора концентраций четырех компонентов ткани (см. (6.18)). Наибольшие различия в спектрах имеют место в области 900–1000 нм, что в основном связано с различиями в содержании жира и воды в нормальной и патологической ткани, однако регистрируемые отличия между доброкачественными и злокачественными изменениями ткани (мастопатия и карцинома) не так заметны, поэтому требуется дальнейшее развитие методики.

Значительные успехи имеет спектрофотометрия ближнего ИК при исследовании степени оксигенации тканей мозга новорожденных и плода [88]. Достаточная прозрачность для ИК-света тканей головы новорожденного и ее небольшие размеры, а также доступность спектрометров с охлаждаемыми матричными детекторами позволили создать спектральные системы визуализации участков тканей мозга с различной степенью оксигенации. В последние годы круг решаемых задач в области спектроскопии ближнего ИК биотканей существенно расширился, в основном за счет применения методик с временным и пространственным разрешением, а также совершенствования фотоприемных устройств [12, 13, 41, 88]. В мире насчитывается уже более 500 коммерческих клинических приборов разной степени сложности для

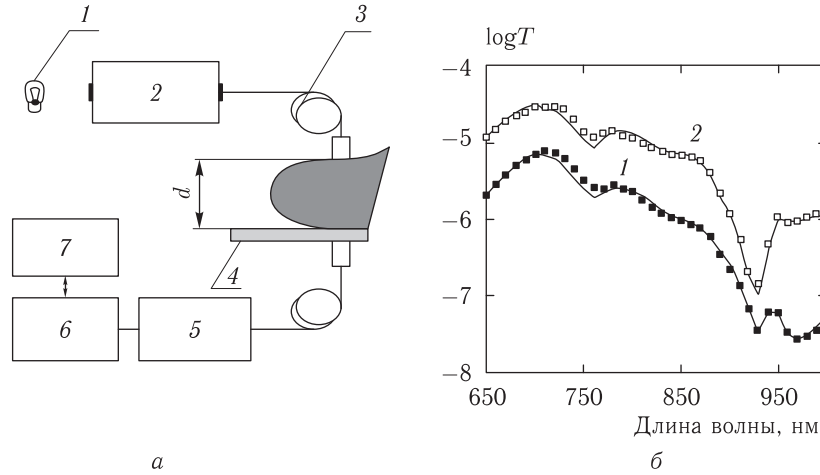


Рис. 6.3. Спектрометр для измерений спектров пропускания молочной железы *in vivo* [506] (а): 1 — вольфрамовая лампа, 2 — монохроматор с $\lambda = 550\text{--}1050$ нм, 3 — волоконный кабель, 4 — прозрачная пластина, 5 — кремниевый фотодиод, 6 — усилитель с фазовым детектором, 7 — компьютер; спектры пропускания молочной железы (б): 1 — в области карциномы, 2 — в аналогичной по расположению области, но на другой здоровой молочной железе

мониторинга степени оксигенации, содержания цитохром оксидазы и гемодинамики биотканей. Некоторые из них представлены в табл. 2.3 и 2.4.

Для многих биотканей измерения *in vivo* оказываются возможными только в режиме отражения. Соответствующее соотношение может быть записано на основе диффузионного приближения. Для полубесконечной среды, близкой к коллимированному освещению и приему отраженного света при малой площади источника и приемника (пара световодов — источник и приемник), диффузионное уравнение (2.6) решается в замкнутой форме [1232, 1244]:

$$R = \frac{z_0 A}{2\pi} \left[\frac{\mu_d}{\rho^2 + z_0^2} + \frac{1}{(\rho^2 + z_0^2)^{3/2}} \right] \exp[-\mu_d(\rho^2 + z_0^2)^{1/2}], \quad (6.19)$$

где $z_0 = K/\mu'_s$ — эффективная длина; K — безразмерная константа, величина которой зависит от коэффициента отражения на поверхности; A — площадь детектора; μ_d — определяется соотношением (2.7); ρ — расстояние между источником и приемником.

Типичный спектрометр отражения для измерений *in vivo* и соответствующие спектры для нормальной и патологической ткани показаны на рис. 6.4 [80]. Различные участки спектра определяются поглощением различных хромофоров ткани. Область 400–440 нм соответствует полосе Соре гемоглобина, однако определенный вклад дают флавины, бета каротин, билирубин, цитохром и др., в то время как область 540–580 нм соответствует Q-полосе гемоглобина с малым вкладом в суммарное поглощение цитохрома и других компонентов. На различиях во вкладах поглотителей в отдельные полосы и основана диагностика различных патологических изменений ткани. Методики диагностики *in vivo* используют либо соотношение интегральных коэффициентов отражения по выделенным полосам, либо измерение наклона спектральных кривых по отдельным участкам спектра (производная спектроскопия) [80, 1232].

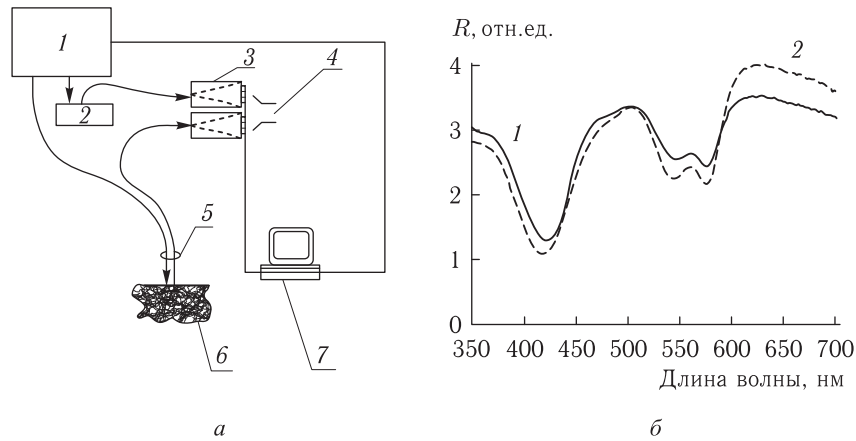


Рис. 6.4. Спектрометр для измерений *in vivo* спектров отражения внутренних органов [80] (а): 1 — ксеноновая дуговая лампа, 2 — стандартный отражатель, 3 — встроенные в компьютер спектральные чипы, 4 — линейки фотодетекторов, 5 — волоконно-оптический пробник, 6 — биоткань, 7 — компьютер. Спектры отражения (б): 1 — нормальная слизистая, 2 — частично злокачественная аденома, измерения в прямой кишке у больного простатитом

Для некоторых многослойных биотканей, например кожи, кинетика спектров отражения при изменении поглощения в отдельных слоях может быть рассмотрена в модели, оперирующей с некоторыми усредненными коэффициентами пропускания и отражения слоев [250, 567, 568, 902, 971]. Например, в предположении, что три первых слоя кожи (роговой слой с верхним эпидермисом, слой меланина между эпидермисом и дермой, а также слой гемоглобина крови) дают существенно меньший вклад в отражение (обратное рассеяние) по сравнению с коллагеном дермы, спектр полного коэффициента отражения кожи рассчитывается по формуле

$$R(\lambda) = T_1^2(\lambda)T_2^2(\lambda)T_3^2(\lambda)R_4(\lambda), \quad (6.20)$$

где T_1 , T_2 , T_3 и R_4 — соответственно зависящие от длины волны коэффициенты пропускания и отражения слоев эпидермиса, меланина, крови и коллагена.

Для спектров отражения кожи человека при разной степени эритемы, вызванной УФ-облучением, хорошо видна кинетика изменений спектров отражения в зависимости от содержания гемоглобина в коже (изменение внешнего механического давления на кожу) [250, 567, 568] (рис. 6.5). В качестве другого примера применения спектрофотометрии на рис. 6.6 представлена лазерная электронно-спектральная универсальная лабораторная установка ЛЭСА-01-УЛ-БИОСПЕК

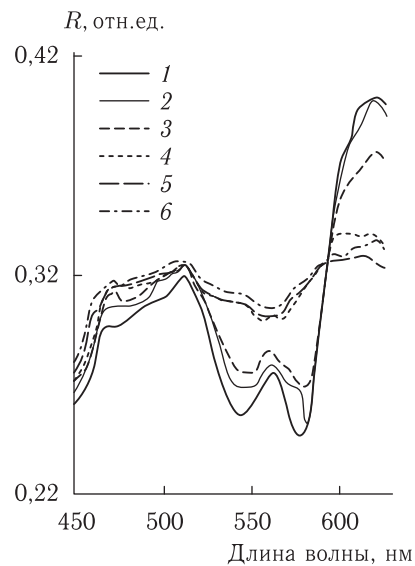


Рис. 6.5. Измеренные *in vivo* спектры отражения кожи с эритемой (3 суток после УФ-облучения) при разных значениях внешнего механического давления (кПа) на кожу: 1 — 0; 2 — 28; 3 — 56; 4 — 84; 5 — 110; 6 — 140 [250, 567, 568]

[1269–1272], в которой основным элементом является разработанный авторами ПЗС-спектрометр на дифракционной решетке, включающий волоконно-оптический катетер, который состоит из центрального облучающего световода и окружающих его шести принимающих отраженное излучение (либо излучение флуоресценции) световодов. В качестве источника излучения служит либо широкополосная лампа для снятия спектров отражения либо лазер для измерения отражения на длине волны лазера или для возбуждения флуоресценции. Показаны измеренные на этой установке спектры гемоглобина в процессе дезоксигенации гемоглобина при лазерном облучении раствора гемоглобина, содержащего фотосенсибилизатор (метиленовый синий), как пример исследований биологических сред *in vitro* (рис. 6.6, б), а также спектры экстинкции ткани, рассчитанные из спектров отражения, измеренных до и после внутривенного введения фотосенсибилизатора Фотосенс в дозе 0,8 мг/кг веса пациента, как пример исследований *in vivo* (рис. 6.6, в).

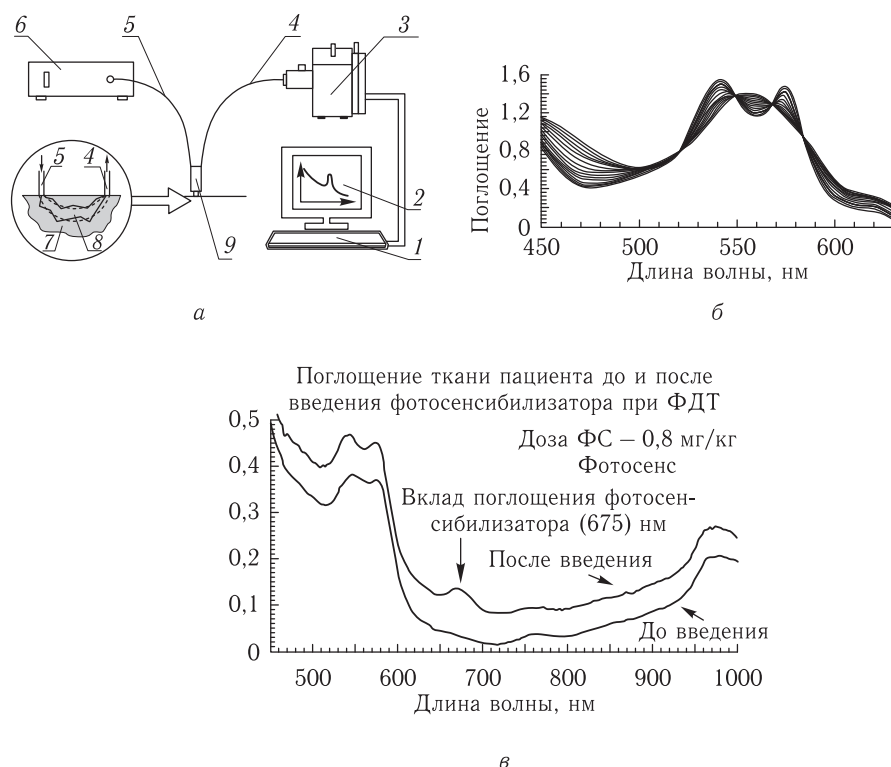


Рис. 6.6. Лазерная электронно-спектральная универсальная лабораторная установка ЛЭСА-01-УЛ-БИОСПЕК [1269–1272] (а): 1 — компьютер, 2 — спектр отражения, 3 — ПЗС-спектрометр на дифракционной решетке, 4 — принимающий волоконно-оптический катетер, 5 — облучающий волоконно-оптический катетер, 6 — источник излучения (широкополосная лампа или лазер), 7 — биологическая ткань, 8 — зондируемый объем в форме «банана», 9 — держатель волоконно-оптических катетеров. Кинетика спектров гемоглобина при его дезоксигенации в условиях лазерного облучения раствора гемоглобина, содержащего фотосенсибилизатор (метиленовый синий) (б). Спектры экстинкции ткани, рассчитанные из спектров отражения, измеренных до и после внутривенного введения фотосенсибилизатора Фотосенс в дозе 0,8 мг/кг веса пациента; появление пика на длине волны 675 нм связано с вкладом фотосенсибилизатора (в)

Измерение отражения кожи тела или губ в ближней ИК-области позволяет определять содержание глюкозы в ткани [34, 564–566, 1242, 1243, 1248, 1249]. Для метода с использованием волн фотонной плотности (частота возбуждения 120 МГц, см. раздел 2.3) при измерениях *in vivo* на длине волны 850 нм диапазон измеряемых концентраций равен 0,8–1,5 мг/мл с ошибкой $\pm 0,025$ мг/мл (соответствующие изменения приведенного коэффициента рассеяния μ'_s составляют примерно 0,6 %/мМ). Для отражательной спектрофотометрии *in vivo* с пространственным разрешением (см. (6.19)) на $\lambda = 650$ нм чувствительность по μ'_s составляет 0,11 %/мМ [565], что пока ниже требуемой для клинических применений (современные инвазивные методы дают точность 0,5 мМ при измерении концентрации на уровне 5 мМ).

Представленные спектрофотометрические методики для клинических исследований требуют зачастую не только относительных измерений спектров отражения, но и достаточно точного определения абсолютных значений концентрации тех или иных хромофоров (гемоглобина, оксигемоглобина, глюкозы и пр.) по этим спектрам. Для абсолютных измерений используют внутренний спектральный эталон — спектр поглощения воды [1241]. Для многих биотканей в норме и в различных патологических состояниях достаточно хорошо известно содержание воды (с точностью до нескольких процентов), при этом в ближней ИК-области спектра на ряде линий поглощения определяется практически только поглощением воды (см. рис. 1.12), поэтому возможна достаточно точная калибровка измеряемых спектров и соответственно абсолютное определение концентрации интересующего хромофора. Сочетание такой калибровки с техникой двукратного дифференцирования спектров и процедурой многолинейной регрессии при согласовании дифференциальных спектров воды и гемоглобина позволяет получать абсолютные значения гемоглобина в двух его формах и суммарное кровенаполнение мозговой ткани с ошибкой порядка 10% [1241].

Многоволновый метод одновременного определения абсолютных концентраций гемоглобина и воды в коже на основе отражательной спектрофотометрии с пространственным разрешением (см. (6.19)) описан в [1245]. Определены две группы спектральных линий для оптимального определения содержания воды (1060, 1160, 1200 и 1320 нм) и гемоглобина (1040, 1120, 1140 и 1200 нм) в типичных экспериментальных условиях.

Измерение коэффициентов отражения биотканей в процессе их коагуляции необходимо для контроля термохимических процессов в очаге коагуляции, определяющих конечный результат воздействия [2, 202, 240, 1229, 1237, 1238]. Такой контроль, в частности, применяют в офтальмологии при коагуляции тканей глазного дна [240, 1237, 1238]. Обнаружено, например, сильное увеличение отражения излучения на $\lambda = 441,6$ нм от тканей глазного дна при коагуляции сетчатки излучением аргонового лазера ($\lambda = 514,5$ нм) [1237].

Специально для медицинских применений разработаны лазерные биофотометры, предназначенные для определения интенсивности отраженного, поглощенного и прошедшего излучения биотканями поверхностных и внутренних органов [1239].

Выпускаются компактные рефлектометры на основе светодиодов для объективного контроля изменений в коже (эритемометры и меланинометры, оксиметры и пр.), вызванных, например, воздействием УФ-излучения или любого другого внешнего воздействия, например теплового или механического, а также для контроля изменения метаболического или патологического характера (воспалительные и опухолевые процессы) [41, 902, 971, 1180]. С использованием измеренных коэффициентов отражения на характерных длинах волн в видимой области (560–570 нм, 635–650 нм, 695–710 нм), соответствующих спектрам поглощения гемоглобина и меланина, определяются степень покраснения (эритема) и степень пигментации кожи, что служит критериями дозировки при лазерной или фототерапии, а также позволяет

осуществлять диагностику и мониторинг различных воспалений и злокачественных новообразований. В этом методе определяются индексы эритемы (E) и меланина (M) на основе измерения отражения на трех длинах волн (R_λ) и расчета соответствующей оптической плотности (OD_λ) как [902, 971]

$$\begin{aligned} OD_\lambda &= \lg \left(\frac{1}{R_\lambda} \right), \\ E &= 100 \left[OD_1 - OD_2 - (OD_2 - OD_3) \frac{\Delta\lambda_{12}}{\Delta\lambda_{23}} \right], \\ M &= 100 \left[\left(\frac{OD_2 - OD_3}{\Delta\lambda_{23}} \right) - \left(\frac{OD_2^{vit} - OD_3^{vit}}{\Delta\lambda_{23}} \right) \right], \end{aligned} \quad (6.21)$$

где длины волн источников света (обычно светодиодов) выбираются в диапазоне длин волн $\lambda_1 = 560\text{--}570$ нм, $\lambda_2 = 635\text{--}650$ нм, $\lambda_3 = 695\text{--}710$ нм. При определении индекса меланина предварительно измеряется оптическая плотность для кожи людей без пигментации (витилиго, OD^{vit}), и эти данные после усреднения по многим измерениям записываются в память микропроцессора. Идея метода и соответствующие иллюстрирующие спектры представлены на рис. 6.7.

6.3. ИК-фурье-спектроскопия

ИК-спектроскопия поглощения является традиционным способом изучения биообъектов. ИК-спектры несут информацию о вторичной структуре белков и нуклеиновых кислот. Вторичная структура белков может быть определена на основании анализа полос поглощения Амида I ($1651\text{--}1680$ см $^{-1}$), Амида II ($1543\text{--}1580$ см $^{-1}$) и Амида III ($1240\text{--}1260$ см $^{-1}$). Были получены ИК-спектры поглощения большого числа биотканей, таких как клетки крови, нервные волокна, бактерии, кости и пр. Однако исследования *in vivo* были в значительной мере затруднены из-за сильного поглощения воды в ИК-области спектра (см. рис. 1.6), поэтому большая часть этих исследований относилась к обезвоженным препаратам. И только в последнее время благодаря разработке ИК-фурье-спектрометров стало возможным изучать интактные биологические материалы [1231, 1246, 1250–1256, 1273].

В основе работы фурье-спектрометра (рис. 6.8) лежит спектральное разложение широкополосного излучения источника света (лазера) в интерферометре Майкельсона с подвижным зеркалом (за счет зависимости оптической разности хода от длины волны) и зондирование этим светом изучаемого объекта. В зависимости от положения подвижного зеркала интенсивности отдельных спектральных компонентов оказываются известными (задаются интерферограммой для каждой длины волны), что дает возможность, измеряя интегральную интенсивность прошедшего исследуемый образец света, судить о поглощении света на отдельных длинах волн.

Процедура измерений заключается в следующем [1253]:

1) с помощью приемников излучения измеряется интенсивность прошедшего образец света $I(0)$ при разности хода плеч интерферометра, $\delta = 2(d_1 - d_2) = 0$;

2) аналогичным образом при измерении разности хода плеч интерферометра измеряется зависимость $I(\delta)$;

3) полученные значения $I(0)$ и $I(\delta)$ подставляются в уравнение

$$B(\nu) = A \int_0^\infty \left\{ \left[I(\delta) - \frac{1}{2}I(0) \right] \cos(2\pi\nu\delta) \right\} d\delta, \quad (6.22)$$

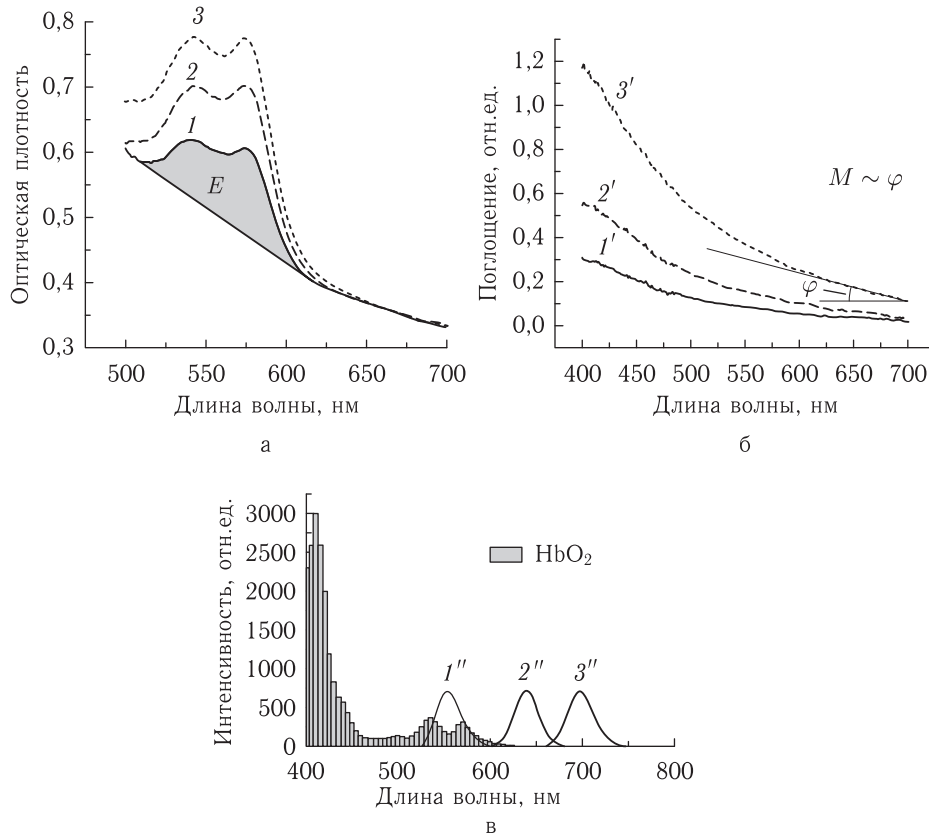


Рис. 6.7. Трехволновый метод определения индексов эритемы (а) и содержания меланина (б); соотношение спектров оксигенированного гемоглобина и источников излучения (светодиодов разных длин волн — $1''$, $2''$, $3''$) (в). Индекс эритемы (E) — величина, пропорциональная площади под кривой спектральной зависимости оптической плотности кожи в зеленой области спектра (а), которая растет от спектра 1 к спектру 3; индекс содержания меланина (M) — величина, пропорциональная наклону линейной спектральной зависимости оптической плотности кожи в красной области спектра (угол наклона φ), кривые $1'$ – $3'$ показывают спектры поглощения меланина с разной концентрацией [902, 971]

где $\tilde{\nu} = 1/\lambda$ — волновое число, и с помощью компьютера вычисляется интеграл для каждого выбранного $\tilde{\nu}$, тем самым с точностью до постоянного множителя A вычисляется искомый спектр $B(\tilde{\nu})$.

Основное преимущество фурье-спектрометров по сравнению с дифракционными спектрометрами — в геометрическом факторе (выигрыш Жакино): через интерферометр возможно пропустить почти в 200 раз больший световой поток, чем в лучших дифракционных приборах, и сделать более компактной оптическую схему. Кроме того, в фурье-спектрометре за каждый малый интервал времени сканирования информация поступает сразу обо всем спектральном составе излучения (выигрыш Фелжета), что также выгодно отличает их от дифракционных спектрометров и, в конечном итоге, определяет высокие быстродействие и чувствительность. Например, в ИК-области спектра величина отношения сигнала к шуму в фурье-спектрометре может в 10^2 – 10^3 раз быть выше, чем у дифракционных спектрометров.

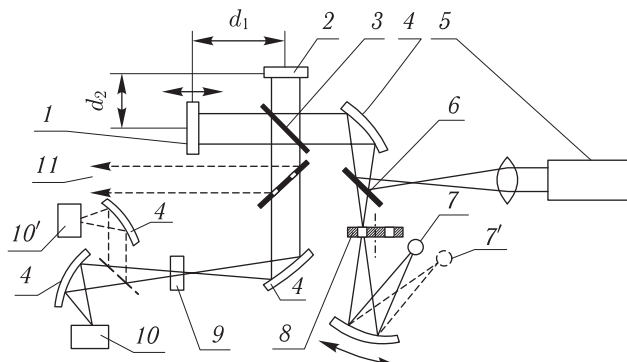


Рис. 6.8. Схема фурье-спектрометра при лазерном зондировании. 1 — подвижное зеркало интерферометра Майкельсона; 2 — неподвижное зеркало интерферометра; 3 — расщепитель пучка; 4 — вогнутые зеркала; 5 — широкополосный ИК-лазер с согласующей оптической системой (или рассеянное от биообъекта излучение); 6 — полупрозрачное зеркало; 7, 7' — источники широкополосного ИК-излучения разных диапазонов; 8 — набор диафрагм; 9 — исследуемый биообъект; 10, 10' — приемники ИК-излучения двух спектральных диапазонов; 11 — внешний зондирующий пучок спектрометра (оптический выход)

Итак, фурье-спектрометры в исследовании биообъектов обладают целым рядом существенных достоинств: возможностью исследования широкой спектральной области за время одного сканирования, длительность которого может быть очень малой, вплоть до долей секунды; относительно малым влиянием рассеянного света и паразитных засветок на результаты измерений; возможностью исключения этих эффектов при вычислении спектров [1253]. Кроме того, фурье-спектрометры позволяют измерять комплексные коэффициенты отражения или пропускания, т. е. определять показатель преломления среды, что важно для биологии. Фурье-спектрометры обладают значительным спектральным разрешением ($0,002\text{--}4\text{ см}^{-1}$), высокой точностью определения волновых чисел (порядка $0,01\text{ см}^{-1}$), что также является следствием интерференционного принципа измерений. Спектральный диапазон промышленных ИК-фурье-спектрометров перекрывает область от 4 до $40\,000\text{ см}^{-1}$.

Например, авторы [1231] использовали фурье-спектроскопию для исследования вторичной структуры белковых фракций (α -, β - и γ -кристаллинов) хрусталиков быка. Исследовались растворы белков, белки в твердой матрице и тонкие пленки биоткани, полученные из корковой и ядерной частей хрусталиков. Спектры регистрировались с помощью ИК-фурье-спектрометра типа Nicolet 7199C (США) в диапазоне $1740\text{--}1570\text{ см}^{-1}$. Было зарегистрировано более 1000 интерферограмм, обработка которых обеспечила получение высококачественных спектров с разрешением на уровне 2 см^{-1} и отношением сигнал/шум лучше чем $450 : 1$.

В ИК-фурье-спектроскопии биообъектов большие перспективы имеет метод полного внутреннего отражения, который обеспечивает легко контролируемый объем исследуемого вещества, определяемый углом падения света на рабочую грань призмы и показателями преломления материала призмы и находящегося в соприкосновении с рабочей поверхностью призмы исследуемого вещества (рис. 6.9). При этом малость объема гарантирует малость влияния поглощения воды на результаты измерений, что очень важно для исследования водных растворов и суспензий биологических веществ и биотканей, содержащих значительное количество воды. Кроме того, отказ от плоской кюветы устраняет нежелательные интерференционные эффекты [1254]. Для биотканей важной также является возможность проведения измерений *in situ*

биообъектов разной формы и структуры при том, что удается получить однородный контакт с рабочей гранью призмы (исследовать спектры поверхностного слоя биомолекул) и тем самым сосредоточить внимание именно на структуре поверхности биообъектов [1250].

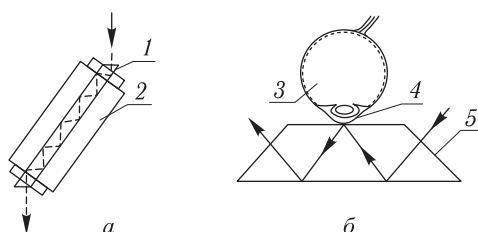


Рис. 6.9. Оптическая часть фурье-спектрометра, использующего нарушенное полное внутреннее отражение в области размещения биообъекта: *а* — кювета для биожидкостей и клеточных суспензий; *б* — ZnSe-призма для исследования биотканей (*1* — стержень квадратного сечения из ZnSe; *2* — исследуемая биожидкость; *3* — глаз; *4* — роговица; *5* — призма [1250, 1251])

Показанные на рис. 6.9 кювета и призма для исследования биотканей могут быть легко совмещены с ИК-фурье-спектрометром, поскольку у большинства промышленных приборов, например типа IFS66 фирмы Брукер, имеется внешний выход (см. пучок 11 на рис. 6.8).

Представленная на рис. 6.9, *а* кювета со стержнем из ZnSe ($n = 2,4$ на $\lambda = 5$ мкм), имеющим параллельные входные грани, расположенные под углом 45° к продольной оси, была использована для исследования водных растворов глюкозы и сахарозы, а также раствора глюкозы в сахарозе в спектральном диапазоне $770\text{--}3290\text{ см}^{-1}$ [1254]. Авторами [1250] с помощью горизонтальной призмы (рис. 6.9, *б*) и ИК-фурье-спектрометра типа Жаско 7000 ($\Delta\tilde{\nu} = 4\text{ см}^{-1}$) получены ИК-спектры поглощения тканей глаза (роговица, склеры, капсулы хрусталика), некоторых внутренних органов и биожидкостей. Аналогичная горизонтальная призма с рабочей поверхностью 20×30 мм и шестью отражениями применялась для получения ИК-спектров цельных растительных и дрожжевых клеток [1254].

Среди интенсивно развиваемых в последние годы методов микроспектрального анализа биообъектов (таких, как КР и КР-фурье-микроскопия, микроспектрофлуориметрия) ИК-фурье-микроскопия оказывается для многих применений наиболее приемлемой благодаря простоте, значительному быстродействию и высокой воспроизводимости результатов. ИК-фурье-микроскопия основана на сочетании двух методик и устройств — ИК-микроскопа и ИК-фурье-спектрометра — и позволяет изучать структуру биологических сред, включая отдельную клетку [1251]. Промышленностью выпускаются ИК-фурье-микроскопы, например Micro FTIR-100 японской фирмы Жаско. Описанный в работе [1251] ИК-фурье-микроскоп позволяет получать спектры пропускания отдельных раковых клеток с пространственным разрешением от 15×15 до 6×6 мкм. В случае исследования ИК-спектров отражения хрящевой ткани человека пространственное разрешение составляло 50 мкм.

Представленные выше исследования были проведены с использованием нелазерных широкополосных источников ИК-излучения.

Однако такие источники являются малоинтенсивными, и поэтому диапазон применений ИК-фурье-спектроскопии сужается; в частности, возникают трудности при исследовании быстротекающих фотофизических и фотохимических процессов в биообъектах [1252]. В качестве широкополосных перестраиваемых источников лазерного излучения в ИК-фурье-спектрометрах могут служить CO- и CO₂-лазеры

с квазинепрерывным спектром или полупроводниковые лазеры на основе соединений свинца (см. главу 4). В настоящее время проблема совмещения принципов лазерной абсорбционной спектроскопии с ИК-фурье-спектроскопией биологических объектов находится в центре внимания исследователей.

Благодаря высокому быстродействию за счет параллельного анализа и высокой чувствительности фурье-спектрометры оказываются весьма полезными при построении эффективных систем спектрального картирования биологических объектов (клеток) в видимой и ближней ИК-области спектра. Такая система описана в работе [1256], она содержит интерферометр Саньяка (трехзеркальный), сопряженный с ПЗС-камерой (512 × 512 пикселей). Коллимированный пучок света возбуждает интерферометр, получаемая на выходе интерференционная картина регистрируется на каждом пикселе ПЗС-камеры, а затем с помощью преобразования Фурье вычисляется спектр падающего на интерферометр излучения. Спектральный диапазон спектрометра составляет 400–1000 нм с разрешением в 5 нм на 400 нм и 12 нм на 600 нм.

6.4. Абсорбционная спектроскопия быстропротекающих процессов

Методы ультрабыстрой лазерной спектроскопии позволяют проводить исследования динамики внутреннего движения биомолекул. Во многом именно потребности исследований структурной динамики биомолекул стимулировали развитие пико- и субпикосекундной спектроскопии, в том числе и абсорбционной спектроскопии быстропротекающих процессов [5, 53, 294, 551, 1224, 1257–1263]. С помощью этих методов исследуются сверхбыстрые процессы колебательного и электронного возбуждения биомолекул, а также динамика химических реакций с их участием.

Абсорбционные методы позволяют определять полное время релаксации биомолекул в основное состояние, время их колебательной релаксации, скорость передачи возбуждения в смеси биомолекул, скорость передачи заряда между биомолекулами в смеси акцепторов и доноров, динамику фотодиссоциации биомолекул в растворе, скорость конформационных изменений и пр. Исследуются первичные процессы фотосинтеза фотосинтезирующих организмов (пурпурных и зеленых бактерий); динамика фотосистем 1 и 2 в зеленых растениях и водорослях; первичные стадии преобразования энергии света родопсинами при изучении фотохимии зрения и биоэнергетики галофильных бактерий (бактериородопсин); фотообратимые фотохромные пигменты (фитохром), выполняющие биорегуляторные функции в клетках многих простейших и растений; динамика фотодиссоциации гемопротеинов (гемоглобина и миоглобина); структура агрегатов фотосенсибилизаторов в опухолевых тканях и др. Характерные времена рассматриваемых процессов лежат в довольно широком диапазоне, 0,6–200 пс, требуемый диапазон длин волн лазерного излучения для их исследования составляет 460–880 нм.

Основная идея абсорбционной спектроскопии с использованием сверхкоротких импульсов заключается в том, чтобы «уйти» от прямых измерений длительности импульса, прошедшего поглощающую среду. Поэтому используют два последовательных световых импульса, первый из которых переводит биомолекулы из основного в возбужденное состояние, а второй, задержанный на пико- или субпикосекундный интервал времени, так называемый измерительный импульс, регистрирует изменение спектра поглощения исследуемого объекта. Принципиальная схема метода показана на рис. 6.2, в. В данном случае инерционный фотодетектор фиксирует те изменения в спектре поглощения, которые произошли за время, определяемое

временной задержкой. Возможны самые разнообразные схемы, реализующие эту идею [5, 294, 1224, 1257–1263]. Возбуждающий и пробный импульсы могут иметь одинаковую и разные длины волн; возбуждающий и зондирующий лазерные пучки могут быть взаимноперпендикулярны и почти коллинеарны; в качестве регистрирующих элементов используются фотодиодные матрицы, видеокамеры, оптические многоканальные анализаторы и отдельные фотодетекторы. Реализованы схемы с одиночными возбуждающим и пробным импульсами, многократным их повторением, с широким спектром зондирующего излучения и пр.

Например, при исследованиях скоростей ориентационной и вращательной релаксации, а также скорости передачи электронной энергии молекул в жидкостях с помощью измерения поглощения пробного импульса для различной взаимной ориентации поляризации возбуждающего и пробного импульсов исследуют наведенную поляризованным возбуждающим импульсом анизотропию в среде [293]. Наибольшее распространение для изучения фотохимических процессов перестройки структуры биомолекул получил метод дифференциальной абсорбционной спектроскопии, который основан на регистрации дифференциальных спектров поглощения, представляющих собой разность между спектрами поглощения до возбуждения и спектрами, зарегистрированными в различные промежутки времени после возбуждения. Изменение оптической плотности исследуемого объекта, $\Delta D(\lambda, t)$, определяется соотношением [294]

$$\Delta D(\lambda, t) = -\lg(T/T_0), \quad (6.23)$$

где $T = E_{\text{пр}}/E_{\text{оп}}$ и $T_0 = E_{\text{пр}}/E_{\text{оп}}$ — отношения энергий пробного и опорного импульсов, прошедших через исследуемый образец при возбуждении и без возбуждения.

В качестве примера на рис. 6.10 и 6.11 представлены схемы двух типичных пико- и субпикосекундных абсорбционных спектрометров, реализующих дифференциальную методику измерения спектров поглощения, почти коллинеарное распространение возбуждающего и пробного световых пучков, переменную оптическую линию задержки импульсов.

Первая схема [1257] построена на основе оптических параметрических генераторов (ОПГ), она позволяет проводить исследования широкого класса биообъектов при

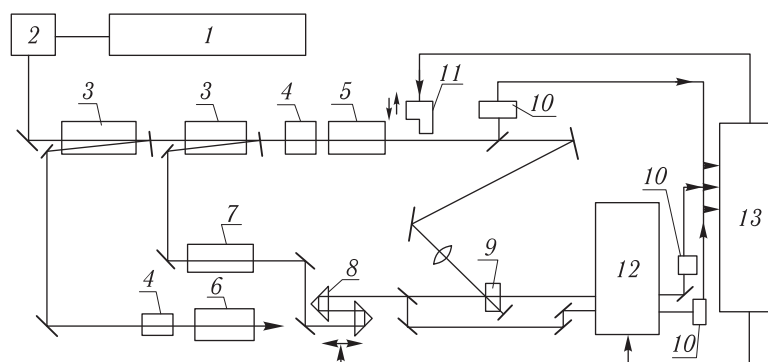


Рис. 6.10. Схема пикосекундного абсорбционного спектрометра на базе оптических параметрических генераторов [1257]: 1 — генератор пикосекундных импульсов; 2 — система выделения моноимпульса; 3 — усилители пикосекундных импульсов; 4 — преобразователи основного излучения лазера; 5 — параметрический генератор на кристалле KDP; 6 — параметрический генератор на кристалле LiNbO; 7 — кювета с D_2O ; 8 — линия задержки; 9 — исследуемый образец; 10 — фотодатчики; 11 — электромагнитный затвор; 12 — монохроматор; 13 — автоматизированная система управления спектрометром

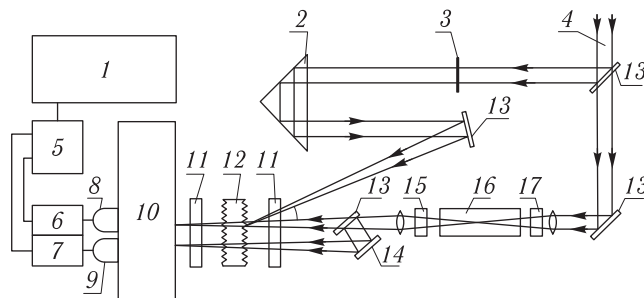


Рис. 6.11. Схема субпикосекундного абсорбционного спектрометра [294]: 1 — компьютер; 2 — оптическая линия задержки; 3 — шторка; 4 — лазерный пучок на $\lambda = 615$ нм, $\tau_n = 10^{-13}$ с; 5 — интерфейс; 6, 7 — цифровые вольтметры; 8, 9 — фотоумножители; 10 — монохроматор; 11 — нейтральные светофильтры; 12 — исследуемый образец; 13 — зеркала; 14 — сине-зеленый светофильтр; 15 — красный светофильтр; 16 — ВКР-кювета (H_2O); 17 — светофильтр КС-18

селективном возбуждении с высокой точностью измерения оптической плотности, вплоть до $2 \cdot 10^{-4}$. Источником накачки является АИГ:Nd-лазер с усилителями, что определяет высокую надежность и стабильность работы спектрометра. Возможна замена задающего лазера на лазерную систему на фосфатном стекле, при этом на порядок увеличивается временное разрешение спектрометра. Источником возбуждающего излучения является пикосекундный ОПГ на кристалле KDP, накачиваемый второй гармоникой лазера на АИГ:Nd. При использовании удвоителя и сумматора частот такая система позволяет перекрыть широкий диапазон длин волн, от 330 до 1400 нм, и получать значительный уровень энергии $E \geq 0,1$ мДж.

В канале зондирования можно использовать два источника света: ОПГ на кристалле LiNbO_3 с удвоителем частоты или источник пикосекундного континуума (ВКР-преобразователь на тяжелой воде). При измерениях кинетических характеристик поглощения в отдельных участках спектра применение ОПГ дает возможность повысить надежность и расширить диапазон измерений за счет высокой стабильности энергетических, спектральных и временных характеристик, широкого диапазона длин волн, включая УФ- и ИК-области спектра, высокой спектральной яркости и монохроматичности излучения. Последнее позволяет работать без монохроматора и использовать фотодиоды для регистрации сигнала. При снятии дифференциальных спектров нестационарного поглощения более удобным оказывается ВКР-преобразователь на D_2O в сочетании с перестраиваемым монохроматором.

Принципиальным является следующее: импульсы, получаемые от ОПГ, имеют более крутые фронты, чем импульсы лазеров с синхронизацией мод, что позволяет увеличить временное разрешение за счет уменьшения временной области перекрытия возбуждающего и зондирующего импульсов. Рассматриваемый спектрометр допускает применение схемы с зондированием во встречном направлении по отношению к пучку возбуждения, что дает возможность значительно снизить попадание рассеянного света возбуждающего пучка в канал зондирования. Эта возможность особенно важна при исследованиях сильно рассеивающих биологических объектов.

Во второй схеме (рис. 6.11) импульс света гигаваттной мощности длительностью $\tau = 100$ фс на длине волны $\lambda = 615$ нм делится между каналами возбуждения и зондирования. В канале возбуждения импульс через оптическую линию задержки попадает на образец. В канале зондирования происходит преобразование излучения в субпикосекундный континуум (ВКР-преобразование в сантиметровой кювете с водой). Пучок далее делится на два: пробный и опорный. Пробный совмещает-

ся с возбуждающим пучком, а опорный используется для получения информации о спектре поглощения среды в отсутствие возбуждения (см. (6.23)). Изменение временной задержки импульсов позволяет изучать кинетику процессов, а перестройка монохроматора — изменения в спектре наведенного поглощения на выбранных длинах волн. Набор длин волн определяется спектром субпикосекундного континуума, ограниченного в УФ- и ИК-областях спектра полосами поглощения воды. Сигналы после монохроматора принимаются фотоприемниками, оцифровываются и вводятся в управляющий компьютер, который осуществляет накопление данных по многим лазерным вспышкам, их усреднение и вычисление среднеквадратичной ошибки, а также управление работой всего спектрометра. Быстродействующие спектрометры последнего поколения используют титан-сапфировые лазеры фемтосекундной длительности, работающие в области длин волн 800–920 нм (см. главу 4).

В качестве примеров применения лазерной пикосекундной и фемтосекундной лазерной спектроскопии биообъектов, имеющих принципиальное значение для науки о живом, отметим работы [1258–1263]. Из них работы [1258, 1263] посвящены фемтосекундной абсорбционной спектроскопии первичных процессов в бактериальных реакционных центрах фотосинтеза и находятся в ряду интенсивных исследований, проводимых в последние годы в ведущих научных лабораториях мира. Работы [1259, 1261, 1262] посвящены пикосекундной спектроскопии гемоглобина и важны для понимания первичных стадий присоединения и отсоединения кислорода к гемоглобину, а также для установления электронной структуры гемоглобина и оксигемоглобина. Работа [1260] имеет отношение к изучению механизмов фотодинамической терапии и определению эффективности фотосенсибилизаторов, поскольку позволяет определять структуру агрегатов молекул фотосенсибилизатора с молекулами компонентов опухолевой ткани *in situ*.

Более детальное описание методов лазерной пико- и субпикосекундной абсорбционной спектроскопии биомолекул, лазерных спектрометров сверхвысокого временного разрешения, а также конкретных исследований динамики биомолекул можно найти в работах [294, 998, 999, 1096–1098, 1104, 1105, 1224].

ОПТИКО-КАЛОРИМЕТРИЧЕСКАЯ СПЕКТРОСКОПИЯ БИООБЪЕКТОВ

7.1. Физические основы методов оптико-калориметрической спектроскопии

В основе оптико-калориметрических методов спектроскопии лежит поглощение света с возбуждением уровней энергии молекул вещества биообъекта, последующая безызлучательная релаксация уровней и нагрев объекта. Информационным параметром является изменение температуры образца ΔT (см. рис. 6.1). Степень нагрева определяется величиной поглощающей способности вещества, интенсивностью света и эффективностью конкурирующих процессов (флуоресценции, фотохимического и фотоэлектрического эффектов). Главное достоинство оптико-калориметрических методов состоит в возможности регистрации спектров поглощения сильно рассеивающих сред, что очень важно для биологии и медицины. С помощью таких методов исследуются непрозрачные (оптически плотные) и слабо флуоресцирующие объекты, контролируется протекание фотохимических и фотоэлектрических процессов. Поскольку измеряемым параметром является изменение температуры, то в качестве детекторов применяются неселективные приемники, т. е. отсутствует ограничение по длинам волн со стороны приемника (принципиальная схема оптико-калориметрических методов показана на рис. 6.2, *г*).

Оптико-калориметрические методы имеют много модификаций, отражающих способы регистрации изменения температуры [5, 12, 13, 31, 34, 41, 58, 150, 159, 329, 330, 363, 365–368, 372–380, 1223, 1274–1356]. Возможны непосредственные измерения температуры с помощью датчиков (*оптико-термический* метод) и сопутствующих изменений объема образца (*оптико-геометрический* метод). Перспективным, особенно при исследованиях биообъектов *in vivo*, представляется метод *оптико-термической радиометрии*, основанный на измерении теплового излучения нагретого лазерным излучением тела. Наиболее широкое распространение, благодаря своей простоте, надежности, высокой чувствительности и универсальности, получил *оптико-акустический* (ОА) (или *фотоакустический*) метод, заключающийся в преобразовании тепловых колебаний в акустические, которые затем регистрируются микрофоном или любым другим приемником акустических колебаний. Сравнительно широкое распространение получили бесконтактный оптико-термический метод, когда измеряемым параметром является температура окружающего объект газа, и *оптико-рефракционные* методы (в которых измеряемым параметром являются вариации показателя преломления среды, вызванные температурными изменениями): метод *тепловой линзы*, метод *тепловой дефлексии* дополнительного (измерительного) лазерного пучка, разнообразные *фазовые и интерферометрические* методы, включая *дифракционные* (дифракция на индуцируемых светом тепловых решетках).

Пусть пучок лазерного излучения радиуса w проходит через кювету, заполненную жидкостью (длительность импульса света — τ_n , частота повторения импульсов — f , длина столба жидкости, освещаемой импульсом, — d). Приемник ОА-сигнала расположен на расстоянии R от оси лазерного пучка. Предположим, что длительность

импульса значительно больше времени безызлучательной релаксации τ_R , времени распространения акустического импульса поперек освещаемого столба жидкости τ_a и постоянной времени акустического детектора τ_d ($\tau_i \gg \tau_R$, $w/v_a \equiv \tau_a$, τ_d , где v_a — скорость распространения акустической волны в среде). При условии, что безызлучательная релаксация является основным процессом, определяющим ослабление светового пучка, а само ослабление не слишком велико, $\mu_a d \ll 1$, выделяющаяся при поглощении энергия находится на основании закона Бугера:

$$E_T = E\mu_a d, \quad (7.1)$$

где E — энергия импульса света; μ_a — коэффициент поглощения.

Поглощение энергии сопровождается локальным повышением температуры ΔT , которое находится из соотношения

$$\Delta T = \frac{E_T}{c_p} V \rho = E\mu_a \frac{d}{c_p} V \rho, \quad (7.2)$$

где c_p — удельная теплоемкость при постоянном давлении; $V = \pi w^2 d$ — освещаемый объем; ρ — плотность среды. Предполагая, что процесс расширения освещаемого объема происходит адиабатически при постоянном давлении, можно подсчитать изменение этого объема:

$$\Delta V = \pi(w + \Delta w)^2 d - \pi w^2 d = \beta V \Delta T = \beta E\mu_a \frac{d}{c_p} \rho, \quad (7.3)$$

где β — коэффициент объемного расширения вещества.

Такое расширение создает волну, распространяющуюся в радиальном направлении со скоростью звука. Соответствующее изменение давления Δp пропорционально амплитуде механических колебаний $\Delta x \sim \Delta w$:

$$\Delta p = 2\pi f_a v_a \rho \Delta x \sim f_a v_a \rho \Delta w, \quad (7.4)$$

где f_a — частота акустических колебаний.

Используя (5.3), при условии, что $\Delta w \ll w$, окончательно получим

$$\Delta p \sim \frac{f_a}{w} \cdot \frac{\beta v_a}{c_p} E\mu_a. \quad (7.5)$$

Соотношения (7.2)–(7.5) дают представление о принципах калориметрических методов. Непосредственную информацию о коэффициенте поглощения среды μ_a на определенной длине волны можно получить на основе измерений ΔT (оптико-термический эффект), ΔV (оптико-геометрический эффект) или Δp (ОА-эффект). Используя связь фокусного расстояния «тепловой линзы» f , угла отклонения пробного лазерного луча φ и сдвига фазы волны в измерительном интерферометре $\Delta\psi$ с изменениями температуры образца T , получим приближенные соотношения и для других методов [58, 1223, 1275, 1318]:

«термолинзы» —

$$(1/f) \approx \frac{dn}{dT} \cdot \frac{\Delta T}{w^2} d; \quad (7.6)$$

дефлекционного —

$$\varphi \approx \frac{1}{n} \cdot \frac{dn}{dT} \Delta T; \quad (7.7)$$

фазового —

$$\Delta\psi \approx \frac{2\pi d}{\lambda_n} \cdot \frac{dn}{dT} \Delta T, \quad (7.8)$$

где dn/dT — температурный градиент показателя преломления среды n ; d — длина области пространственного совмещения возбуждающего и пробного пучков света; λ_p — длина волны пробного пучка.

Рассмотренные явления возможны не только в жидкостях, но также в газах и твердых телах. Исследуемая жидкость (твердое тело) обычно окружена газом (воздухом или другими газами) или твердое тело может находиться в жидкости, поэтому возможны самые разнообразные проявления оптико-калориметрических эффектов за счет распространения оптических, тепловых и акустических волн в этих средах. В качестве примера на рис. 7.1 схематически показаны некоторые из обсуждаемых методов лазерной калориметрии образцов биологических тканей [1276].



Рис. 7.1. Схематическое представление некоторых методов лазерной калориметрии при исследовании биологических тканей [1276]: ΔT_s — изменение температуры образца; ΔT_r — изменение температуры окружающего образец газа; dS — термоупругая деформация; φ — угол дефлекции пробного лазерного пучка; 1 — ОА-метод; 2 — ОТР-метод; 3 — метод тепловой линзы; 4 — дефлекционный метод

Важным параметром, который необходимо учитывать при практической реализации импульсного ОА-метода, является временная задержка между световым и акустическим импульсами. В простейшем случае

$$\tau_d = \frac{R}{v_a}. \quad (7.9)$$

Инерционность метода «тепловой линзы» определяется временем распространения тепловой волны поперек возбуждающего лазерного пучка, $\tau_a \approx \omega/v_a$ (время тепловой релаксации среды). При условии, что длительность лазерного импульса $\tau_{\text{л}}$ гораздо меньше τ_a , фокусировкой лазерного пучка удается сделать метод «тепловой линзы» достаточно малоинерционным, чтобы исследовать широкий круг растворов биологически важных веществ с характерными временами релаксации порядка 0,1–500 мкс [1277].

Дальнейшее обсуждение проведем в основном на примере ОА-метода. В случае газообразных сред, в частности молекулярных газов, для которых скорость столк-

новительной релаксации возбужденных состояний существенно превышает скорость излучательной релаксации, ОА-сигнал имеет следующий вид:

$$\delta p(t) \approx (\gamma - 1) \frac{E\mu_a}{\pi R^2} \exp\left(-\frac{t}{\tau_T}\right), \quad (7.10)$$

где $\gamma = c_p/c_V$; R — радиус ячейки; τ_T — время тепловой релаксации ячейки;

$$\tau_T \approx \frac{(R/2,4)^2}{a_T}, \quad a_T = \frac{k}{\rho} c_V, \quad (7.11)$$

где a_T — коэффициент температуропроводности; ρ — плотность газа; k — коэффициент теплопроводности газа. Эти соотношения получены на основе газокинетических представлений для ячейки, заполненной молекулами одного сорта, равномерно распределенными в объеме. Общая энергия газа в ячейке увеличивается за счет процесса столкновительной релаксации возбужденных светом молекул; часть энергии, переходящая в энергию поступательного движения молекул, теряется в основном на стенке ячейки в результате процесса теплопроводности газа, потери характеризуются постоянной времени ячейки. Для газовой смеси поглощающих молекул разного сорта общее изменение давления в ячейке складывается из соответствующих парциальных изменений давления с учетом временных задержек, обусловленных различиями скоростей тепловой релаксации.

Важным параметром является термодиффузная (тепловая) длина среды, которая для импульсного возбуждения оценивается как

$$l_T \approx (4a_T\tau_i)^{1/2}. \quad (7.12)$$

Импульсный нагрев биообъекта приводит также к изменению характера собственного теплового излучения тела, что лежит в основе импульсной оптико-термической радиометрии (ОТР) [1279–1286, 1303, 1309]. Максимум теплового излучения живых биообъектов находится в области 10 мкм. Детальный анализ ОТР-сигнала требует знания распределения температуры по объекту, скорости тепловой диффузии среды, коэффициентов поглощения на длинах волн зондирования μ_a и теплового излучения μ'_a (10 мкм). И обратно, знание некоторых из указанных параметров позволяет по измеренному ОТР-сигналу определять другие параметры, например μ_a и его распределение по глубине [1303].

Время термодиффузии биообъекта размером h приблизительно равно h^2/a_T . Типичным для многих биообъектов является значение коэффициента температуропроводности, $a_T = 1,2 \cdot 10^{-7} \text{ м}^2/\text{с}$ [2, 42], поэтому время их тепловой релаксации определяется в основном размерами и составляет для клетки около 10^{-3} с , для мелкой артерии — $3 \cdot 10^{-2} \text{ с}$, для пальца руки — 10^2 с , а для всей руки — более 10^4 с .

При воздействии короткими импульсами света (значительно меньшими по длительности времени термодиффузии τ_T) величина нормированного ОТР-сигнала (нормированная температура на поверхности объекта) для однородной среды определяется следующими соотношениями, полученными в диффузионном приближении [1303]:

$$S(t) = \frac{\delta}{1 - \delta^2} [\exp(\delta^2 \alpha t) \operatorname{erfc}(\delta \sqrt{\alpha t}) - \delta \exp(\alpha t) \operatorname{erfc}(\sqrt{\alpha t})], \quad (7.13)$$

для только поглощающего образца и

$$S(t) = \delta \left\{ \frac{A}{1 - \delta_d^2} [\exp(\delta_d^2 \alpha t) \operatorname{erfc}(\delta_d \sqrt{\alpha t}) - \delta_d \exp(\alpha t) \operatorname{erfc}(\sqrt{\alpha t})] + \frac{B}{1 - \delta_t^2} [\exp(\delta_t^2 \alpha t) \operatorname{erfc}(\delta_t \sqrt{\alpha t}) - \delta_t \exp(\alpha t) \operatorname{erfc}(\sqrt{\alpha t})] \right\} \quad (7.14)$$

для рассеивающего образца с поглощением.

Здесь $\delta = \mu_a/\mu'_a$, $\alpha = (\mu'_a)^2 a_T$, $\delta_d = \mu_d/\mu'_a$, $\delta_t = (\mu_a + \mu'_s)/\mu'_a$, $\operatorname{erfc}(x) = \left(\frac{2}{\sqrt{\pi}}\right) \int_0^x e^{-\xi^2} d\xi$ — интеграл ошибок, A и B определяются в диффузионной теории.

Соответствующие выражения для распределения температуры внутри однородного объекта, а также для неоднородных (слоистых) объектов приведены в работе [1303].

Как правило, зондирующее излучение достаточно глубоко проникает в биоткань и создает там соответствующее распределение температуры, которое связано с измеряемой поверхностной температурой, поэтому регистрация ОТР-сигнала в зависимости от времени (непосредственно после окончания лазерного импульса) позволяет восстановить распределение температуры в объеме и тем самым визуализировать скрытые неоднородности ткани, обусловленные локальными изменениями коэффициента поглощения на длине волны зондирующего излучения.

Так же как и в методе волн фотонной плотности (см. главу 2), применение лазеров непрерывного действия с модуляцией выходной мощности позволяет получить информацию о характере поглощения исследуемого вещества из измерений сдвига фаз между переменными составляющими мощности излучения лазера и давления $\Phi(\omega)$. При гармонической модуляции мощности излучения, P , для газообразных сред имеем

$$\delta p(\omega) \approx \frac{\sqrt{2}}{2}(\gamma - 1) \frac{P\mu_a}{\pi R^2} \cdot \frac{\tau_T}{[1 + (\omega\tau_T)^2]^{1/2}}, \quad (7.15)$$

$$\Phi(\omega) \approx -\arctg(\omega\tau_T), \quad (7.16)$$

где ω — частота модуляции; $\delta p(\omega)$ — амплитуда ОА-сигнала; τ_T определяется соотношением (7.11). Эти выражения получены при тех же предположениях, что и (7.10).

Изучение оптических и тепловых свойств жидкостей и твердых тел с помощью газовой ОА-ячейки (косвенный метод) является довольно распространенным методом исследования. Свет, модулированный с частотой ω , поглощается конденсированной средой и частично преобразуется в тепло, создающее возмущения давления в окружающем газе, которые регистрируются микрофоном. В основу описания ОА-сигнала по такой схеме положено решение уравнения теплопроводности в предположении, что амплитуда и фаза колебаний в газе определяются не зависящими друг от друга возмущениями температуры в исследуемом образце и газе. Эта модель справедлива лишь в той области частот модуляции (большие частоты), где термодиффузионная длина в газе l_{Tg} значительно меньше длины столба газа l_g . Термодиффузионная (тепловая) длина определяется соотношением

$$l_T = \left(\frac{2a_T}{\omega}\right)^{1/2}. \quad (7.17)$$

Расширение области применения теории до произвольно малых частот и малых столбов газа показывает, что нижний предел l_{Tg} (или l_g) должен быть того же порядка, что и величина средней длины свободного пробега молекул газа. В области малых значений «тепловой» толщины газа необходимо принимать во внимание дополнительный объем V_T , например объем газа в канале, соединяющем рабочую часть ячейки с микрофоном.

При описании ОА-сигнала используют три характерные длины образца: геометрическую d , длину пробега фотона в поглощающей среде $l_{ph} = 1/\mu_a$ и «тепловую» l_T (см. (7.17)). В зависимости от соотношения длин возможны шесть различных вариантов газомикрофонного метода. Различают оптически и термически толстые среды. Очевидно, что для $d > l_T \approx l_{ph}$ возможны эффекты насыщения амплитуды ОА-сигнала, которые следует избегать [58, 1223]. Для данного образца величина l_T

определяется длительностью импульса или частотой модуляции ω . Для оптически прозрачных или почти прозрачных образцов ($d \approx l_{\text{ph}} + l_{\text{T}}$) в формировании ОА-сигнала участвует также обратная сторона объекта, поэтому, кроме указанных шести, возможны и другие варианты.

Все сказанное относится, главным образом, к ячейкам закрытого типа, когда жидкость или газ ограничены в некотором замкнутом объеме. Более удобными, особенно для целей диагностики биообъектов *in vivo* и *in situ*, являются ячейки открытого типа. Кроме того, ячейки открытого типа позволяют более простыми средствами разделять вклады в ОА-сигнал от поглощения в объеме и на поверхности исследуемого объекта. Если в закрытой ячейке для этого необходимо проводить измерения в широком диапазоне частот модуляции, то при использовании открытой ячейки достаточно измерить амплитуду и фазу ОА-сигнала на одной частоте [329].

При условии, что свет полностью поглощается поверхностью биообъекта, сдвиг фазы ОА-сигнала, возникающего за счет преобразования прошедшей через биообъект и подложку тепловой волны, определяется соотношением [1278]

$$\operatorname{tg} \Phi = \operatorname{tg} \left(\frac{d}{l_{\text{T}}} \right) \frac{1 + R \exp(-2d/l_{\text{T}})}{1 - R \exp(-2d/l_{\text{T}})}, \quad (7.18)$$

где $R = (1 - b)/(1 + b)$; $b = (k_{\text{b}}\rho_{\text{b}}c_{\text{b}}/k\rho c)^{1/2}$; l_{T} — термодиффузионная длина биообъекта, определяемая соотношением (7.17); d — геометрическая длина биообъекта (индексом b отмечены параметры подложки).

Наиболее простой вид это соотношение имеет в двух случаях: когда объект термически толстый ($d \gg l_{\text{T}}$), или когда подложка и объект имеют близкие свойства ($b \approx 1$):

$$\Phi \approx \frac{d}{l_{\text{T}}}. \quad (7.19)$$

При осуществлении такого простого способа определения l_{T} , а следовательно a_{T} или плотности биообъекта ρ (см. (7.11)), для слабопоглощающих биообъектов можно использовать схему с облучением обратной стороны объекта, поверхность которой покрыта поглощающей свет пленкой или металлической фольгой. Возникающая на поверхности тепловая волна, пройдя биообъект, преобразуется в звук на другой его поверхности (граница биообъект — воздух), а звук принимается микрофоном. В случае термически тонких объектов можно использовать подходящую подложку, контактирующую с неосвещаемой поверхностью биообъекта. Для большинства биотканей такой подложкой может служить жидкий парафин, а поглотителем — медная фольга толщиной 5 мкм [1278]. В рассматриваемом варианте фазовый метод наиболее интересен для визуализации внутренней структуры биообъектов, определяющей неоднородность тепловых свойств в объеме объекта.

7.2. Экспериментальные исследования и типичные измерительные установки

Типичные схемы экспериментальных установок для исследования ОА-спектров веществ в различных фазовых состояниях представлены на рис. 7.2 и 7.3. Установка, показанная на рис. 7.2, может быть использована для исследования как жидкостей, так и газов при импульсном возбуждении. При исследовании газов необходимо предусмотреть систему откачки и напуска газов с заданной концентрацией, а в качестве приемника ОА-сигналов обычно используют конденсаторный или электретный микрофоны или пьезоэлектрический преобразователь (ПЗП). В работе [1223] аналогичную установку применяли для исследования спектров поглощения

жидкостей. В качестве источника света, перестраиваемого по длинам волн, брали лазер на красителях с ламповой накачкой. Область перестройки лазера в диапазоне 450–750 нм обеспечивалась сменными красителями. Длительность импульса τ_i составляла $2 \cdot 10^{-6}$ с, максимальная энергия $E = 10^{-3}$ Дж, частота повторения $f = 10\text{--}20$ Гц. В качестве приемника ОА-сигнала служил пьезоэлектрический преобразователь. Выходной сигнал с ПЗП через быстродействующий предварительный усилитель поступал на основной усилитель, а затем усреднялся за определенный промежуток времени с помощью стробируемого вольтметра (А). Необходимость такого усреднения вызвана тем, что ОА-импульс оказывается дополнительно уширенным, что обусловлено как резонансными свойствами ПЗП, так и отражением ОА-сигнала от стенки ячейки. Пучок света, прошедший ОА-ячейку (обычно исследуются прозрачные жидкости), поступает на пьезоэлектрический детектор, сигнал с которого с помощью второго стробируемого вольтметра (В) преобразуется в опорный. Оба сигнала — ОА и опорный — оцифровываются и поступают на компьютер для дальнейшей обработки и получения нормированного ОА-сигнала. Информация о частоте генерации лазера также поступает на компьютер. Окончательно получают график зависимости амплитуды нормированного ОА-сигнала от частоты генерации лазера. Небольшая часть излучения лазера направляется на спектрометр, с помощью которого осуществляется калибровка частоты генерации по эталонным линиям в спектрах хорошо изученных газов. Точность калибровки совпадает с шириной линии генерации лазера (1 см^{-1}) и является более чем достаточной для исследования жидкостей и твердых тел.

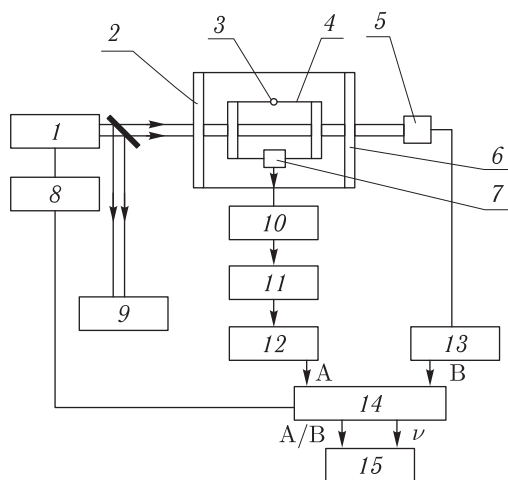


Рис. 7.2. Схема экспериментальной установки для ОА-спектроскопии газов и жидкостей [5, 329, 1223]: 1 — импульсный лазер на красителях; 2 — кварцевое окно; 3 — термопара; 4 — ОА-ячейка; 5 — пьезоэлектрический приемник лазерных импульсов; 6 — термостабилизированная кювета; 7 — приемник ОА-сигнала; 8 — сканирующее устройство; 9 — спектрометр; 10 — предварительный усилитель; 11 — усилитель; 12, 13 — стробируемые вольтметры; 14 — компьютер; 15 — контрольное устройство и графопостроитель

Исследование поглощения в твердых телах возможно регистрацией возбуждаемого ОА-сигнала как при непосредственном контакте твердого тела с детектором, так и при размещении исследуемого тела в открытой ячейке, заполненной жидкостью (см. рис. 7.3). Лазер излучает импульсы на $\lambda = 1060$ нм с энергией $E = 6 \cdot 10^{-4}$ Дж, длительностью $\tau_i = 10^{-7}$ с и $f = 8$ Гц. В первом случае возбуждающийся в образце

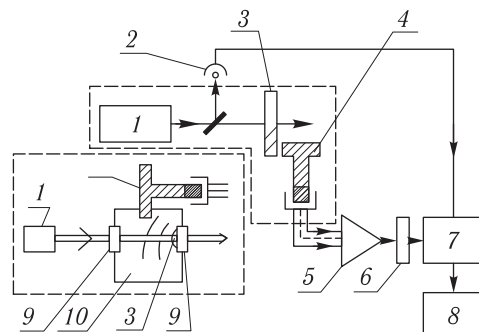


Рис. 7.3. Схема экспериментальной установки для исследования твердых тел ОА-методом [5, 329]: 1 — АИГ:Nd-импульсный лазер; 2 — фотодиод; 3 — исследуемый образец; 4 — преобразователь акустических колебаний в электрические; 5 — усилитель; 6 — фильтр; 7 — АЦП; 8 — компьютер; 9 — окно; 10 — жидкость

акустический импульс через тонкую пленку глицерина, служащую элементом связи по акустическому каналу, попадает на ПЗП, преобразующий механические колебания в электрические. Выходной сигнал преобразователя усиливается, фильтруется в полосе 80–600 кГц, а затем поступает на аналого-цифровой преобразователь (АЦП), который открывается сигналом с фотодиода только на период действия лазерного импульса. Данные с АЦП поступают на компьютер, где ОА-сигнал усредняется по большому числу лазерных импульсов. Во втором случае исследуемый образец является задним окном жидкостной открытой ячейки, ОА-детектор расположен в жидкости вблизи поверхности образца. Жидкость, так же как и газ, может служить генератором акустических колебаний, обусловленных тепловыми процессами, возникающими при поглощении света в тонкой пленке на поверхности образца. Таким образом, в отличие от первого случая (где глицерин — всего лишь передатчик акустических колебаний), жидкость является как генератором, так и передатчиком колебаний; чувствительность метода увеличивается в пять раз при условии, что слой жидкости, разделяющий объект с датчиком, не превышает 50 мкм. Чувствительность жидкостного метода оказывается выше и по сравнению с газомикрофонным методом.

Визуализация структуры биообъектов может быть осуществлена с помощью экспериментальной установки, представленной на рис. 7.4 [1278]. Линейно поляризованное излучение Ar-лазера модулируется по интенсивности с помощью акустооптического модулятора и попадает на расширитель лазерного пучка, состоящий из двух линз. Проходя полуволновую пластинку, излучение поступает на поляризационный делитель пучка. Поворот полуволновой пластинки вокруг оси позволяет направлять излучение на заднюю сторону биообъекта. Прежде чем попасть на биообъект, излучение фокусируется с помощью линз с фокальной длиной 40 или 100 мм. Соответственно, диаметр сфокусированного пучка на объекте оказывается равным 40 или 100 мкм. Оба пучка направляются таким образом, чтобы нагревать одну и ту же точку биообъекта. Основной ОА-сигнал получают при облучении обратной (нижней) поверхности биообъекта, покрытой тонкой (5 мкм) медной фольгой. Освещение передней (верхней) поверхности используется для определения начальной точки сканирования исследуемого объекта. Сканирование осуществляется перемещением закрепленной на двухкоординатном (x - y) столике ОА-ячейки с помощью шаговых двигателей. ОА-сигнал от конденсаторного микрофона усиливается, поступает на фазовый детектор и далее на компьютер, который контролирует также положение точки

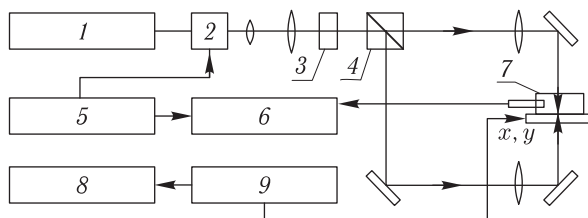


Рис. 7.4. Экспериментальная установка для визуализации биообъектов фазовым ОА-методом [1278]: 1 — Ar-лазер; 2 — акустооптический модулятор; 3 — полуволновая фазовая пластинка; 4 — поляризационный делитель пучка; 5 — электронный генератор; 6 — фазовый детектор; 7 — микрофонная ОА-ячейка; 8 — монитор; 9 — компьютер

облучения на плоскости $x-y$. Скрытая структура изображается в виде изометрии на экране монитора.

В зависимости от решаемых задач установка должна иметь свои особенности, обусловленные как типом источника света, способом его модуляции, так и конструкциями ОА-детектора и регистрирующей аппаратуры [5, 58, 293, 329, 1223, 1225, 1226]. Например, диапазон длин волн лазерного спектрометра (9,25–10,75 мкм) обеспечивается дискретно перестраиваемым CO_2 -лазером (всего 45 линий генерации) [1225, 1226]. Перестройка длин волн — автоматическая с управлением от компьютера. Используется дифференциальная схема с двумя ячейками, для привязки по длинам волн служит третья ОА-ячейка с эталонными газами. Минимально регистрируемый коэффициент поглощения равен $1 \cdot 10^{-7} \text{ см}^{-1}$, погрешности измерений составляют 20%, динамический диапазон — 10^4 , объем газовой пробы — $0,044 \text{ м}^3$. Основные медицинские применения — это анализ состава выдыхаемого воздуха с целью диагностики некоторых заболеваний и контроль технологических процессов в фармакологии.

Одна из измерительных схем, реализующая метод оптико-термической радиометрии биообъектов, представлена на рис. 7.5 [1279]. Излучение импульсного лазера, работающего в УФ- или видимой области спектра на фиксированной длине волны (или перестраиваемого), направляется на биообъект. Обычно предусматривается

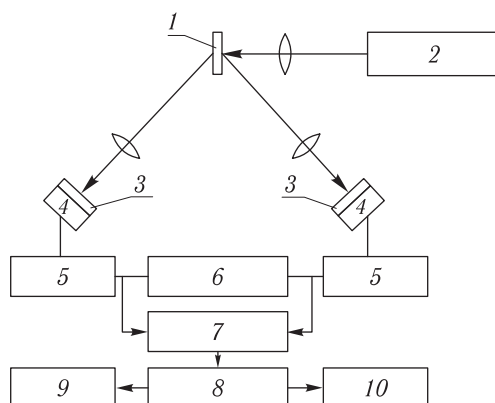


Рис. 7.5. Схема реализации метода оптико-термической радиометрии биообъектов [1279]: 1 — биообъект; 2 — лазер; 3 — оптический фильтр; 4 — фотоприемник ИК-излучения; 5 — предварительный усилитель; 6 — осциллограф; 7 — АЦП; 8 — компьютер; 9 — графопостроитель; 10 — монитор

прием теплового излучения от биообъекта с обеих сторон (с передней и задней) с помощью фотоприемников ИК-излучения и соответствующих оптических фильтров, вырезающих необходимый диапазон длин волн. Сигналы с фотоприемников усиливаются, оцифровываются и обрабатываются на компьютере. Результаты измерений после накопления и обработки в представляются в удобном виде на графопостроителе или мониторе.

На рис. 7.6 показаны схема принципа действия и экспериментальная установка метода «тепловой линзы» [1277, 1318]. Излучение возбуждающего импульсного лазера на красителях через поворотную призму (минуя призму 3) поступает в кювету с исследуемым веществом. При поглощении излучения в веществе формируется «тепловая линза» за счет поперечного теплового вытеснения вещества с оси пучка к его краям в соответствии с гауссовым профилем пучка. Прошедшее кювету излучение частично задерживается диафрагмой 5 и полностью гасится фильтром 6. В зависимости от длины волны возбуждающего лазера величина поглощения меняется, тем самым меняется оптическая сила наведенной линзы. Информацию об оптической силе линзы получают с помощью непрерывного He-Ne-лазера и точечной диафрагмы 5, поскольку при изменении размеров пробного пучка изменяется интенсивность прошедшего через диафрагму света, который фиксируется фотоприемником 7 и далее регистрирующей и обрабатывающей аппаратурой 14–17.

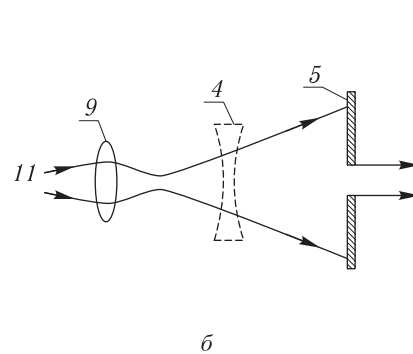


Рис. 7.6. Метод «тепловой линзы»: экспериментальная установка (а); схематическое представление принципа действия метода (б) [1277]: 1, 3 — поворотные призмы; 2, 9 — линзы; 4 — кювета с исследуемым веществом; 5 — точечная диафрагма; 6 — фильтр; 7 — фотоприемник; 8 — пьезоэлектрический приемник; 10 — возбуждающий лазер на красителях; 11 — He-Ne-лазер (пробный пучок); 12 — АИГ:Nd-импульсный лазер; 13 — источник накачки; 14 — осциллограф; 15 — усилитель; 16 — система записи сигнала; 17 — компьютер

Следующая установка (рис. 7.7) реализует один из вариантов косвенного дефлекционного метода и служит для контроля процесса разрушения желчных камней излучением мощного лазера на красителях с ламповой накачкой [1282, 1290]. Лазер обеспечивал плотность энергии в диапазоне 12–150 Дж/см², имел $\tau_n \approx 0,8$ мкс и перестраивался в диапазоне 450–700 нм. Его излучение через согласующую оптику и кварцевый световод с диаметром сердцевины 320 мкм поступало к объекту. Измерительная плексигласовая цилиндрическая кювета высотой 35 см и диаметром 5 см имела прямоугольный внешний выступ в днище размером 2 × 6 см, который служил в качестве преобразователя волн механического напряжения, возникающих при поглощении импульсного излучения лазера. Исследуемый объект — камень желчного пузыря — располагался на дне кюветы и заливался необходимым количеством воды. Волны механического напряжения при распространении по кювете

создавали изменения показателя преломления материала выступа, что приводило к отклонению пробного пучка He-Ne-лазера. Эти отклонения регистрировались с помощью точечной диафрагмы 9 (диаметром 500 мкм), фотоприемника 7 и запоминающего осциллографа 6. Измерительная система имела высокую линейность во всем диапазоне исследуемых сигналов.

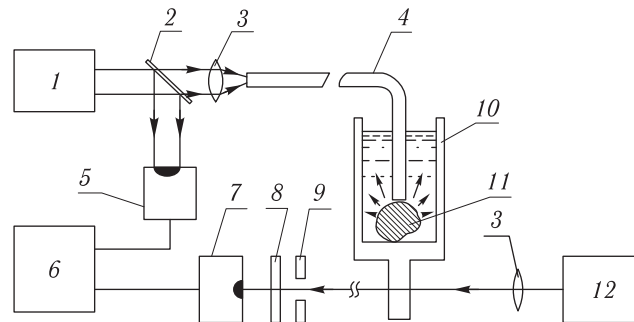


Рис. 7.7. Установка, использующая метод дефлексии пробного лазерного пучка [1290]: 1 — лазер на красителях; 2 — делитель пучка; 3 — линзы; 4 — волоконный световод; 5, 7 — фотоприемники; 6 — запоминающий осциллограф; 8 — фильтр; 9 — точечная диафрагма; 10 — кювета с водой; 11 — мочевого или желчный камень; 12 — He-Ne-лазер

Для исследования биообъектов можно рекомендовать интерферометрическую калориметрическую установку, основанную на измерении фазы оптического поля (рис. 7.8) [1289]. Пробное излучение непрерывного маломощного He-Ne-лазера 1 через делитель пучка 2 поступает в интерферометр, образованный полностью отражающим зеркалом 7 и эталоном 3 (толщиной 5 мм) с напыленными на его поверх-

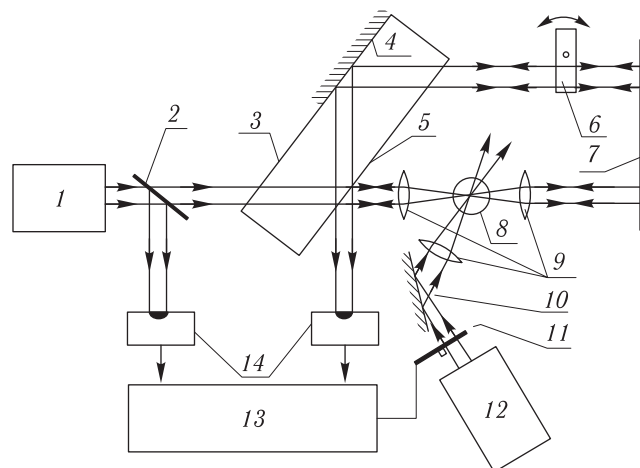


Рис. 7.8. Установка, использующая интерференционный (фазовый) способ лазерной калориметрии [1289]: 1 — маломощный He-Ne-лазер (пробный пучок); 2 — делитель пучка; 3 — плоскопараллельная пластинка; 4 — отражающее покрытие; 5 — полупрозрачное зеркальное покрытие; 6 — управляемый оптический компенсатор; 7 — отражающее зеркало; 8 — объект; 9 — линзы; 10 — зеркало; 11 — прерыватель лазерного пучка; 12 — мощный He-Ne-лазер; 13 — регистрирующее устройство; 14 — фотоприемники. Зондирующий и возбуждающий лазерные пучки взаимно ортогональны

ностях зеркальными покрытиями (полностью отражающими — 4 и с 50 % отражением — 5). Линзы 9 служат для фокусировки излучения пробного и возбуждающего лазерных пучков на объект (пучки взаимно ортогональны). В интерферометр введен также управляемый от руки фазовый компенсатор, который обеспечивает подстройку разности фаз в плечах интерферометра. Конструкция интерферометра такова, что он автоматически за счет двойного прохода пробного пучка света через образец компенсирует дефлекционные эффекты и в два раза увеличивает чувствительность к фазовым возмущениям. Эти возмущения создаются излучением более мощного He-Ne-лазера. Линейность фоторефрактивного сигнала наблюдается в диапазоне от 0,05 до 16 мВт выходной мощности возбуждающего лазера.

Шумы установки, обусловленные флуктуациями интенсивности излучения лазеров и шумами электроники, определяют ее чувствительность, которая при условии, что для газов $dn/dT \approx 10^{-5}$ 1/°C, для жидкостей — 10^{-7} 1/°C и твердых тел — 10^{-6} 1/°C, оказывается соответственно равной 10^{-6} °C в газах, 10^{-8} °C в жидкостях и 10^{-7} °C в твердых телах (см. (7.8)). Таким образом, рассмотренная интерференционная установка может регистрировать весьма малые изменения температуры, вызванные поглощением лазерного излучения.

В ИК-области спектра исследование спектров поглощения непрозрачных и сильно рассеивающих биообъектов можно проводить с помощью хорошо развитого и аппаратно обеспеченного метода фурье-спектроскопии при использовании в качестве неселективного детектора поглощенного в объекте ИК-излучения любого из рассмотренных оптико-калориметрических (ОК) преобразователей. Однако на практике лучше использовать простые и высокочувствительные оптико-акустический (ОА) или оптико-термический (ОТ) преобразователи. Современные промышленные ИК-фурье-спектрометры имеют выходной рабочий пучок (см. рис. 6.8), поэтому они легко совмещаются с ОА- или ОТ-детекторами.

В принципе существует возможность прямого определения абсолютного значения коэффициента поглощения вещества, если известны все значения коэффициентов передачи в системе источник света — поглощающее вещество — ОА-ячейка — преобразователь акустических колебаний — электронная схема. Однако это весьма трудная задача, поэтому обычно для определения абсолютных значений коэффициентов поглощения применяют калибровку ОА-детекторов или других типов ОК-приемников. При исследовании жидкостей процесс калибровки заключается в сравнении, например, ОА-сигналов, полученных от исследуемой жидкости и жидкости с растворенным в ней красителем. Таким способом можно определить коэффициент поглощения с точностью $\pm 10\%$. Калибровка одной жидкости по другой с учетом коэффициента объемного расширения, теплоемкости и скорости распространения звука в различных жидкостях дает точность $\pm 30\%$. При исследовании поглощения в газах обычно применяется аналогичная методика калибровки с использованием эталонных газов с известным коэффициентом поглощения, а в твердых телах для эталонирования можно использовать калориметрический метод (при замещении объекта эталонным источником тепла), обладающий высокой чувствительностью (вплоть до значения $\mu_a = 5 \cdot 10^{-6}$). Калибровка ОК-спектров твердых тел и жидкостей может быть произведена также с помощью стандартных образцов (задымленной кварцевой пластины). Основными причинами, снижающими реальную чувствительность ОК-метода, являются: поглощение света в окнах ячейки, рассеяние света с последующим его поглощением стенками ячейки или непосредственно элементами приемника акустических сигналов, электрострикция исследуемого вещества под действием сильно-го лазерного поля. Эти причины вызывают фоновые сигналы [58, 1223].

Поглощение в окошках ОА-ячейки складывается из поглощения, обусловленного загрязнением вещества (в том числе за счет диффузии газа или жидкости) и дефек-

Таблица 7.1. Чувствительность и основные области применения оптико-калориметрических методов [5, 58]

| Метод | Порог по поглощению, см ⁻¹ | | | Особые требования | Область применения |
|---------------------------------|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--|--|
| | газа | жидкости | твёрдого тела | | |
| Оптико-акустический | 10 ⁻⁸ –10 ⁻⁹ | 10 ⁻⁶ –10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁵ –10 ⁻⁶ | Наличие специальной ячейки или зонда; контакт с датчиком | Локальный анализ слабопоглощающих и сильнорассеивающих биологических сред; исследование концентраций токсических веществ; анализ газов, аэрозолей, порошков, тонких пленок; газовая, жидкостная и тонкослойная хроматография; анализ биотканей, фотобиохимических процессов; применение в микроскопии, при профилировании вглубь, томографии и пр. |
| Оптико-термический | 10 ⁻⁶ –10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁴ –10 ⁻⁵ | 10 ⁻⁵ –10 ⁻⁶ | Наличие специальной ячейки или зонда; контакт с датчиком | Локальный анализ; измерения в потоках; капиллярная газовая хроматография; измерения при низких температурах, в вакууме и пр. |
| Оптико-термической радиометрии | 10 ⁻² –10 ⁻³ | 10 ⁻¹ –10 ⁻² | 10 ⁻¹ –10 ⁻² | Наличие высокочувствительного приемника ИК-излучения; необходимость спектральной фильтрации | Исследование сильнопоглощающих и сильнорассеивающих биообъектов; дистанционные и бесконтактные измерения (нет ограничений на размеры — от очень больших до мельчайших); анализ биотканей, отдельных органов (возможность исследований <i>in vivo</i>) и пр. |
| Оптико-геометрический | — | 10 ⁻³ –10 ⁻⁴ | 10 ⁻² | Жесткое закрепление датчика; селекция сигналов от различных эффектов | Исследование медленно протекающих процессов в биообъектах |
| Тепловой линзы Дефлекционный | 10 ⁻⁶ –10 ⁻⁷ 10 ⁻⁷ | 10 ⁻⁷ 10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁵ 10 ⁻⁷ | Наличие дополнительного пробного лазерного пучка и позиционно-чувствительного приемника излучения | Анализ сильнорассеивающих биообъектов, следовых концентраций веществ (возможность исследований <i>in vivo</i>); измерения в потоках; дистанционные измерения, капиллярный электрофорез; исследование тонких пленок, порошков и пр. |
| Фазовый | 10 ⁻⁴ –10 ⁻⁸ | 10 ⁻⁵ –10 ⁻⁶ | 10 ⁻³ –10 ⁻⁴ | Вибро- и акустическая изоляция; наличие дополнительного стабильного пробного лазерного пучка и интерферометрической или гетеродинной схемы измерений | Исследования следовых концентраций веществ; визуализация тепловых и акустических полей; фотохимические исследования в вязких и твердых средах и пр. |

тами в поверхностном слое окон, и поглощения в объеме окон. Поглощение в окошках приводит к дополнительному изменению давления в исследуемом газе или жидкости. Поскольку амплитуда фонового сигнала не зависит от поглощающей способности исследуемого газа (жидкости), фоновый сигнал может быть исключен из общего сигнала, например с помощью регистрирующего электронного устройства. Тем не менее, из-за ограниченного динамического диапазона электронных усилителей фоновые сигналы должны быть минимизированы. Для снижения влияния фоновых сигналов на полезный сигнал в газовой ячейке необходимо уменьшать поглощение в тонком поверхностном слое окон, что достигается соответствующей обработкой поверхности (полировка, очистка), а также взаимным подбором материала ячейки и исследуемого вещества.

При исследовании жидкостей и твердых тел существенное влияние на формирование фоновых сигналов может оказать рассеяние света. Очевидно, что в данном случае необходимо по возможности устранять образования, рассеивающие свет (частицы пыли, дефекты, неоднородности и т. п.). Кроме того, при импульсном режиме работы хороших результатов можно достичь стробированием измеряемого сигнала, так как рассеянный свет поглощается в элементах преобразователя практически мгновенно после действия лазерного импульса, а полезный акустический сигнал задерживается на время τ_d , определяемое выражением (7.9). В свою очередь, ОА-сигнал от окна приходит несколько позже основного сигнала от жидкости (газа). В этом и заключается основное достоинство импульсного метода при использовании его для анализа конденсированных сред. Хорошие результаты дает применение частотной модуляции излучения непрерывных лазеров или переключение их длин волн вблизи линии поглощения исследуемого вещества, поскольку благодаря сравнительно слабой дисперсии материала окон и стенок ячейки они дают малый вклад в ОА-сигнал [58, 293].

Сигнал, обусловленный эффектом электрострикции в лазерном пучке, возникает одновременно в том же объеме, что и полезный сигнал, и поэтому не может быть выделен стробированием. Эффект электрострикции обнаруживается при $\mu_a \approx 10^{-6} \text{ см}^{-1}$. Тем не менее, благодаря слабой его зависимости от длины волны, существует возможность исключения его влияния на форму ОА-спектра исследуемого вещества. Таким образом, реальная чувствительность ОА-метода составляет $10^{-6} - 10^{-7} \text{ см}^{-1}$. В то же время применение специальных мер по устранению фоновых сигналов в газах позволяет получить чувствительность метода μ_a , равную 10^{-9} см^{-1} . Данные по чувствительности ОА-метода и других калориметрических методов и их модификаций представлены в табл. 7.1 [5, 58].

7.3. Конструкции спектрофонов и зондов

Рассмотрим нерезонансные спектрофоны и зонды [5, 58, 329, 1223]. Под нерезонансным спектрофоном понимают такую ОА-ячейку, которая не обладает заметными резонансными свойствами. Такие ячейки целесообразно применять при импульсном возбуждении, а также в тех случаях, когда объем исследуемого вещества очень мал или когда в качестве информационного сигнала используется фазовый сдвиг (см. (7.16)). Наиболее простой и самой распространенной конструкцией спектрофонов, используемой при исследовании газов, является цилиндр с прозрачными для лазерного излучения окнами на торцах и с микрофоном в боковой стенке цилиндра (рис. 7.9, а).

Увеличения чувствительности можно добиться оптимизацией формы ячейки или многократным пропусканием лазерного пучка через ячейку [1223]. В первом случае стремятся, насколько это возможно, уменьшить эффективное сечение ячейки, так как амплитуда ОА-сигнала, согласно (7.10) и (7.15), обратно пропорциональна сечению (R^2). Однако для снижения влияния стенок отношение радиусов светового пучка

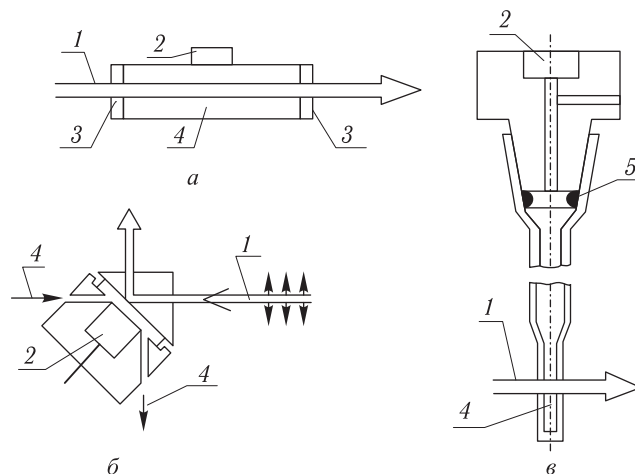


Рис. 7.9. Конструкции спектрофонов, используемых при исследовании газообразных веществ [5, 329]: 1 — пучок света; 2 — микрофон; 3 — окошко; 4 — газ; 5 — фторопластовая диафрагма

и ячейки, как правило, не должно превышать 0,2. Многократное пропускание света через ячейку эквивалентно увеличению мощности или энергии падающего излучения, поэтому приводит к усилению акустического сигнала. Поскольку реальная чувствительность спектрофона определяется уровнем фоновых сигналов, то конструирование ОА-ячеек идет по пути максимального снижения их влияния на полезный сигнал. Один из возможных путей снижения — сравнение сигналов от двух идентичных ячеек, заполненных газом с близкими термодинамическими параметрами и освещаемых одинаковыми пучками света. Возможно как параллельное, так и последовательное расположение ячеек. В общем случае при равных объемах обеих камер их длина и, соответственно, диаметры могут быть различными, так как согласно (7.10) и (7.15) полезные сигналы от таких камер сильно различаются по амплитуде, а фоновые сигналы остаются одинаковыми и «вычитаются» на дифференциальном микрофоне.

Хорошие результаты можно получить, существенно уменьшая объем ячейки, при условии, что ее эффективное поперечное сечение также уменьшается, т. е. отношение длины ячейки к наименьшему из поперечных размеров составляет 6–10. Проблема уменьшения объема исследуемого вещества связана, в частности, с возможностью определения минимального количества примеси в газах, а в случае жидкостей или порошков — с проблемой изучения состава редких и дорогостоящих веществ (например, вновь синтезированных в малых количествах лекарственных препаратов). ОА-метод в настоящее время, по-видимому, единственный метод, который может обеспечить необходимую чувствительность при исследовании минимального количества. Так, для спектрофона, использующего явление полного внутреннего отражения (рис. 7.9, б), объем ячейки составил 0,1 мм³, что (при мощности CO₂-лазера, равной 2 Вт) обеспечило абсолютную чувствительность определения SF₆ в атмосфере Ne порядка 2 нг. Работа устройства основана на поглощении неоднородной приповерхностной волны, проникающей из более плотной в менее плотную среду в условиях полного внутреннего отражения. Оптимизация размеров ячейки позволяет снизить ее объем до 0,25 мкл, т. е. повысить чувствительность до 5 пг.

Важным преимуществом миниатюрных ячеек является возможность работы на сравнительно высоких частотах модуляции (0,1–1,3 кГц), так как время тепловой релаксации ячейки уменьшается пропорционально площади ее поперечного сече-

ния R^2 (см. (7.11)). Это обеспечивает низкий уровень шумов электронной схемы и увеличение быстродействия всего устройства в целом.

При исследовании различных веществ используют ячейку, представленную на рис. 7.9, в. Она изготовлена из цилиндрической кварцевой кюветы диаметром 1 мм, соединенной с кварцевой трубкой (длиной 6 см, внутренним диаметром 2 мм), открытый конец которой закрывается тефлоновой пробкой; внутри пробки расположен микрофон. Изменение давления паров передается микрофону по узкому каналу диаметром 0,2 мм, высверленному внутри пробки. С целью устранения попадания паров в полость микрофона соединительный канал перегорожен тефлоновой диафрагмой.

Для регистрации ОА-сигнала в жидкости используют три основных типа спектрофонов: газомикрофонные, жидкостные закрытого и открытого типов.

В газомикрофонных ячейках в качестве измерителя амплитуды акустического сигнала используют обычные микрофоны, а передатчиком акустических колебаний, возникающих при поглощении света в жидкости, является газ. Основная задача при их конструировании состоит в устранении главной причины потери чувствительности всего устройства — влияния рассеянного жидкостью излучения на микрофон. Обычно это достигается уменьшением высоты ячейки и соответствующим размещением микрофона. Сопутствующее уменьшение объема газа также приводит к увеличению чувствительности устройства.

Устройство закрытых жидкостных спектрофонов аналогично устройству газомикрофонных. Однако в качестве датчика ОА-сигнала (гидрофона) обычно применяют пьезоэлектрический преобразователь, находящийся в непосредственном контакте с жидкостью или связанный с ней через согласующие или защитные элементы. Типичная ячейка представляет собой кусок нержавеющей стали кубической формы со стороной 2,5 см, в котором высверлено отверстие диаметром 1,3 см. Внутренняя

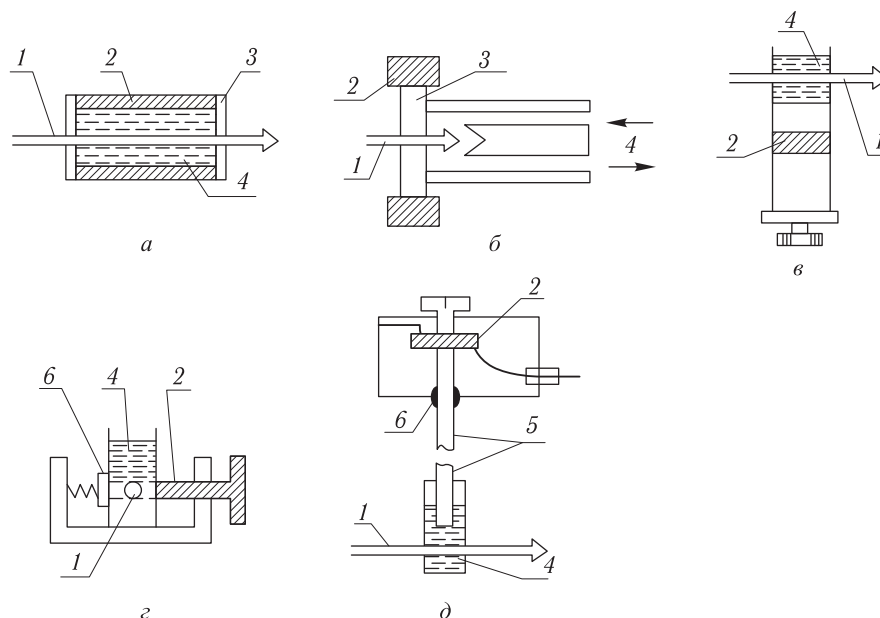


Рис. 7.10. Конструкции спектрофонов, используемых при исследовании жидкостей [5, 329]: 1 — пучок света; 2 — пьезоэлектрический преобразователь; 3 — окошко; 4 — жидкость; 5 — кварц; 6 — резиновая прокладка

поверхность ячейки хорошо отполирована, в результате поглощение света поверхностью сводится к минимуму. Ячейка закрыта кварцевыми окнами с помощью кольцевых тефлоновых прокладок. Именно эти материалы — нержавеющая сталь, кварц и тефлон — оказываются предпочтительными при конструировании спектрофонов, поскольку обеспечивают минимальное загрязнение исследуемых веществ. Благодаря простоте конструкции довольно широкое распространение получила жидкостная ячейка, выполненная на основе пьезокерамического цилиндра, который одновременно является и боковой стенкой ячейки, и приемником ОА-сигнала (рис. 7.10, а). С помощью такой ячейки была достигнута чувствительность устройства по μ_a , равная $2,2 \cdot 10^{-5} \text{ см}^{-1}$. Одна из схем открытой ячейки показана на рис. 7.3. При

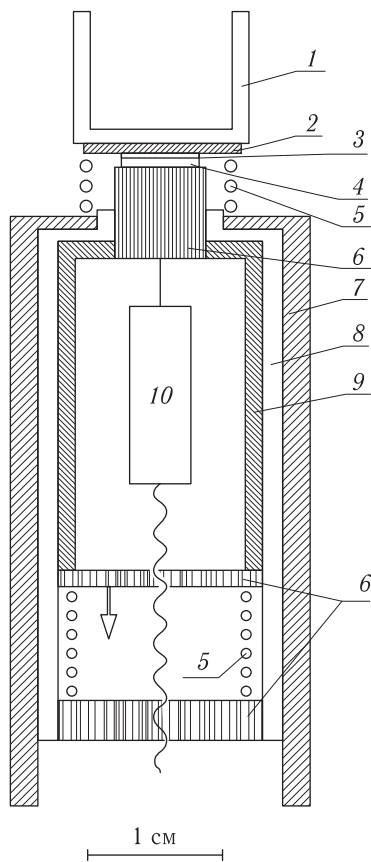


Рис. 7.11. Конструкция спектрофона с кюветой и быстродействующим пленочным детектором акустических колебаний [1274]: 1 — стандартная кювета; 2 — алюминиевая фольга; 3 — PVF_2 — пленочный пьезодатчик; 4 — металлический цилиндр; 5 — стальные пружины; 6 — алюминиевые детали; 7 — корпус из нержавеющей стали; 8 — фторопласт; 9 — плексиглас; 10 — первый каскад преобразователя импеданса

определенных условиях, например, при расположении преобразователя на достаточном удалении от окон (переднего и заднего), фоновые сигналы будут ослаблены и преобразователь должен регистрировать в основном сигнал от жидкости. Другой тип открытой ячейки показан на рис. 7.10, б. Проточная открытая ячейка изготовлена из плексигласового цилиндра, в котором высверлены отверстия для обеспечения протока жидкости, и рабочая камера закрыта с переднего торца сапфировым окном. Окно является приемником акустического сигнала, который преобразуется в электрический с помощью плотно контактирующих с ним двух пьезоэлектрических преобразователей. Объем кюветы — 100 мкл и расход жидкости — 130 мкл/с определяются быстродействием системы при выбранной частоте модуляции ($\omega/2\pi = 31 \text{ Гц}$). Объем исследуемой жидкости существенно меньше (около 1 мкл), так как основное влияние на формирование ОА-сигнала оказывает поглощение в тонкой пленке вблизи окна.

Наиболее удобны в биологических исследованиях спектрофоны, допускающие быструю смену исследуемой жидкости и работу со стандартными кюветами (рис. 7.10, в–д и рис. 7.11). В одном из них кварцевая кювета с исследуемой жидкостью плотно прилегает к кварцевому цилиндру, что обеспечивается тонкой пленкой смазки (например, капель глицерина). Между кварцевым цилиндром и опорным металлическим цилиндром с помощью винта закрепляется пьезоэлектрический преобразователь. Для уменьшения фоновых сигналов от окон применяется дифференциальное включение двух последовательно расположенных ячеек. Для повышения отношения сигнал/шум кварцевый цилиндр между кюветой и ПЗП иногда заменяют на зеркало,

отражающее рассеянный в жидкости свет, а металлическое основание размещают в среде, поглощающей акустические колебания. Другая конструкция содержит кварцевую кювету с полированными стенками, размерами $1 \times 1 \times 5 \text{ см}^3$, толщина стенок 1 мм. Акустическая связь кюветы с ПЗП обеспечивается с помощью резиновой прокладки. Конструкция быстродействующего спектрофона со стандартной кюветой (см. рис. 7.11) содержит пленочный детектор акустических колебаний на основе поливинилиденфторидной (ПВФ₂) пьезоэлектрической пленки толщиной 20 мкм и диаметром 5 мм. Пленочный детектор зажат между алюминиевой фольгой, служащей в качестве одного из электродов детектора, и металлическим цилиндром с диаметром 4 мм и высотой 3 мм, который, в свою очередь, соединен с алюминиевым цилиндром и далее с первым каскадом преобразователя импеданса с полосой 0,5 Гц – 35 МГц. Для осуществления акустического контакта между дном кюветы и поверхностью алюминиевой фольги, а также между металлическим цилиндром и ПВФ₂-пленкой находится тонкая пленка смазки.

Для спектроскопических исследований конденсированных сред удобными в эксплуатации оказываются ОА-зонды для открытых ячеек (рис. 7.10, д). Основным элементом зонда — стержень из плавленого кварца диаметром 8 мм, длиной 20 см — представляет собой акустический волновод. К стержню с помощью клея прикреплен ПЗП (диаметр 12,7 мм, толщина 3 мм), который фиксируется диэлектрическим винтом. Эта часть устройства размещена в металлической коробке, являющейся электрическим экраном. Резиновая прокладка уменьшает акустическую связь коробки и стержня. Стержень опущен в кювету с жидкостью, через которую на 0,3 см ниже нижнего среза зонда пропускается лазерный луч. Такой зонд удобен для применения в биологии и медицине. Его достоинства заключаются в том, что импульсы света и звука сдвинуты во времени, преобразователь акустических колебаний удален от источника колебаний, его устройство допускает охлаждение и работу с корродирующими жидкостями.

В зависимости от решаемых задач при исследовании твердых тел возможны различные типы спектрофонов. Их можно разделить на три группы.

К первой группе относятся спектрофоны, в которых используется непосредственный контакт либо преобразователя, либо кварцевого звукопровода с исследуемым объектом с помощью акустически связующей тонкой пленки жидкости или пружины с резиновой прокладкой. Такие спектрофоны хороши для измерения коэффициентов поглощения в объемных телах (см. рис. 7.3) или в порошках, или в тонких пленках (рис. 7.12, а, б). Ослабление влияния рассеянного света, вызывающего фоновый сигнал, обусловленный пьезоэлектрическим эффектом, на датчик достигается за счет сложной конфигурации звукопровода. Устранить влияние рассеянного света можно либо напылением зеркального слоя в месте контакта звукопровода с пьезоэлектрическим элементом, либо использованием дифференциальной схемы с двумя пьезоэлементами, один из которых механически не связан со звукопроводом, но облучается рассеянным излучением той же интенсивности, что и рабочий.

Основой датчика, удобного для исследования ОА-спектров в условиях низких температур, является кварцевый блок с размерами $2,50 \times 1,20 \times 0,18 \text{ см}^3$, который зажимается между медной скобкой и ПЗП (рис. 7.12, в). Малые габариты датчика позволяют размещать его целиком в криостате. Датчик был использован для исследования ОА-спектров порошков, растворенных в глицерине при температуре 10 К. Он прост в изготовлении и может найти применение в биологических исследованиях при низких температурах.

Ко второй группе спектрофонов относятся газовые ячейки, в которых ОА-сигнал возбуждается в газе за счет изменяющегося во времени нагрева твердого тела при поглощении им света и регистрируется с помощью обычных микрофонов. На рис. 7.12, г

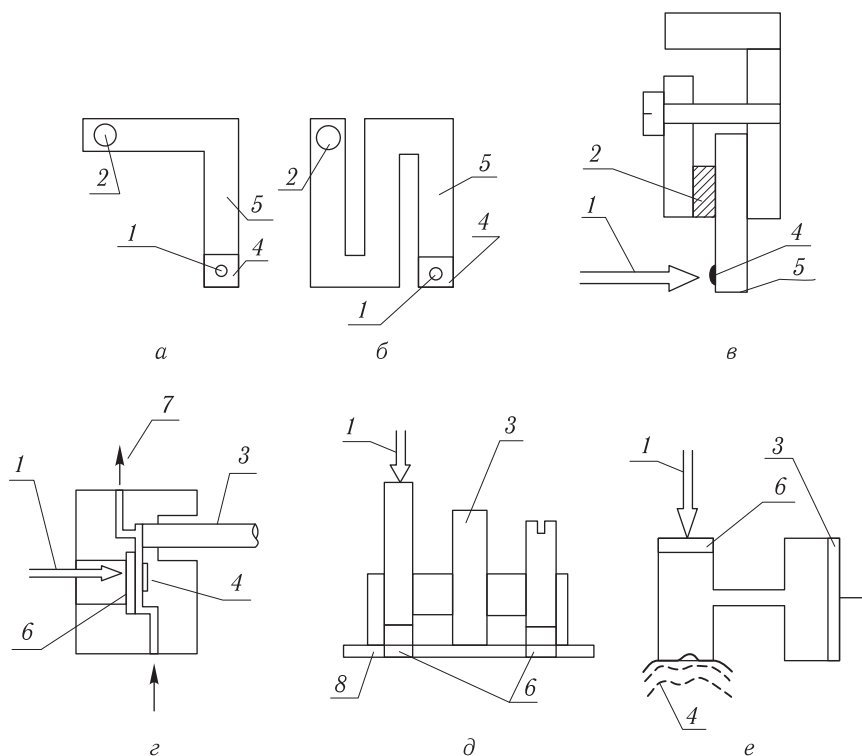


Рис. 7.12. Конструкции спектрофонов, используемые при исследовании твердых тел [5, 329, 1223]: 1 — пучок света; 2 — пьезоэлектрический преобразователь; 3 — микрофон; 4 — образец; 5 — кварц; 6 — окошко; 7 — газ; 8 — липкая лента

показана ячейка, предназначенная для исследования поглощения в твердых образцах. Подстройка объема рабочей камеры, так же как и изменение давления газа, его состава и частоты модуляции, необходима для оптимизации ОА-сигнала как по амплитуде, так и по фазовому сдвигу. Интересный вариант спектрофона представлен на рис. 7.12, д. Дифференциальный микрофон смонтирован между двумя идентичными ячейками. В одну из них введен световод для освещения объекта, а в другую — винт, который позволяет изменять объем ячейки и добиваться минимума влияния фоновых сигналов. Такой детектор приклеивается липкой лентой к исследуемому объекту, например поверхности кожи человека.

Наконец, к третьей группе следует отнести конструкции, в которых жидкость используется в качестве преобразователя тепловых колебаний образца в акустические. Пример такой ячейки показан на рис. 7.3. Очевидно, что любую из открытых или закрытых жидкостных ячеек можно использовать для исследования твердых образцов при условии, что на границе жидкость — акустический датчик потери акустического сигнала малы. Описания различных типов ОА-ячеек, предназначенных для исследования газообразных и конденсированных сред, включая и биологические объекты, можно найти в работах [5, 58, 329, 1223, 1274–1317].

Резонансные явления в акустических резонаторах и конструкции резонансных спектрофонов описаны в работах [58, 329, 1223]. В резонансных спектрофонах реализуется значительное отношение объема ячейки к ее поверхности, что позволяет с большой надежностью работать с газами, поглощаемыми стенками ячейки.

Пространственное распределение акустических полей в соответствии с установившимися типами колебаний позволяет вводить необходимые конструктивные элементы (неоднородности), например трубки для ввода и вывода газа, в те места ячейки, где находится узел стоячей волны, не искажая ее. Более того, одним из важнейших направлений конструирования резонансных ОА-ячеек является устранение фоновых сигналов от окон и других элементов конструкции. Прием тот же самый: в акустическом резонаторе необходимо возбудить такой тип колебаний, чтобы в области локализации окон и этих элементов стоячая волна имела узел.

Типичные значения частоты и добротности акустических резонаторов: $f_p = 10^2 - 10^4$ Гц, $Q = 10^2 - 10^3$. Сравнительно высокая частота колебаний снижает амплитуду ОА-сигнала (см. (7.15)). Причем уменьшение амплитуды не может быть полностью скомпенсировано увеличением добротности резонатора Q (для резонансных ячеек в формулу (7.15) необходимо подставить частоту рабочего резонатора и умножить на Q). С другой стороны, увеличение частоты способствует повышению быстродействия и увеличению отношения сигнал/шум измерительного устройства. В принципе, любая из конструкций, представленных на рис. 7.9–7.12, будет проявлять резонансные свойства на определенных частотах; однако ячейки не оптимизированы по своим резонансным свойствам, и поэтому акустические резонансы, возникающие в системе, являются мешающим фактором. Изменив размеры, например цилиндрической ячейки (см. рис. 7.9, а), можно добиться возбуждения в ней требуемого типа колебаний.

Сравнительно низкие резонансные частоты, возможность управления параметрами имеют так называемые резонаторы Гельмгольца. Они успешно применяются при исследовании как газообразных, так и конденсированных сред. Особенно полезными они оказываются при исследованиях поглощения в твердых телах и жидкостях при низких температурах. В таких случаях используются протяженные ячейки, т. е. микрофонный отсек, содержащийся при комнатной температуре, соединяется узким длинным каналом с рабочим отсеком, находящимся в криостате. Чем длиннее соединительный канал, тем отчетливее резонанс. Снижение температуры образца позволяет существенно (более чем на три порядка) увеличить чувствительность метода, частота резонанса $f_0 \sim T^{1/2}$, где T — температура буферного газа, а добротность $Q \sim T^{-1}$. Одна из конструкций резонатора Гельмгольца, применяемая для исследования биологических тканей, представлена на рис. 7.12, е.

Проблема воспроизводимости результатов измерений, выполненных ОА-методом, связанная с резонансными свойствами системы, является одной из основных. Например, низкая воспроизводимость результатов регистрации импульсного ОА-сигнала, полученного от стандартных кювет высотой 5 см (см. рис. 7.10, в), была обусловлена низкочастотным внешним акустическим шумом, асинхронным с лазерным импульсом. Очень простой прием, заключающийся в уменьшении высоты кюветы до 2 см, позволил существенно снизить влияние окружающих шумов. Поскольку кювета представляет собой своеобразную антенну для приема акустических колебаний, частота собственных колебаний которой зависит от ее высоты, то уменьшение высоты ячейки увеличивает резонансную частоту и уводит ее из области сильных акустических шумов.

В качестве приемников акустических сигналов наибольшее распространение получили микрофоны различных конструкций: цилиндрические, плоские, конденсаторные, а также электретные. Неравномерность частотной характеристики и уровень шумов электретных микрофонов несколько выше, чем у конденсаторных, однако электретные микрофоны имеют малые размеры и не требуют источника напряжения поляризации. Чувствительность лучших микрофонов составляет 50–100 мВ/Па.

Наряду с микрофонами для приема акустических колебаний непосредственно от жидкостей и твердых тел применяются разнообразные пьезоэлектрические преобразователи, чувствительность которых составляет 0,01–1,00 мВ/Па. На рис. 7.3 схематически показана одна из конструкций таких преобразователей. Она состоит из куска плавленого кварца Т-образной формы диаметром 0,63 см и длиной каждого плеча 2,5 см. На нижнюю часть вертикального отростка нанесено отражающее покрытие, на которое приклеен пьезокерамический цилиндр. Эта часть приемника защищена латунным стаканом, который выполняет также функции электрической экранировки. Кварцевый блок сделан таким, чтобы, обеспечивая хорошую проводимость для звуковых волн, свести к минимуму влияние рассеянного лазерного излучения на работу пьезопреобразователя. Собственная резонансная частота ОА-детектора — 250 кГц.

В работе [1223] дано описание другого типа универсального ОА-детектора, изготовленного в виде болта, ввинчивающегося в боковую стенку закрытой жидкостной ячейки или соприкасающегося со стандартной кюветой (см. рис. 7.10, з), с кварцевыми звукопроводами (см. рис. 7.12, а, б) с помощью струбины.

Другая очень простая конструкция ОА-детектора представляет собой пьезокерамический параллелепипед с поперечным сечением $S = 0,7 \times 0,5 \text{ см}^2$ и длиной $d = 1,27 \text{ см}$. На две грани параллелепипеда напылены электроды, и одной из них детектор приклеен к образцу.

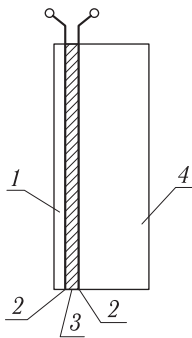


Рис. 7.13. Конструкция пленочного быстродействующего пьезоэлектрического акустического приемника [1291]: 1 — объект; 2 — Al-электроды (0,04 мкм); 3 — пьезоэлектрическая пленка (9 мкм); 4 — согласующий элемент для акустических колебаний (4 мм)

Все рассмотренные приемники ОА-сигналов являются резонансными и используются для приема импульсных сигналов длительностью от 1 мкс до 80 нс. Применение тонких пьезоэлектрических пленок на основе ПВФ₂ позволяет повысить быстродействие до 4 нс (рис. 7.13) [1291]. По сравнению с традиционными микрофонами и ПЗП лазерные и волоконно-оптические приемники ОА-сигналов имеют ряд преимуществ: отсутствие собственных колебаний, возможность снизить шумы электронной аппаратуры при переходе на высокие частоты (отсюда и быстродействие), а также возможность работы с агрессивными средами в условиях высоких температур при наличии значительных электрических и магнитных полей. Три схемы устройств показаны на рис. 7.14. Так называемый лазерный шлирен-микрофон (рис. 7.14, а) предназначен для переноса спектра ОА-сигнала в область высоких частот, что достигается за счет существенного различия в частотах модуляции интенсивности излучения возбуждающего и измерительного лазеров. Спектрофон представляет собой двухкамерный акустический резонатор Гельмгольца, одна из стенок которого закрыта тонкой диафрагмой диаметром 2,54 см. Собственная частота колебаний резонатора равна 505 Гц. На данной частоте модулируют интенсивность излучения (например, СО₂-лазера со средней мощностью 1 Вт, $\lambda = 10,6 \text{ мкм}$), которое поглощается смесью газов, заполняющих спектрофон. Возникающий ОА-сигнал приводит к соответствующим колебаниям кривизны поверхности диафрагмы параболической формы, что вызывает периодическую фокусировку и расфокусировку пучка излучения измерительного He-Ne-лазера, интенсивность излучения модулируется на частоте 50 кГц с помощью акустооптического модулятора. Отраженное от диафрагмы излучение принимается фотоприемником с ограниченной апертурой, находящимся на расстоянии 1,6 м от спектрофона. Сигнал с фотоприемника регистрируется на

частоте 50 кГц с огибающей, пропорциональной ОА-сигналу на частоте 505 Гц. Чувствительность лазерного шпирен-микрофона не хуже чувствительности электрретного микрофона; имеется возможность улучшения чувствительности устройства.

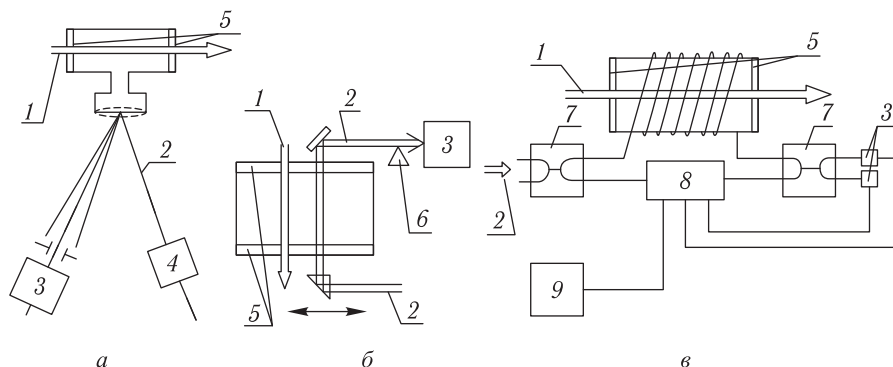


Рис. 7.14. Лазерные и волоконно-оптические приемники ОА-сигналов [329]: 1, 2 — возбуждающий и пробный лазерные пучки; 3 — фотоприемник; 4 — модулятор; 5 — окошко; 6 — нож; 7 — смеситель; 8 — компенсатор; 9 — анализатор спектра

В качестве «приемника» акустической волны можно также использовать пробный лазерный пучок, отклоняющийся за счет изменения показателя преломления (концентрации частиц) в области прохождения акустической волны (рис. 7.14, б) [1223, 1317]. Отклонение лазерного пучка регистрируется с помощью оптического ножа и фотоприемника. Изменяя расстояние между рабочим и пробным лазерными пучками и регулируя длительность импульса возбуждения, можно выделить акустический сигнал и измерить скорость распространения звука в различных средах.

Волоконно-оптический акустический приемник содержит катушку волоконного световода, размещенную внутри газовой или жидкостной ячейки, освещаемой лазерным пучком и включенной в одно из плеч лазерного волоконно-оптического интерферометра, возбуждаемого другим лазерным пучком (рис. 7.14, в). Потенциально волоконно-оптические датчики имеют чрезвычайно высокую чувствительность к акустическим возмущениям (их предельная чувствительность обусловлена броуновскими шумами).

Рассмотрим динамические калориметрические системы. Важным классом диагностических задач в биологии и медицине является анализ перемещающихся газовых и жидкостных потоков, например, газовая или жидкостная хроматография, исследование кровотока, счет одиночных биочастиц (осколки биомолекул, клетки) и пр. В потоках по сравнению со случаем неподвижного вещества меняется характер тепловой диффузии. Время тепловой релаксации вместо уравнения (7.11) определяется следующим соотношением [5, 1292]:

$$\tau_T \approx \frac{(R/2,4)^2}{a_T \pm a_T^n}, \quad (7.20)$$

где $a_T^n = av^*d_f$ — «поточковый» коэффициент диффузии; a — экспериментально определяемый коэффициент ($3 \cdot 10^{-2} - 4 \cdot 10^{-2}$); v^* — сдвиговая скорость; d_f — диаметр потока. Для типичных условий $a_T^n = 7,7 \cdot 10^{-3} \times vr$ (v — скорость потока, r — его радиус).

Некоторые примеры динамических калориметрических систем схематически показаны на рис. 7.15 [1292]. Для динамических измерений в потоках можно исполь-

зовать также традиционные схемы (см. рис. 7.9, а, б; 7.10, а, б). Выбор оптимального соотношения между скоростью потока, частотой модуляции света и расстоянием между зонами возбуждения и регистрации позволяет в схеме (рис. 7.15, а) достичь пороговой чувствительности по поглощению на уровне 10^{-7} см⁻¹. Дифференциальный пироприемник в данной схеме исключает влияние рассеянного излучения. Схема (рис. 7.15, б) перспективна для применения в жидкостной капиллярной хроматографии. Другая схема (рис. 7.15, в) предназначена для детектирования одиночных частиц, которые, попадая при своем движении в область жесткой фокусировки лазерного пучка, скачком сильно увеличивают амплитуду ОА-сигнала. Эта схема имеет высокое пространственное разрешение, высокую чувствительность и возможность одновременного измерения скорости потока, концентрации поглощающих частиц и температуры среды. Она имеет значительный динамический диапазон (0,1–100,0 см/с) и возможность определения профиля скоростей в сечении потока.

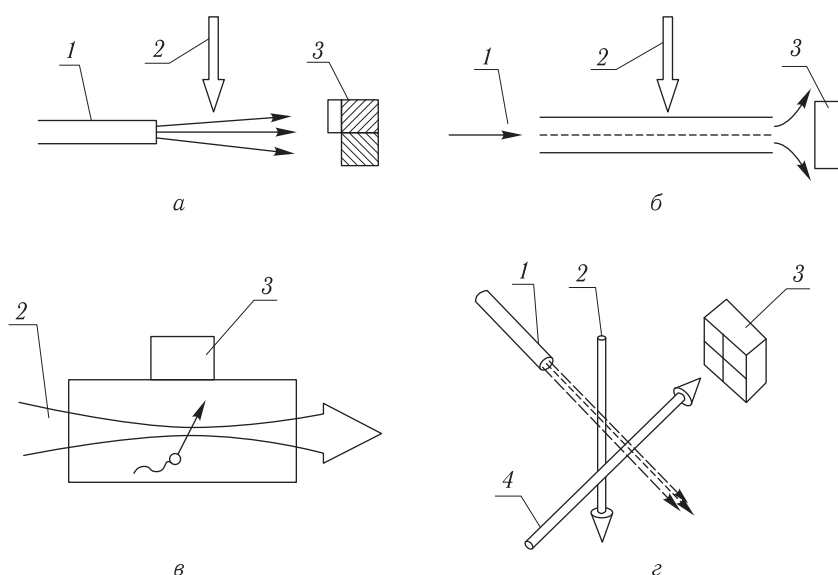


Рис. 7.15. Динамические калориметрические системы [1292], реализующие: а — оптико-термический метод с дифференциальным пироприемником (1 — поток, 2 — возбуждающий лазерный пучок, 3 — пироприемник с изолированной от теплового потока частью приемной площадки); б — ОА-метод с пьезоэлектрической регистрацией (3 — пьезодатчик); в — ОА-метод регистрации одиночных частиц в газах и жидкостях (3 — микрофон или пьезодатчик); г — дефлекционный метод в потоках (3 — позиционно-чувствительный фотоприемник, 4 — пробный лазерный луч)

7.4. Области применения оптико-калориметрических методов в биологии и медицине

Высокая чувствительность, возможность получения значительного разрешения при использовании лазеров в качестве источников излучения, локальность анализа, применимость для исследования веществ в различных агрегатных состояниях и малых объемах, простота обработки результатов и возможность автоматизации делают ОА-метод и другие оптико-калориметрические методы исследования уникальными

с точки зрения областей их применений в биологии и медицине. Они применяются при газовом анализе, необходимом для контроля процессов дыхания и питания микроорганизмов и клеток; анализе загрязнений атмосферы и гидросферы; анализе лекарственных препаратов и биологических сред в виде порошков и тонких пленок; контроле фотохимических, биохимических и иммунологических реакций; изучении фотохромных биологических сред; в лабораторной медицинской диагностике и определении оптических параметров биотканей; в проточной цитометрии *in vivo*; оптико-акустической микроскопии и томографии в офтальмологии, дерматологии и др. [5, 12, 13, 31, 34, 41, 58, 150, 159, 329, 330, 363, 365–368, 372–380, 1223, 1274–1356].

Выделение разнообразных газов в процессе жизнедеятельности человека, животных, микроорганизмов и клеток является важнейшим показателем характера протекания соответствующих биохимических реакций. Поэтому контроль состава и концентрации выделяющихся газов представляет важную задачу в биохимических исследованиях, а также в диагностике некоторых заболеваний. Задача газового анализа сводится к анализу многокомпонентной смеси газов, имеющих, как правило, малые коэффициенты поглощения в видимой и ближней ИК-областях спектра. Применение метода абсорбционной спектроскопии в данном случае требует длины столба газа в несколько десятков и сотен метров (см. главу 6), что в биологическом эксперименте обеспечить трудно. Необходимо также высокое спектральное разрешение для разделения вклада отдельных компонентов в спектры поглощения. Эти проблемы исключаются при использовании ОА-метода, в котором в качестве источников света применяют перестраиваемые лазеры. В ИК-области спектры поглощения паров воды, окиси азота, метана регистрируются с помощью дискретно перестраиваемых DF- (3,5–4,0 мкм) и CO₂- (9,1–11,3 мкм) лазеров. При исследовании многоатомных молекул видимая область спектра поглощения интересна для определения их концентрации в многокомпонентной смеси. Она формируется за счет колебательных обертонов высокого порядка, и поэтому интенсивность поглощения чрезвычайно мала. В данном случае ОА-метод с использованием перестраиваемых лазеров на красителях оказывается одним из наиболее надежных методов исследования. Методом внутрирезонаторной ОА-спектроскопии, обеспечивающим при использовании лазеров на красителях частичное разрешение вращательной структуры полос колебательного поглощения (1 см⁻¹), удается получить наиболее полные спектры обертонового колебательного поглощения (вплоть до 7–9 порядков) таких многоатомных молекул, как HCl, небольших органических молекул типа C₆H₆, модификаций метанола CH₃OH, CH₃OD и SiHD₃ в газовой фазе.

Имеется возможность исследования паров азулена с помощью ОА-кюветы (см. рис. 7.9, в) с высокой точностью, определяемой шириной линии генерации импульсного лазера на красителях с ламповой накачкой, и высокой чувствительностью, позволяющей регистрировать ОА-спектры даже при комнатной температуре при длине пути поглощения, равной всего 1 мм. Ранее для получения спектра поглощения азулена в паровой фазе с той же чувствительностью и меньшим разрешением требовалась длина пути поглощения, равная 4 м (абсорбционно-трансмиссионный метод).

Описанные методы линейной спектроскопии с применением перестраиваемых лазеров позволяют проводить анализ многокомпонентных смесей газов, включая и изотопы. В ОА-спектроскопии существуют и другие подходы к решению задачи газового анализа. Например, перспективным является сочетание ОА-метода и метода газовой хроматографии, обеспечивающее анализ предварительно разделенных компонентов исследуемой смеси. Высокая эффективность ОА-детектирования в газовой хроматографии продемонстрирована на примерах селективного анализа изомеров бутилового спирта и ксилолов, определения содержания трансизомеров жирных кислот

в образцах пищевых жиров, детектирования гербицидов и пр. [1293]. Используются также специфические особенности ОА-метода, заключающиеся в изменении ОА-сигнала в зависимости от параметров буферных газов (непоглощающих газов), их молекулярного веса, изотопного состава, теплоемкости, теплопроводности и вязкости. Обычно применяют резонансные спектрофоны, для которых свойства буферных газов проявляются в смещении резонансной частоты, обусловленном изменением скорости звука в смеси, и изменении добротности акустического резонатора за счет различных механизмов затухания в буферных газах.

При анализе загрязнений атмосферы в полной мере реализуются достоинства ОА-метода: высокая чувствительность и чрезвычайно широкий динамический диапазон. Для газов, присутствующих в атмосфере, динамический диапазон по параметру $\mu_a d$ составляет 10^{-7} – 10^{-1} при длине кюветы 10 см. Нижний предел определяется чувствительностью спектрофона, а верхний — процессами насыщения. Широкий динамический диапазон позволяет с помощью одного и того же устройства регистрировать следы веществ, загрязняющих атмосферу (малые уровни), и источники загрязнения (большие уровни). Поскольку метод позволяет регистрировать загрязнение в ограниченном объеме (локально) и в реальном масштабе времени, то обеспечивается возможность анализа динамики поступления и ухода примесей в исследуемом объеме. Например, используя дискретно перестраиваемые СО- и СО₂-лазеры, оказывается возможным регистрировать многие из обычных промышленных загрязнений атмосферы (СО, NO, NO₂, NH₃ и т. д.) на уровне их концентрации порядка нескольких частей на миллион (ppm).

В многоволновом газоанализаторе на основе внутррезонаторной ОА-спектроскопии с использованием СО-, СО₂- и He–Ne (3,39 мкм) лазеров для устранения фоновых сигналов была применена модуляция длины волны [1294]. В зависимости от используемого лазерного модуля пределы обнаружения примесей (NO, NO₂, NH₃, C₂H₄, $\sum C_n H_{2n+2}$) в газе при атмосферном давлении составляют 0,1–10³ ppb, динамический диапазон газоанализатора — 10²–10⁵. С помощью компактного волноводного СО₂-лазера с поперечной ВЧ-накачкой можно обеспечить диагностику загрязнений от гидразивного топлива и токсических промышленных веществ на уровне 1–100 ppb.

Отсутствие плавно перестраиваемых лазеров с достаточной выходной мощностью в ИК-области спектра (2–15 мкм) несколько сдерживает широкое внедрение в практику ОА-метода анализа загрязнений атмосферы. В связи с этим перспективными считаются методы нелинейной фотоакустической спектроскопии, в частности активной спектроскопии комбинационного рассеяния. С их помощью определены пороги обнаружения газов: СН₄, СО₂, NO₂ и С₂Н₃Сl в атмосфере; они находятся в пределах 1–10 ppm [58, 329].

Применение ОА-метода перспективно также и для определения малых примесей в жидкостях. Используются лазеры как непрерывного, так и импульсного действия. При работе двухволнового Аг-лазера и жидкостной ячейки (см. рис. 7.10, а) удалось зарегистрировать следы β-каротина в хлороформе на уровне 12 ppt (0,08 нг/мл). Аналогичная ячейка и Аг-лазер (514,5 нм) мощностью 0,5 Вт использовались для детектирования малых концентраций на уровне 14 ppt (0,02 нг/мл) Cd в пенициллине после его экстракции в хлороформ, а также для анализа малых концентраций канцерогенных пищевых красителей в воде: $2,75 \cdot 10^{-8}$ моль/л (0,7 ppb). Предел обнаружения витамина А в экстрактах из крови при возбуждении излучением импульсного азотного лазера (337,1 нм) составляет 1 ppt (2 пг/мл) [58, 329].

Считается, что импульсный метод может иметь более высокую чувствительность (порядка 1–10 ppt) при определении малых концентраций. Однако, чтобы

реализовать такую чувствительность, необходим специальный растворитель. Вода оказывается не лучшим растворителем, поскольку довольно значительно поглощает свет даже в видимом диапазоне длин волн. Импульсные азотные лазеры, а также лазеры на красителях успешно применяются для определения малых концентраций различных порфиринов, красителей, лекарственных препаратов, включая наркотики, и витаминов на уровне 0,09–1,00 ppb [1295]. В качестве растворителей используются вода, этанол, гексан, CCl_4 и др., а в качестве детекторов — наиболее простые кюветы (см. рис. 7.10, в) или акустический зонд (см. рис. 7.10, д). Результаты измерений в виде предельных концентраций анализируемых веществ представлены в табл. 7.2.

Таблица 7.2. Предельные концентрации различных порфиринов, лекарственных препаратов и витаминов, регистрируемые ОА-методом с помощью импульсного азотного лазера (337,1 нм) при температуре 298 К [1295]

| Вещество | Растворитель | Концентрация, нг/мл |
|---------------------------------------|--------------|---------------------|
| Бактериохлорофилл <i>a</i> | Этанол | 1,0 |
| Билирубин | Этанол | 20 |
| Биливердин | Вода | 0,9 |
| Хлорофилл <i>a</i> | Этанол | 0,9 |
| Хлорофилл <i>b</i> | Этанол | 0,3 |
| Хлорофилл, водный золь | Вода | 5,0 |
| Хлорофиллин | Вода | 3,0 |
| Копропорфирин III, тетраэтиловый эфир | Этанол | 2,0 |
| Кумарин 120 | Этанол | 1,0 |
| Цитохром <i>C</i> | Вода | 30 |
| Эозин | Вода | 4,0 |
| Флуоресцеин, двунариевая соль | Вода | 3,0 |
| Гематин | Вода | 1,0 |
| Гематопорфирин | Этанол | 0,3 |
| Гемоглобин | Вода | 70 |
| Мезопорфирин IX, диметилловый эфир | Этанол | 0,5 |
| Оксазин перхлорат | Этанол | 3,0 |
| Протопорфирин IX, диметилловый эфир | Этанол | 0,09 |
| Протопорфирин, двунариевая соль | Вода | 1,0 |
| Родамин 6Ж | Вода | 2,0 |
| Рибофлавин | Вода | 10 |
| Тетрафенилпорфин | Любой | 6,0 |
| Уропорфирин I, этиловый эфир | Этанол | 2,0 |
| Витамин B_{12} | Вода | 4,0 |

В связи с проблемами захоронения ядерных отходов исследовались ОА-спектры ионов актиноидов в водных растворах. При использовании в качестве источника возбуждения ОА-спектров лазера на красителях (460–553 и 481–875 нм) с накачкой ХеСл эксимерным лазером и ОА-ячейки (см. рис. 7.11, в) удалось получить следующие значения пределов обнаружения ионов: U(IV), U(VI) $\approx 8 \cdot 10^{-7}$ моль/л, Pu(IV) $\approx 7 \cdot 10^{-8}$ моль/л, Pu(VI) $\approx 3 \cdot 10^{-8}$ моль/л и Am(III) $\approx 2 \cdot 10^{-8}$ моль/л.

Высокоэффективная колончатая жидкостная хроматография в сочетании с лазерной оптико-акустической спектроскопией дает чувствительность на уровне 1 ppt при обнаружении витамина А в биообразцах [293].

Метод «тепловой линзы», позволяющий проводить измерения с достаточно высоким временным разрешением, был использован для изучения квантового выхода Φ_{Δ} и времени жизни τ_{Δ} синглетного кислорода $O_2(^1\Delta_g)$, сенсibilизированного гематопорфирином и его производными, растворенными в этаноле [1277], а также многими другими фотосенсibilизаторами, растворенными в бензоле. Квантовый выход синглетного кислорода $\Phi_{\Delta} = S_{\Delta}\Phi_{ISC}$, где S_{Δ} — доля неупругих взаимодействий кислорода и сенсibilизатора, приводящих к образованию $O_2(^1\Delta_g)$, Φ_{ISC} — квантовый выход для процесса образования триплетных состояний фотосенсibilизатора (см. рис. 1.33). Так, для гематопорфирина в этаноле $\Phi_{\Delta} = 0,53$, $\tau_{\Delta} = 29 \pm 3$ мкс, для других исследованных сенсibilизаторов Φ_{Δ} и S_{Δ} изменяются в широких пределах: $\Phi_{\Delta} = 0,17-0,84$; $S_{\Delta} = 0,25-1,00$.

ОА-диагностика аэрозолей, мутных и коллоидных растворов важна для качественного и количественного анализа загрязнений атмосферы и гидросферы микрочастицами природного и промышленного происхождения, для контроля за ходом разнообразных биохимических реакций, поскольку по сравнению с традиционно используемым для этих целей абсорбционно-трансмиссионным методом она дает возможность определять малые концентрации микрочастиц, обеспечивает локальность измерений и высокую точность за счет малого влияния эффектов светорассеяния.

Анализ атмосферных аэрозолей ОА-методом можно проводить непосредственно в газовом потоке или (с предварительной их концентрацией) на специальных фильтрах. В качестве источников излучения используют CO_2 -, Ar-, He-Ne-, АИГ:Nd- и HF-лазеры, а также лазеры на красителях. Применяют резонансные и нерезонансные спектрофоны, дифференциальные схемы с двумя спектрофонами, калибровку осуществляют по эталонному молекулярному поглощению в газе. Исследовались аэрозоли в виде атмосферной, асбестовой и кварцевой пыли, ацетиленовых, дизельных и сигаретных дымов, выхлопов автомобильных двигателей. Характерные размеры частиц — 0,15–3 мкм. Порог обнаружения на $\lambda = 514,5$ нм приблизительно равен 10^{-6} г/м³ (ацетиленовые и дизельные дымы).

Анализ коллоидных растворов на примере количественного определения частиц $BaSO_4$ в воде показывает значительный динамический диапазон ОА-метода (почти три порядка величины) и его высокую чувствительность (5 нг/мл или 30 ppb) [58]. Применение ОА-зонда, подобного представленному на рис. 7.10, д, при импульсном его возбуждении излучением лазера на красителях позволило продемонстрировать возможность изучения седиментации частиц молекулярных или макроскопических размеров в гравитационном поле или в центрифуге [1296]. На примере исследования седиментации гуминовых кислот удалось определить динамику осаждения частиц разных размеров (0,08–0,50 мкм). С помощью спектрофона (см. рис. 7.15, в) можно регистрировать отдельные частицы пыли в сверхчистых растворителях.

Основные достоинства ОА-метода — высокая чувствительность и возможность работы в условиях значительного рассеяния света — реализуются при изучении поглощения света в порошках твердых тел и тонких пленках жидкостей. Наиболее чувствительные из рассмотренных выше методов регистрации ОА-сигнала позволяют измерять поглощение света по параметру $\mu_a d$ на уровне $10^{-5}-10^{-6}$, следовательно у веществ с коэффициентом поглощения порядка $\mu_a \approx 10^3-10^2$ см⁻¹ можно регистрировать молекулярный монослой ($d \approx 10^{-8}$ см). Для анализа порошков необходим тщательный выбор технических условий эксперимента, способствующих устранению влияния рассеянного излучения. Газомикрофонный метод можно реализовать с помощью нерезонансного спектрофона (см. рис. 7.12, г). Для пьезоэлектрической регистрации сигнала наиболее подходят конструкции спектрофонов, представленные на рис. 7.12, а–в. Желательно, чтобы исследуемый образец был достаточно оптически

тонким и не поглощал весь падающий на него свет, в противном случае появляется неопределенность в характере зависимости интенсивности света от глубины его проникновения в образец, обусловленная как эффектом сильного рассеяния (увеличение интенсивности в верхних слоях образца), так и эффектом насыщения и влияния частоты модуляции. Указанные недостатки устраняются при реализации ОА-метода с помощью ОА-детектора (см. рис. 7.12, а, б), допускающего размещение порошка в виде тонкого слоя, толщиной в несколько микрон, между двумя кварцевыми пластинами. Для уменьшения рассеяния порошок предварительно размешивают в капле вязкой жидкости, имеющей показатель преломления, близкий к показателю преломления вещества порошка. При использовании в качестве источника света перестраиваемого лазера на красителях масса освещаемого порошка составляет менее 0,1 мкг.

Фазовый метод в сочетании с жидкостной ячейкой открытого типа (см. рис. 7.10, б) позволяет разделять объемное и поверхностное поглощение света в жидкостях на границе с поверхностью твердого тела, в частности изучать кинетику процессов абсорбции и десорбции молекул на поверхности тела, а также исследовать характер протекания фотохимических реакций, если они сопровождаются изменением поглощения жидкости твердым телом (подложкой). Такая возможность была продемонстрирована на примере молекул S-2160 (трипептид), используемых при измерениях ферментативной активности веществ. Исследования тонкого слоя порошка трипептида, полученного выпариванием его из капли водного раствора на поверхности сапфирового окна, показали, что за счет протекания фотохимической реакции регистрируемые ОА-спектры существенно изменяются [329].

Перспективно применение ОА-метода в тонкослойной хроматографии [58, 293]. Для исключения фоновых сигналов от хроматографической пластинки обычно используется одновременное облучение на двух длинах волн. Оказывается возможным обеспечить измерения количественного состава разделенных веществ *in situ*. Чувствительность анализа в значительной мере определяется материалом подложки (алюминий, стекло, кремний) и составляет 3–100 нг. Такая методика полезна, например, для контроля качества пищевых продуктов, в частности для определения содержания синтетических красителей в кондитерских изделиях. Сочетание пространственного (по поверхности хроматографической пластинки) и спектрального (при использовании лазеров на красителях) сканирования позволяет осуществлять двумерный ОА-анализ индивидуальных соединений при их неполном разделении [58, 293].

Применение метода тепловой линзы (см. уравнение (7.6) и рис. 7.6) для регистрации поглощения позволяет по крайней мере на порядок повысить чувствительность метода капиллярного электрофореза, который используется для определения токсических загрязнителей, требуемый объем пробы оказывается чрезвычайно малым, порядка 75 нл [1318].

Интересно применение ОА-метода для клинического определения концентрации глюкозы в растворе крови с помощью специальной многослойной окрашенной пленки толщиной 400 мкм. Диапазон измерений метода, 0–2 г/л, оказывается достаточным для быстрой и точной диагностики диабета [1297]. Перспективы применения ОА-метода для неинвазивного определения концентрации глюкозы *in situ* обсуждаются в работах [34, 1297, 1342].

В ферментативных реакциях окисления в живых клетках участвует сложное органическое соединение НАДН (восстановленный никотинамидадениндинуклеотид). ОА-спектроскопия НАДН является очень чувствительным методом как для обычных биохимических анализов, так и для исследования сложных процессов (диапазон концентраций НАДН равен $5 \cdot 10^{-7}$ – $1 \cdot 10^{-5}$ моль, источник света — импульсный азотный лазер, ОА-ячейка — с пьезоэлектрическим гидрофоном) [329].

Имеется возможность обнаружения бактерий и определения различных состояний в их развитии оптико-калориметрическими методами. Так, если в спектре *Bacillus subtilis* наблюдается сильно поглощающая область, около 410 нм, то бактерии существуют в виде спор; если она отсутствует, то бактерии находятся в вегетативном состоянии. В клетках, выделенных из цианобактерий *Anabaena 7120*, ОА-методом изучены циклический транспорт электрона в фотосистеме 1, процессы фиксации азота и дыхания.

С помощью ОА-метода изучают воздействие медикаментов на микроорганизмы, например, действие антималярийного препарата на лиофильные клетки малярийных паразитов. Он не требует специальной подготовки таких образцов и позволяет проводить исследования *in vivo*. Еще одно успешное применение ОА-спектроскопии — это исследование фотоцикла бактериородопсина. Материалом для изучения служат суспензии пурпурных мембран *Halobacterium halobium*. Исследования возможны в широком интервале температур (90–300 К). С помощью частотной зависимости амплитуды ОА-сигнала можно различать модели энергетики фотоцикла бактериородопсина [329].

С использованием импульсной ОА-спектроскопии с временным разрешением, равным 1,4 мкс, были проведены прямые измерения процессов запасаания фотохимической энергии в интактных клетках фотосинтетических бактерий *Rhodospirillum rubrum* [1299]. Из сравнения ОА-сигналов при возбуждении каротиноидов на $\lambda = 532$ нм и бактериохлорофилла на $\lambda = 590$ нм оказалось возможным определить, что от 14 до 54 % квантов, поглощаемых каротиноидами, идет на возбуждение бактериохлорофилла путем синглет-синглетного преобразования энергии в фотореакционном центре.

Исследования с бактериородопсином можно проводить методом температурного скачка, который заключается в быстром импульсном лазерном разогреве водных суспензий и растворов биообъектов и наблюдении кинетики фотохимических процессов [1300]. Наилучшим образом для этих целей подходит излучение АИГ:Ег-лазера с $\lambda = 2,94$ мкм, попадающее в полосу поглощения воды ($\mu_a \approx 10^4$ см⁻¹). Длительности импульсов лежат в пико- и наносекундном диапазоне, разогрев объекта составляет от нескольких градусов до десятков, толщина разогреваемого слоя — от нескольких микрон до десятков микрон.

Абсорбционно-трансмиссионная спектроскопия при исследовании крови, как правило, не дает удовлетворительных результатов из-за светорассеяния, обусловленного наличием липидных материалов в плазме и красных кровяных клеток (такие исследования оказываются возможными при значительном усложнении методик измерения и решения обратной задачи рассеяния (см. главы 1, 2 и 6)). В ОА-спектроскопии рассеяние света не играет решающей роли, поэтому методика исследований оказывается более простой. Например, для регистрации ОА-спектров крови в качестве источника света использовались Аг-лазер (мощностью 30–300 мВт) или ксеноновая лампа (300 Вт) [1301]. ОА-ячейка имела сапфировое окно, через которое осуществлялось освещение и которое служило звукопроводом. На одной кромке окна монтировался пьезоэлектрический кристалл. Конструкция позволяла так размещать ОА-ячейку, что освещение исследуемого образца через сапфировое окно могло осуществляться снизу, сверху или сбоку. Особенность получения ОА-спектров образцов, способных осаждаться (к ним относится и кровь), заключается в том, что поскольку концентрация частиц (в которых происходит поглощение света) неодинакова по глубине и меняется со временем, то амплитуда и фаза сигнала будут зависеть от направления освещения кюветы и меняться с течением времени, что позволяет исследовать процесс осаждения. При освещении кюветы сверху или снизу амплитуда и фаза ОА-сигнала сильно изменялись во времени, а при освещении сбоку оказались

сравнительно стабильными, что позволило получить ОА-спектры цельной крови, в том числе и спектры крови с добавлением токсических веществ. По ним можно судить о химических реакциях в образцах. Многие исследователи указывают на легко регистрируемые изменения в ОА-спектре крови, вызванные разной степенью насыщения ее кислородом. С помощью ОА-спектроскопии цельной крови и выделенных из нее эритроцитов показана возможность диагностики лейкемии (рис. 7.16) и ряда сердечно-сосудистых заболеваний [1302].

Разработаны практические схемы ОА- и ОТ-спектроскопии для гематологии, позволяющие контролировать степень оксигенации цельной крови [1338], процесс ее седиментации и характер патологий. Развиваются также методы ОА-контроля иммунного отклика биологических компонентов в клеточных суспензиях на специфические белковые пробы, служащие индикатором ряда патологий, например злокачественных новообразований в тканях костного мозга или ревматоидных заболеваний.

Первые исследования в дерматологии

ОА-методом были выполнены в основном на вырезанных эпидермальных образцах тканей человека и животных [5, 329]. Была обнаружена полоса поглощения протеинов ($\lambda = 280\text{--}290$ нм), а также получена зависимость амплитуды ОА-сигнала от содержания воды в образце. Интересны эксперименты по контролю медикаментов в тканях,

изучению их действия на кожу, определению скорости их диффузии. Исследования, в частности, показали, что скорость диффузии тетрациклина в коже ладони в 25 раз меньше скорости диффузии воды. Удалось зафиксировать изменения гидратации тонкого рогового слоя (9–13 мкм). Спектр снимается в УФ-области. Увеличение влажности приводит к снижению спектральной кривой за счет изменения свойств рогового слоя (теплопроводности и удельной теплоемкости). Для определения влажности можно ограничиться только одной длиной волны, например в максимуме поглощения на $\lambda = 280$ нм. Глубинное профилирование содержания воды в эпидермисе осуществляют путем изменения частоты модуляции.

Другой подход для определения содержания воды в тканях связан с использованием спектра поглощения воды в ближней ИК-области. Такая методика была апробирована на примере синтетического белка и молочного порошка с помощью ОА-ИК-спектрометра. Оказалось возможным определять наличие свободной и связанной воды при измерении поглощения на $\lambda = 1,9; 2,2$ или $1,4$ мкм. Такая методика определения влажности отличается быстротой проведения анализа, нечувствительностью к изменениям массы образца и размеров частиц.

Главная трудность ОА-измерений на коже *in vivo* состоит в чувствительности микрофона к движениям тела (мышечная активность, ток крови, нервные импульсы). Для преодоления этих трудностей служит спектрометр с дифференциальной ОА-ячейкой с открытым концом для измерения *in situ* (см. рис. 7.12, д). Свет на образец поступает по световоду, поэтому можно прикреплять ячейку к исследуемому образцу в любом удобном месте. Получены ОА-спектры кожи брюшной полости крысы, кожи предплечья человека, обработанной мерброминном. Эксперименты показали, что ОА-сигналы могут быть зарегистрированы с удовлетворительным отношением сигнал/шум. Измерения глубины проникновения светозащитных препаратов в кожу

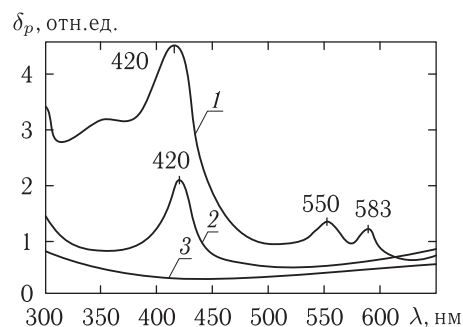


Рис. 7.16. Оптико-акустические спектры цельной крови здорового человека (1) и больного лейкемией (2, 3) [1302]

человека *in vivo* можно осуществить с помощью резонансного микрофона открытого типа (см. рис. 7.12, е) путем изменения частоты модуляции света в широких пределах (0,18–1,20 кГц) [5, 329].

Таким же образом за счет подходящего выбора термодиффузионной длины (изменением частоты модуляции) изучено проникновение в кожу поглощающего в УФ-области спектра лекарственного препарата тизанидина — спазмолитика, вводимого через кожу. Удалось зарегистрировать разницу в количествах препарата в поверхностном роговом слое и более глубоких слоях, откуда он уже разносится кровью, и тем самым оптимизировать процесс его введения в организм. Использование фазового метода ОА-спектроскопии в сочетании с экзогенными красителями позволяет разделить ОА-спектры β -каротина и гемоглобина и тем самым осуществить *in vivo* глубинное профилирование β -каротина в эпидермисе.

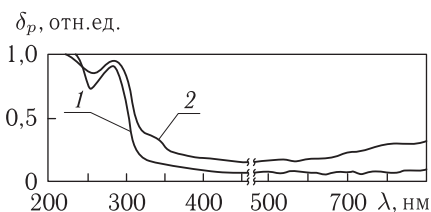


Рис. 7.17. Оптико-акустические спектры нормального (1) и пораженного катарактой (2) хрусталиков [5, 329]

ОА-спектроскопия может быть полезной при диагностике заболеваний глаза. С помощью ОА-методики можно получить спектр поглощения хрусталика, не разрушая его (рис. 7.17). Максимум поглощения при $\lambda = 280$ нм обусловлен поглощением тирозина и триптофана. Хрусталик, пораженный катарактой, имеет более сильное поглощение не только в области длин волн, приблизительно равных 280 нм, но и в видимой и ИК-областях спектра.

Импульсная ОА-спектроскопия с большим временным разрешением (≈ 4 нс, используется пленочный ОА-детектор, показанный на рис. 7.13) на трех длинах волн (экимерные лазеры: KrF (248 нм) и XeCl (308 нм), вторая гармоника АИГ:Nd-лазера (532 нм)) позволяет эффективно исследовать оптические, теплофизические и акустические свойства нормальной и перерожденной ткани аорты человека, определять порог разрушения ткани по энергии и временной экспозиции [1304]. Подобные исследования важны для реализации методов лазерной ангиопластики, а также выявления механизмов абляции биотканей под действием импульсного УФ-излучения. На рис. 7.18 представлена характерная зависимость нормированной амплитуды ОА-сигнала от плотности энергии падающего на биологическую ткань лазерного излучения ([46], с. 1772). На зависимости хорошо определяется пороговая плотность энергии, необходимая для абляции. Установлено, что для ткани артериальной стенки произведение коэффициента поглощения (см^{-1}) и пороговой плотности световой энергии ($\text{Дж} \cdot \text{см}^{-2}$) является константой, не зависящей от длины волны в диапазоне 193–351 нм. ОА-методика дает лучшую точность и большее быстродействие, чем обычно используемые методики, основанные на измерении глубины кратера или газовой хроматографии продуктов реакции для большого числа воздействующих на биоткань лазерных импульсов. В основе ОА-методики лежит тот факт, что в режиме до порога абляции амплитуда ОА-сигнала пропорциональна энергии падающего излучения (см. (7.10)) (соответствует прямой линии, параллельной оси абсцисс на рис. 7.18). В области энергии выше порога абляции ОА-сигнал резко возрастает (повышается давление) за счет выброса молекул из образца.

На примере изучения тонких (порядка 30 мкм) срезов роговицы глаз кролика при облучении ArF-лазером ($\lambda = 193$ нм) определена длительность процесса абляции (порядка 30 нс) [1291]. На рис. 7.19 показаны осциллограммы лазерного и ОА-импульсов в режиме абляции. Измерения проведены с помощью пленочного ОА-приемника (см. рис. 7.13). ОА-метод позволяет также осуществлять мониторинг

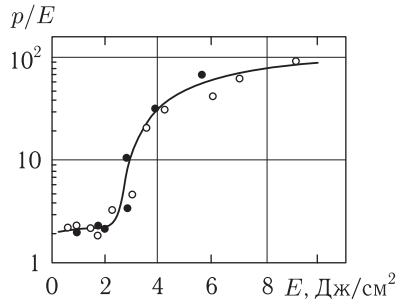


Рис. 7.18. Нормированная амплитуда ОА-сигнала (p/E) для ткани аорты человека в зависимости от плотности энергии падающего излучения ХеСI-лазера ($\lambda = 308$ нм) с длительностью импульса 7 нс (○-○-○) и 300 нс (●-●-●). Абляция имеет место для $E \approx 2$ Дж/см² ([46], с. 1772)

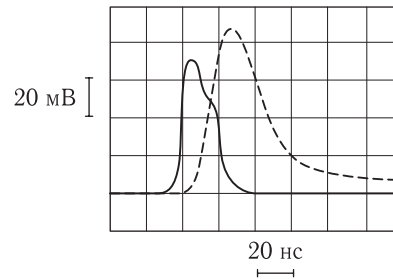


Рис. 7.19. Осциллограммы лазерного (сплошная линия) и ОА-импульсов (пунктирная линия). Использован АгF-лазер ($\lambda = 193$ нм), плотность энергии в импульсе — 366 Дж/см²; объект — тонкий срез (примерно 30 мкм) роговицы глаза кролика [1291]

температуры биоткани и ее коагуляции в процессе лазерной фототермической терапии или ее замораживания и размораживания [1320, 1330, 1331, 1336, 1337]. Контроль процесса абляции ткани (дентина зуба) можно осуществлять и с помощью метода оптотермической радиометрии [1309].

В ряде работ [1290, 1305, 1316] изучаются возможности применения сильных ОА-эффектов в биологии и медицине. В частности, дана классификация сильных ОА-эффектов с точки зрения их применения для деструкции и локальной диагностики биотканей (ОА-«квазигидростатические» эффекты в открытом пространстве с формированием ударных волн, вызванных оптическим пробоем; «механический» ОА-эффект, который включает механическое движение вещества, а также высокоэффективное ОА-преобразование для ультразвуковой диагностики). Исследуются процессы деструкции желчных камней с помощью высокоэнергетического (до 12 Дж) излучения АИГ:Nd-лазера с $\lambda = 1060$ нм, которое доставлялось в область взаимодействия волоконным световодом.

При анализе возможности снижения опасности разрушения окружающих биотканей были проведены исследования влияния сфокусированного излучения АИГ:Nd-лазера с $\tau_i = 10$ нс и 10 пс с соответствующей энергией 80 и 50 мДж на клеточные структуры клеток типа луковичной кожицы [1305]. Оказалось, что при возникающем вблизи области пробоя давлении порядка $2 \cdot 10^3$ атм не обнаруживается деструкция клеточных структур (также и тканей), что можно связать с близостью акустических свойств клеток и воды. Отметим, что регистрация давления внутри исследуемых тканей была осуществлена с помощью лазерного шлирен-метода.

В работе [1290] рассматривался процесс фрагментации мочевых и желчных камней с помощью видимого импульсного излучения микросекундной длительности. Для мониторинга процесса абляции камней и выявления роли воды в формировании волн напряжения использовались дефлекционный (см. рис. 7.7) и пьезоэлектрический пленочный приемники акустических волн. Оказалось, что в воде эффективность фрагментации камней в 10 раз выше за счет иммерсионных свойств воды по отношению к волнам напряжения, проходящим через камень в период лазерной абляции.

Значительные возможности в изучении оптических и теплофизических параметров биотканей имеет метод импульсной оптико-термической радиометрии [1279, 1280, 1282–1284, 1287]. Данный метод также оказался достаточно эффектив-

ным при измерениях коэффициентов поглощения здоровой и патологической ткани артериальной стенки и атеросклеротических бляшек [1281] (данные представлены в табл. 1.3), а также желчных камней [1282] (данные представлены в табл. 3.1). При возбуждении биотканей (дентин зуба, срезы кожи пальца человека) излучением АИГ:Ег-лазера (2,94 мкм) регистрировалось их тепловое излучение в диапазоне 4–9 мкм. Оказалось возможным определять коэффициенты поглощения биоткани

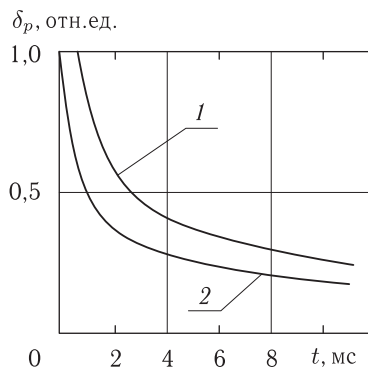


Рис. 7.20. Характерные временные зависимости энергии теплового излучения $S(t)$ от облучаемых АИГ:Ег-лазером мягких биотканей (кожа пальца) для двух длительностей импульсов 1,0 мс (1) и 0,1 мс (2) [1279]

на длине волны лазера и в спектральном диапазоне излучения ткани, температуропроводность и объемную теплоемкость указанных тканей. Для измерений использовалась экспериментальная установка (см. рис. 7.5). Типичные кривые для энергии теплового излучения $S(t)$ показаны на рис. 7.20. Высокую точность измерений коэффициента термодиффузии (температуропроводности, см. (7.12)) биоматериалов обеспечивает метод ИК-оптотермической визуализации [1287]. Например, для гидратированного коллагена типа I в виде тонкой пленки было получено, что $a_T = (1,03 \pm 0,07) \cdot 10^{-7} \text{ м}^2/\text{с}$. В работе [1287] обсуждаются возможности измерений *in vivo*.

Отличительной особенностью трехволнового лазерного ОА-спектрометра для измерения оптических характеристик биотканей [1310] (рис. 7.21, 7.22) является высокочувствительный (100 нВ/Па) и быстродействующий (с полосой пропускания до 300 МГц) акустический преобразователь на кристалле LiNbO_3 , обеспечивающий долговременную стабильность параметров и, соот-

ветственно, прецизионную абсолютную калибровку. Одновременное измерение акустического отклика биоткани и диффузного обратного рассеяния позволяет отдельно определять коэффициенты поглощения и рассеяния образца. При возбуждении образца биоткани коротким лазерным импульсом распределение амплитуды волны

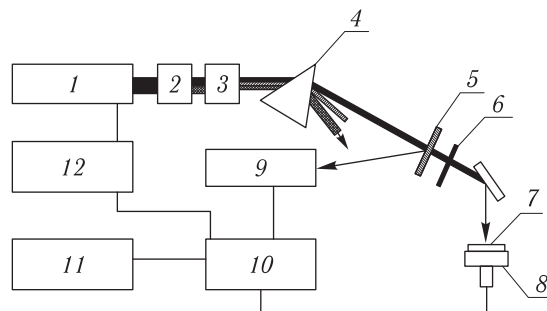


Рис. 7.21. Фотоакустический спектрометр для определения оптических параметров биотканей [1310]: 1 — АИГ:Nd-лазер (1064 нм), 2 — преобразователь во вторую гармонику (532 нм), 3 — преобразователь в третью гармонику (355 нм), 4 — призма, 5 — делитель пучка, 6 — фильтр, 7 — образец, 8 — акустический преобразователь, 9 — измеритель энергии, 10 — цифровой вольтметр, 11 — компьютер, 12 — триггер и линия задержки

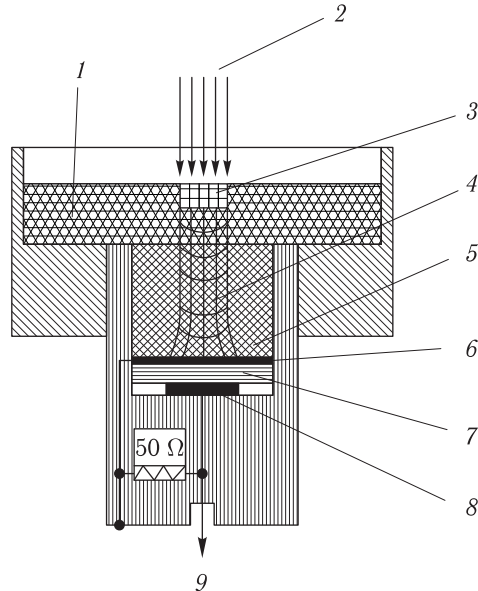


Рис. 7.22. Акустический преобразователь: 1 — биоткань, 2 — лазерный пучок, 3 — облучаемый объем, 4 — акустическая волна, 5 — акустический проводник, 6 — покрытие, согласующее акустические импедансы, 7 — акустический LiNbO₃-детектор, 8 — электрод, 9 — к цифровому осциллографу

давления по глубине образца для $z > \mu_d^{-1}$ определяется соотношением [1310]

$$p(z) = \Gamma \mu_a k E_0 \exp(-\mu_d z), \quad (7.21)$$

$\Gamma = \beta v_a^2 / c_p$; k — коэффициент, учитывающий эффект обратного рассеяния, который увеличивает освещенность верхних слоев ткани; μ_d — диффузионный коэффициент (см. (2.7)); E_0 — плотность энергии лазерного импульса на поверхности образца (Дж/см²), остальные параметры представлены в (7.5). Для оптически толстых образцов

$$k \approx (1 + 7,1R_d),$$

где R_d — коэффициент диффузного отражения.

Соотношение (7.21) справедливо для случая, когда процесс нагрева существенно быстрее скорости расширения среды. Параметр Γ является зависящим от температуры безразмерным параметром, пропорциональным части тепловой энергии, преобразованной в механическое давление. Для воды

$$\Gamma = 0,0043 + 0,0053T,$$

где T — температура, °С; для $T = 37^\circ\text{C}$ $\Gamma \approx 0,2$.

В работе [1310] представлены результаты измерений оптических параметров для ряда биотканей человека и животных, выполненные с помощью ОА-спектрометра, показанного на рис. 7.21. В дополнение к данным табл. 3.1 приведем здесь лишь данные для атеросклеротической аорты человека: $\mu_a = 16,5$; $3,53$ и $0,15 \text{ см}^{-1}$, а $\mu'_s = 72,1$; $36,5$ и $4,85 \text{ см}^{-1}$, соответственно на длинах волн 355 , 532 и 1064 нм , при этом толщина исследуемых образцов была соответственно — ~ 3 , 7 и 12 мм , а среднеквадратичная ошибка измерений оценивалась как ~ 10 , 15 и 50% .

Импульсная оптометрическая радиометрия рассеивающих и слоистых сред позволяет контролировать распределение индуцируемой температуры по глубине биоткани (кожи, зуба и пр.) и тем самым профилировать подповерхностные неоднородности с высоким поглощением (сосудистые образования, меланомы, кариес и пр.) [1283, 1285, 1286, 1288, 1303, 1332–1335]. Пример измеренных *in vivo* распределений температуры по глубине для нормальной и патологической кожи человека с использованием лазера на красителях с ламповой накачкой (577 нм, $\tau = 1$ мкс, плотность энергии 5 мДж/мм^{-2}) показан на рис. 7.23. Аналогичное профилирование заизвесткованной ткани возможно и с использованием ОА-методик [1308].

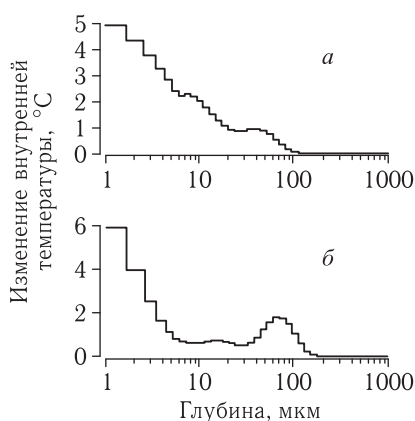


Рис. 7.23. Распределение температуры: *a* — по глубине здоровой части кожи; *б* — по части кожи с «портвейновым пятном» (виден температурный пик на глубине 80 мкм) [1303]

Основные принципы ОА- или фотоакустической микроскопии (ФАМ) достаточно просты [58]. Если в качестве зондирующего пучка используется пространственно-когерентное излучение лазера, то существует возможность его фокусировки до 1 мкм. Сканирование сфокусированного пучка по поверхности объекта и регистрация с помощью микрофона или пьезодатчика акустического сигнала дают локальную информацию об оптических, тепловых и акустических свойствах биообъекта. Одновременное сканирование длины волны излучения позволяет получать локальные спектры поглощения. Амплитуда ОА-сигнала связана обратной зависимостью с интенсивностью люминесценции исследуемого вещества; следовательно, возможно построение аналога люминесцентного микроскопа или микроскопов, основанных на изучении локализованных в пространстве фотовольтаического и фотохимического процессов.

С помощью ФАМ обеспечивается сканирование объекта по его глубине. Изменяя длину волны лазера, регулируют глубину проникновения света в вещество и возбуждают ОА-сигнал на разных глубинах. Другой путь — изменение частоты модуляции лазерного пучка. Данное свойство является уникальным и выделяет ФАМ из других способов микроскопии. Глубина зондирования определяется величиной термодиффузионной длины для данной частоты модуляции. Например, для прозрачного образца ($\mu_a \approx 10^6 \text{ см}^{-1}$) ОА-сигнал можно возбудить на разных глубинах (от 10^{-1} до 10^3 мкм), если изменить частоту модуляции от 100 МГц до 1 Гц. Как уже было сказано, фазовый метод также позволяет разделить поверхностное и объемное поглощения. Однако и в фазовом методе для непрерывного сканирования по глубине необходимо изменение частоты модуляции.

Технические решения в области применения ФАМ проанализированы в работе [58]. Достигнутая разрешающая способность ФАМ в видимой области спектра не превышает 7–15 мкм; поэтому устройства, реализующие ОА-метод, пока не могут составить конкуренцию оптическому микроскопу. Однако по информативности ФАМ существенно превосходит оптическую микроскопию, так как позволяет визуализировать детали микроструктуры непрозрачных для зондирующего света объектов. В связи с этим ФАМ существенно дополняет и расширяет традиционные методы микроскопии и имеет значительные перспективы применения в биологии и медицине. Например, эффекты возбуждения акустических волн мощным лазерным импульсом

Технические решения в области применения ФАМ проанализированы в работе [58]. Достигнутая разрешающая способность ФАМ в видимой области спектра не превышает 7–15 мкм; поэтому устройства, реализующие ОА-метод, пока не могут составить конкуренцию оптическому микроскопу. Однако по информативности ФАМ существенно превосходит оптическую микроскопию, так как позволяет визуализировать детали микроструктуры непрозрачных для зондирующего света объектов. В связи с этим ФАМ существенно дополняет и расширяет традиционные методы микроскопии и имеет значительные перспективы применения в биологии и медицине. Например, эффекты возбуждения акустических волн мощным лазерным импульсом

короткой длительности можно использовать для диагностики катаракты, внутриглазных новообразований [1305]. Промышленный лазерный фотоакустический микроскоп типа ФМ-3М, предназначенный для изучения широкого класса биообъектов и биотканей (визуализация структурных дефектов и особенностей строения), описан в работе [1306].

Визуализация и определение локальных значений теплофизических параметров тонких срезов (порядка 5 мкм) тканей глаза собаки и почек мыши с помощью установки, представленной на рис. 7.4, описаны в работе [1278]. Срез биоткани располагался на тонкой медной фольге (5 мкм) и размещался в спектрофоне, заполненном жидким парафином, прозрачным для опорного светового пучка. Мощность излучения лазера — 200 мВт, частота модуляции — 970 Гц. Для фокусирующей линзы с фокальной длиной 40 мм интервал сканирования равен 25 мкм в пределах поля $100 \cdot 100$ точек, а для линзы с фокальной длиной 100 мм интервал сканирования — 100 мкм в пределах поля из 50×50 точек. Изометрическое представление пространственного распределения сдвига фаз ОА-сигнала на экране монитора позволяет не только визуализировать скрытую структуру биоткани, но и определять локальные значения температуропроводности a_T ; например, для области оптического нерва глаза собаки $a_T = 1,9 \cdot 10^{-3} \text{ см}^2/\text{с}$.

С учетом сравнительно высокой частоты модуляции лазерного пучка термодиффузионная длина $l_T = 8 \text{ мкм}$ (см. (7.17)), следовательно в данном случае пространственное разрешение определяется диаметром сфокусированного лазерного пучка, т. е. имеется потенциальная возможность улучшить разрешение вплоть до 8 мкм. Более высокое разрешение требует еще большего увеличения частоты модуляции. Однако следует помнить, что с ростом частоты амплитуда ОА-сигнала падает и возникают трудности при измерениях сдвига фаз.

Точность определения температуропроводности составляет несколько десятков процентов, что обусловлено в основном трудностями в определении толщины объекта. Хотя метод был реализован для фиксированных образцов биотканей, в принципе он не требует фиксации, следовательно, интересен для установления связи между тепловыми свойствами и физиологическими функциями биологических микроструктур.

В работе [1307] описан ФАМ с оптическим сканированием, который может быть использован для исследования биологических материалов. Микроскоп имеет пространственное разрешение около 20 мкм, площадь сканирования — $5 \times 5 \text{ мм}^2$, рабочие длины волн — 457,9; 476,5; 488,0; 496,5 и 514,5 нм (излучение Аг-лазера),

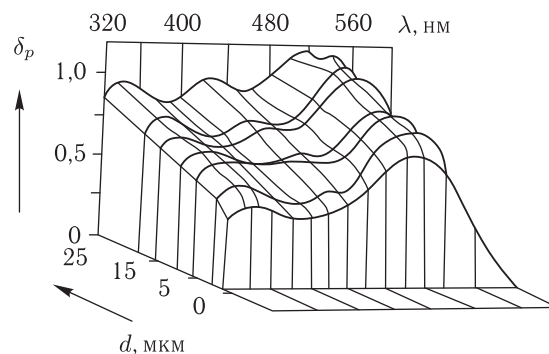


Рис. 7.24. Результаты ОА-спектроскопии глубинного профилирования (d) ретинальной оболочки глаза при 77 К

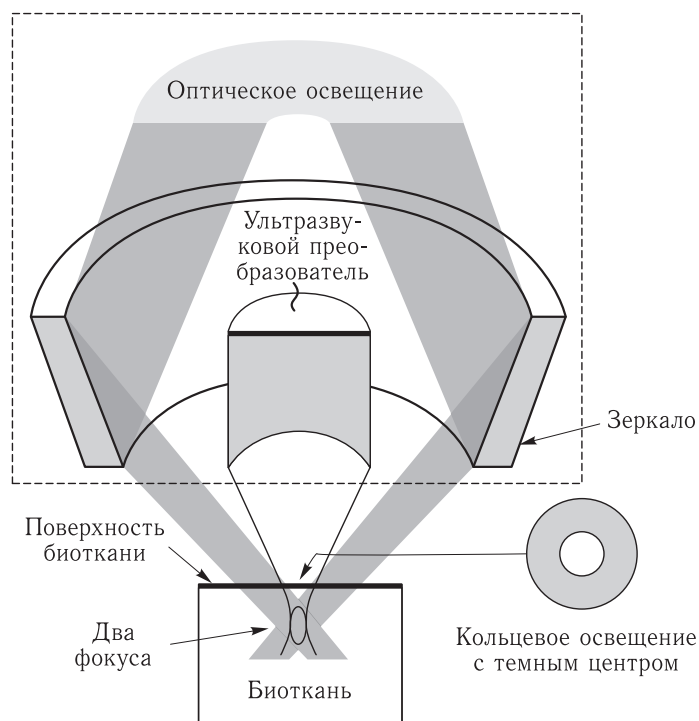


Рис. 7.25. Принцип действия фотоакустического микроскопа (ФАМ) темного поля для исследований *in vivo* [1340, 1348]

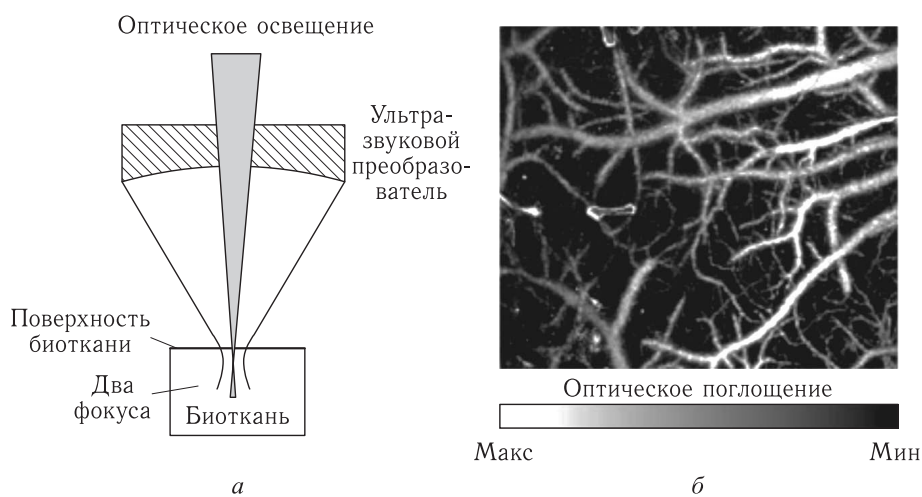


Рис. 7.26. Принцип действия конфокального ФАМ светлого поля с оптическим разрешением (а); *in vivo* изображение микрососудистой сети мозга мыши, полученное через интактную черепную коробку (б) [1348]

частоты модуляции — 20 Гц – 2 кГц. Он обеспечивает визуализацию объектов на экране монитора. Развертка строки осуществляется в пределах 2–120 с, количество строк изменяется дискретно: 32, 64, 128 и 256. Минимально регистрируемое изменение температуры при $f = 25$ Гц и полосе частот, равной 0,5 Гц, $\Delta T_{\min} \approx 10^{-5}$ К.

В качестве одного из примеров глубинного профилирования биотканей на рис. 7.24 представлены ОА-спектры, полученные для разных глубин (5–25 мкм) ретиальной оболочки глаза путем изменения частоты модуляции в диапазоне от 600 до 50 Гц. Для микроанализа иммунного отклика биологических компонентов тканей и клеточных суспензий может служить ОА-микроскоп на основе He-Ne-лазера ($\lambda = 632,8$ нм) мощностью 25 мВт.

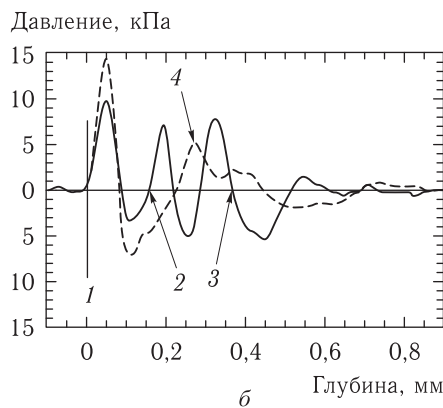
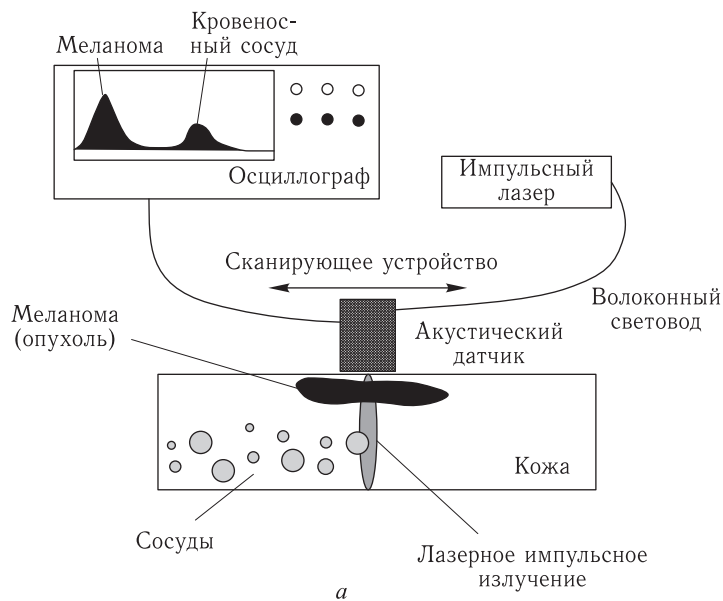


Рис. 7.27. Схема устройства импульсного ОА-томографа (а); измеренный *in vivo* ОА-сигнал для опухоли (сплошная линия 2, 3; 2 — передняя часть опухоли, 3 — задняя часть опухоли) и здоровой ткани (пунктирная линия 4) на модели карциномы груди (мышь), 1 — поверхность кожи (б) [1312]

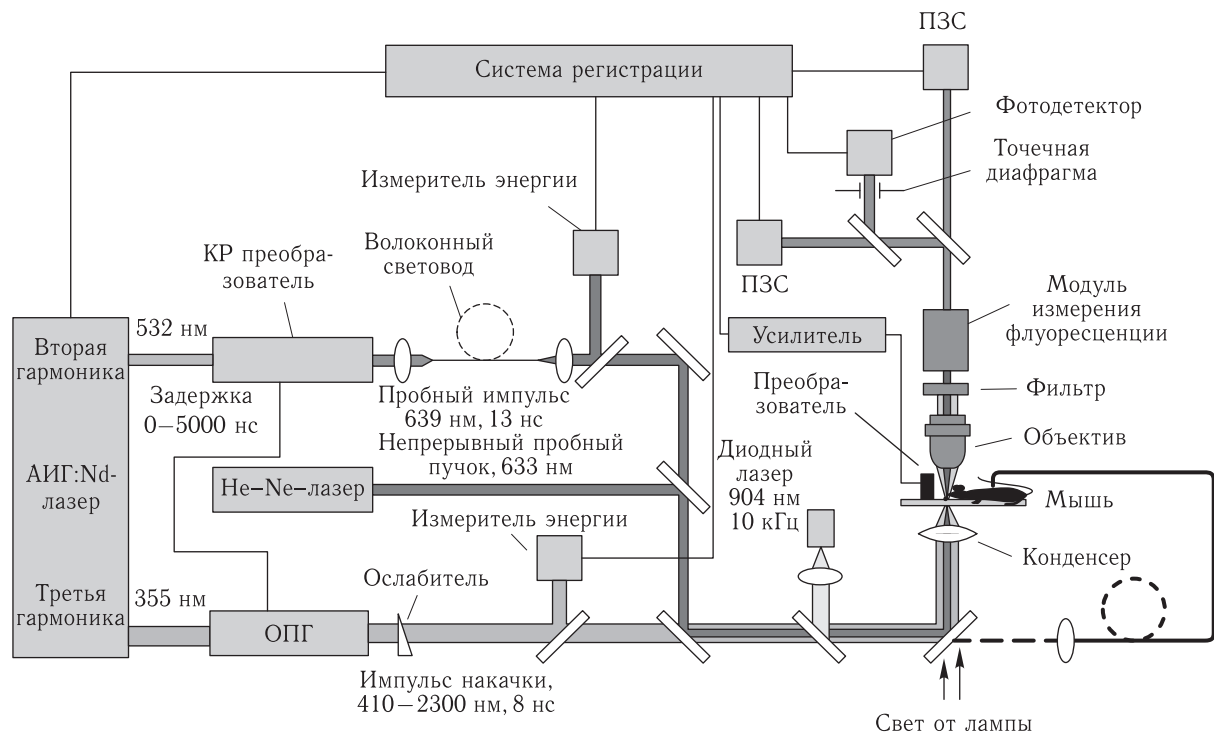


Рис. 7.29. Проточный многофункциональный цитометр *in vivo* на основе фототермической (ФТ), фотоакустической (ФА), флуоресцентной и трансмиссионной микроскопии [372, 379]

С помощью ФАМ темного поля удается существенно снизить влияние рассеяния света и реализовать измерения *in vivo* [1340, 1348] (рис. 7.25, цветная вклейка), а с помощью конфокального ФАМ светлого поля с коаксиальными оптическим (возбуждающим) и акустическим (индуцируемым) пучками удается получить оптическое разрешение вплоть до 5 мкм (рис. 7.26) [1348].

Изученные оптотермический и оптоакустический отклики живой биоткани на лазерное импульсное воздействие являются фундаментальной основой для создания нового направления в медицинской томографии, сочетающего достоинства оптического и акустического зондирования ткани [330, 1285–1288, 1303, 1308, 1310–1315, 1321–1327, 1341, 1344–1348]. Принцип действия такого томографа показан на рис. 7.27, а. На рис. 7.27, б приведены результаты диагностики *in vivo* модельной карциномы ткани груди [1312]. Основная идея импульсной ОА-томографии заключается в том, что возбуждаемый за счет сравнительно сильного поглощения короткого лазерного импульса на макронеоднородности ткани (например, опухоли) акустический импульс распространяется с определенной скоростью в направлении быстродействующего акустического детектора и регистрируется им. По скорости

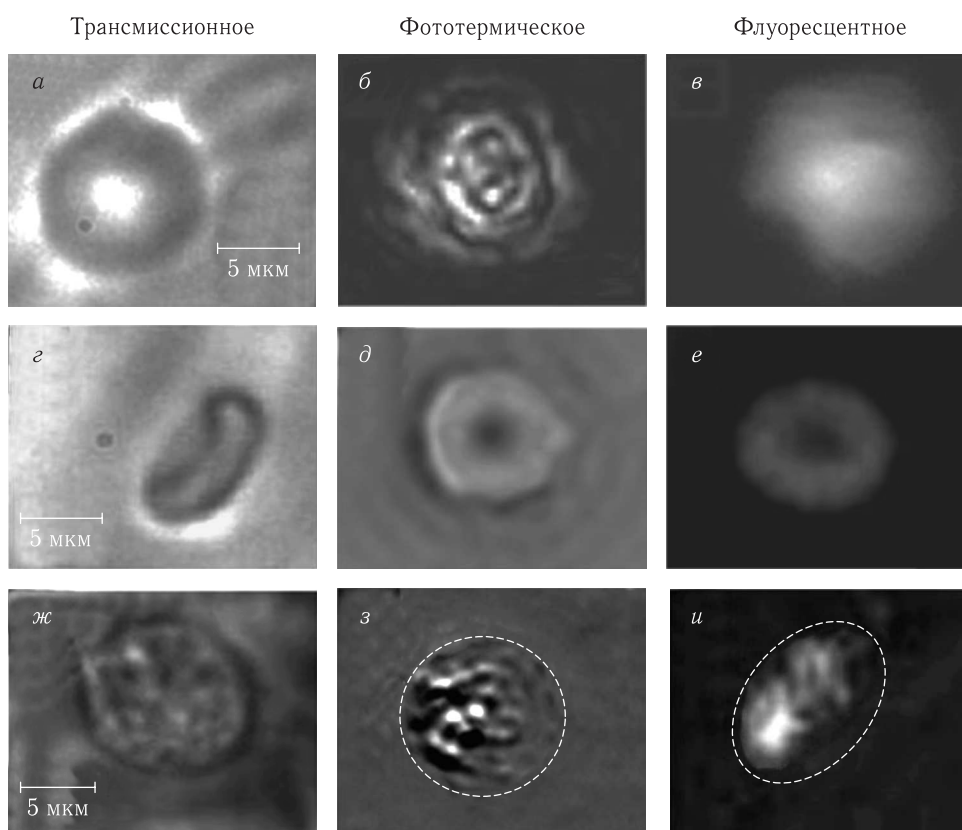


Рис. 7.30. Цитометрические изображения клеток: трансмиссионное (а, г, ж), фототермическое (б, д, з), и флуоресцентное (в, е, и); белые клетки крови (верхний ряд), эритроциты (средний ряд), раковые клетки К562 (нижний ряд) в потоке лимфы при исследовании на брызжейке крысы *in vivo* [367]

распространения акустического импульса и времени задержки его компонентов судят о характере, размерах и глубине залегания макронеоднородности.

Таким образом, регистрируя изменение во времени акустического сигнала, возбуждаемого короткими лазерными импульсами, можно визуализировать локальные патологические изменения структуры биотканей на глубине до 2–3 мм с пространственным разрешением порядка 20 мкм в направлении зондирования. При использовании акустического датчика, соприкасающегося с облучаемой лазерным излучением поверхностью ткани, можно диагностировать рак кожи (меланому) и различные нарушения структуры кожи («портвейновые пятна» и пр.). Комбинация акустического датчика в миниатюрном исполнении с эндоскопом позволит исследовать новообразования тканей внутренних органов.

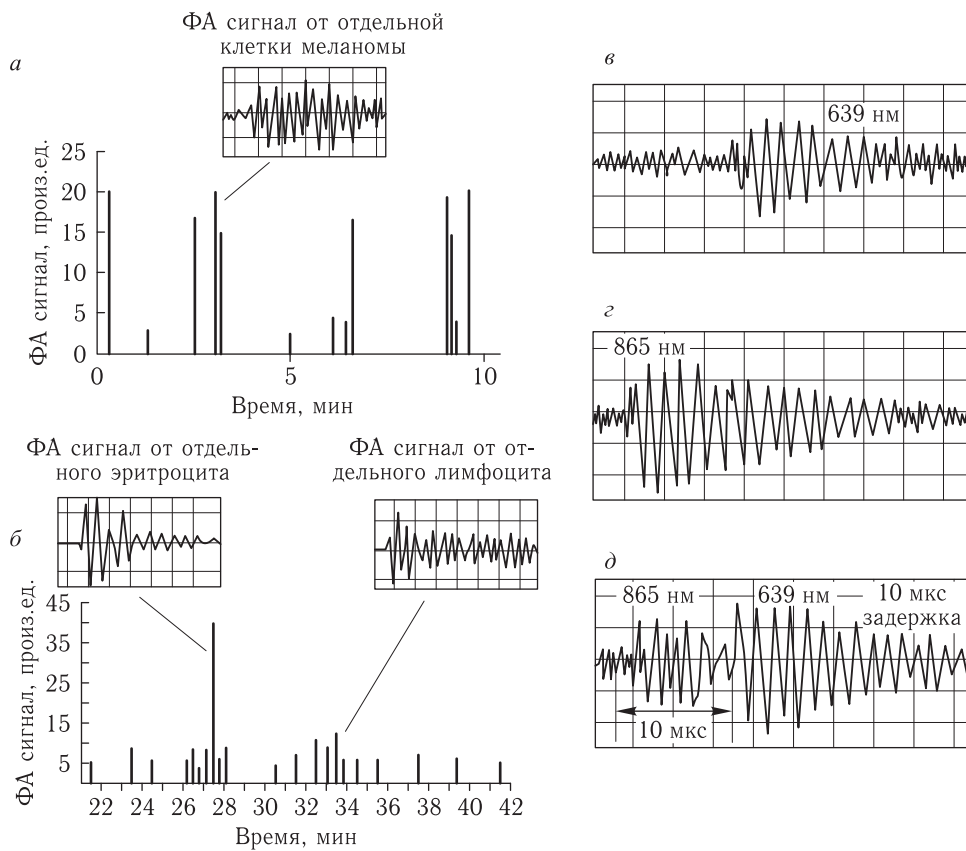


Рис. 7.31. Фотоакустические (ФА) сигналы, действительные (сверху) и сжатые (представленные в виде только положительной части) (снизу) от: клеток меланомы в лимфатическом сосуде уха мыши с привитой опухолью на второй неделе после прививки (а); единичных эритроцитов в потоке лимфоцитов (умножено $\times 5$) (б); редких некротических лимфоцитов, помеченных золотыми нанопалочками, поглощающими на длине волны 639 нм (в); апоптотических лимфоцитов, помеченных золотыми наноболочками, поглощающими на длине волны 865 нм (г) и живых нейтрофилов, помеченных карбоновыми нанотрубками, поглощающими на обеих длинах волн (д). Параметры лазера (длина волны, плотность энергии): 850 нм, 30 мДж \cdot см $^{-2}$ (а); 550 нм, 100 мДж \cdot см $^{-2}$ (б); 639 нм и 865 нм, 25 мДж \cdot см $^{-2}$ и 30 мДж \cdot см $^{-2}$, соответственно (в–д) [380]

Помимо впечатляющих результатов в области ФАМ и фотоакустической томографии (ФОТ) живых объектов, которые в принципе позволяют получить оптическое разрешение на уровне нескольких микрометров на глубинах зондирования в несколько сантиметров [1348], успешно развивается фотоакустическая (ФА) и фототермическая (ФТ) цитометрия, которые позволяют обеспечить дифференциацию нормальных и патологических клеток при их движении непосредственно в сосудах с разрешением, которое превышает дифракционный предел [159, 1356]. На рис. 7.28 схематически представлены принципы волоконно-оптической ФА-проточной цитометрии *in vivo* и ФА-лимфографии, которые сопровождаются селективной ФА-лазерной терапией [380]. После обнаружения раковой клетки ФА-методом, энергетические параметры лазера быстро изменяют и уже следующий более мощный и короткий импульс убивает клетку, пока она не успела выйти из поля лазерного пучка. В принципе, уничтожение клетки можно произвести и другим специальным лазером, настроенном на эту процедуру. При определенной длительности импульса разрушение клетки происходит как за счет действия света, так и акустических ударных волн, рождаемых этим импульсом. На этом же рисунке показан типичный вид цифровых сигналов от клеток меланомы, циркулирующих в лимфатической системе уха мыши, возбуждаемых диодным лазером ($\lambda = 905$ нм, $\tau_{\text{и}} = 15$ нс, 90 мДж/см²) с высокой частотой повторения импульсов (9 кГц).

На рис. 7.29 показан многофункциональный проточный цитометр *in vivo* на основе ФТ, ФА, флуоресцентной и трансмиссионной микроскопии [372, 379]. Примеры соответствующих сигналов и изображений клеток в процессе их движения по сосудам представлены на рис. 7.30 и 7.31. Для повышения контраста изображения клеток хорошо подходит их маркирование нетоксичными или малотоксичными наночастицами, которые благодаря значительному поглощению их материала дают сильные ФТ- и ФА-сигналы [159, 372, 379, 380, 1349–1356]. Эти же частицы могут быть использованы и для селективного уничтожения раковых клеток непосредственно в сосудах или тканях, например в «сторожевых лимфоузлах» и других тканях [159, 283–286, 372, 379, 380, 1351, 1352, 1356, 1357].

Глава 8

ЛАЗЕРНЫЙ МИКРОСПЕКТРАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ В БИМЕДИЦИНСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

8.1. Введение

В этой главе рассмотрим особенности микроспектрального анализа. Наряду с фотометрическим методом существуют другие широко используемые в медицине неинвазивные оптические диагностические технологии, такие как конфокальная микроскопия, лазерная цитометрия, флуоресцентный микроанализ, КР-микропроба и их комбинации. Они объединяются по признаку взятия «пробы» (оптической биопсии), которая берется из очень малого объема биоткани, вплоть до отдельных частей клетки. Объем пробы определяется используемыми освещающей и приемной оптическими системами; как правило, наименьший объем на уровне λ^3 (λ — длина волны в веществе) достигается при использовании микроскопов, включая конфокальные микроскопы, а наибольший — при использовании многомодовых световодов и пучков световодов (от одного до нескольких миллиметров).

Данные методы диагностики являются неразрушающими, в этом их главное достоинство, однако из-за сложности объекта зачастую удается получить лишь качественную информацию о составе вещества, наличии примесей и пр., в связи с чем развиваются методы лазерной аналитической спектроскопии, основанные на эффектах лазерной фотоионизации предварительно подготовленных проб биообъектов путем локального испарения или распыления сфокусированным лазерным пучком. Эти методы обладают высокой чувствительностью и позволяют получить количественную информацию о содержании различных, например токсических, примесей в биообъектах. Из-за малого объема лазерной микропробы и возможности проведения диагностики *in vivo* или *in situ* некоторые из таких методов могут быть отнесены к неразрушающим, поскольку в целом биообъект сохраняется живым и имеют место лишь его микроповреждения.

8.2. Микроскопия и микроспектрофотометрия

В основе спектроскопии упругого рассеяния биотканей и клеток лежат два явления — это рассеяние света, вызванное неоднородностью показателя преломления среды, и поглощение света, обусловленное присутствием различных метаболических хромофоров (см. главы 1 и 2). Локальные измерения характеристик рассеяния (отражения) и поглощения на одной или нескольких длинах волн являются основой лазерной микроскопии и цитометрии, а локальные измерения спектров обратного рассеяния (полного или диффузного отражения) лежат в основе микроспектрофотометрии [1, 12, 13, 15, 19, 20, 22, 31, 41, 80, 159, 358–361, 439–446, 567, 568, 785–792, 902, 970, 971, 1269–1272, 1358–1369].

Микроспектрофотометрия биотканей представляется одной из наиболее простых и доступных оптических технологий для *in vivo* и *in situ* диагностики широкого спектра патологий. Две схемы микроспектрофотометров отражения и измеренные спектры нормальной и патологической ткани показаны на рис. 6.4 и 6.6. Расстояние

между центрами облучающего и принимающего световодов не должно быть большим, типично меньше 1 мм, в противном случае в измеряемых спектрах теряется информация о морфологических особенностях ткани. Важным также является исключение отражения поверхности ткани, что реализуется за счет оптического контакта торца световода с объектом непосредственно или через иммерсионную жидкость. При выполнении этих условий измеряемые спектры несут информацию как о линиях поглощения, лежащих в диапазоне длин волн 350–1000 нм, так и о рассеивающих свойствах ткани. Вклады рассеяния и поглощения могут быть разделены, если обеспечены измерения для различных расстояний между световодами (см. главы 2 и 6), однако для многих практических методик диагностики нет необходимости в таком разделении и измерения проводятся для фиксированного небольшого расстояния между световодами, поскольку смешанный спектр отражения хорошо коррелирует с различиями в типах ткани и их состоянием.

Возможности метода для *in vivo* диагностики успешно продемонстрированы для тканей мочевого пузыря с чувствительностью до 100 % и хорошей специфичностью, до 97 %, а также для диагностики рака толстой и прямой кишки [1360]. В последнем случае 60 оптических проб было взято у 16 пациентов. Для восьми проб с участков, которые в последующем были определены гистологически как дисплазия, аденома или аденокарцинома, спектральные области, соответствующие линиям поглощения гемоглобина 400–440 и 540–580 нм, оказались показательными для эффективного дифференцирования злокачественных и доброкачественных изменений слизистой (чувствительность 100 %, специфичность 98 %). Для дифференцирования колита и нормальной ткани оптимальным был спектральный диапазон 435–440 нм.

В ряде случаев используют волоконные датчики, которые оказывают регулируемое давление на ткань. В этом случае спектры отражения существенным образом трансформируются (см. рис. 6.5) и несут дополнительную информацию, необходимую для разделения вкладов рассеяния и поглощения в измеряемый спектр [250, 1269, 1365, 1368].

К существенным достоинствам спектрофотометрического метода следует также отнести значительное быстроедействие (время измерения, записи и получения изображения спектра менее 1 с) и возможность работы с нелазерными источниками белого света (соответственно малая стоимость и простота устройства).

Авторы [1359] разработали ряд экспериментальных установок для *in vitro* и *in vivo* измерений локальных оптических характеристик кожи человека. Одна из них, содержащая микроскоп с источником белого света, используется для локальных измерений спектра пропускания образцов биоткани (срезов кожи толщиной 10 мкм). Сопряжение прошедшего образец пучка света со спектральным прибором с помощью многомодового световода с диаметром сердцевины 1 мм для проекционной линзы микроскопа с увеличением 2,5 и объектива, собирающего свет от объекта в световод, с увеличением 10 позволило обеспечить измерительное пятно, равное 40 мкм ($1000 \text{ мкм} / (2,5 \cdot 10)$). Локальные спектры пропускания регистрировались с помощью спектрографа, сопряженного с оптическим многоканальным анализатором (ОМА). Далее эти спектры сравнивались со спектрами флуоресценции, возбуждаемыми излучением He–Cd-лазера в тех же областях объекта.

Другая установка со специальным волоконным пробником использовалась для исследований спектров диффузного отражения и флуоресценции кожи *in vivo*, ее особенностью было то, что размер освещающего пятна на объекте был значительно меньше области, с которой регистрируются рассеянный сигнал и сигнал флуоресценции, что дает возможность избежать сильного влияния зеркального отражения и существенно увеличивает слабый сигнал флуоресценции. Близкая по своим параметрам система *in vivo* регистрации спектров отражения и флуоресценции кожи

описана в работах [567, 568, 970]. Ее отличительной особенностью является сбор излучения с помощью системы из шести световодов, расположенных под разными углами к поверхности (примеры полученных спектров представлены на рис. 6.5).

Еще одна микроспектральная система была разработана для *in vivo* медицинских исследований, ее основу составляет волоконно-оптический катетер Y-типа [1269, 1361]. Свет от источника (лазера или лампы) поступает на объект по моноволоконному световоду, а отраженный свет или свет флуоресценции собирается шестью световодами, расположенными вплотную вокруг световода — источника, и далее направляется на щель компактного спектрографа с линейкой фотодетекторов (1024 элемента). Система совместима со стандартными эндоскопами, имеет регулируемое расстояние от дистального конца световода до объекта в пределах 0–100 мм, обеспечивает время регистрации спектра порядка 0,3 с, что вполне достаточно для измерений в реальном масштабе времени. Она использовалась для определения степени насыщения гемоглобина крови кислородом и относительного содержания гемоглобина в слизистой оболочке желудка у пациента через полгода после резекции части желудка по поводу рака и во многих других приложениях (см. рис. 6.6) [1269].

Простой, компактный и быстродействующий микроспектрофотометр для исследования спектров отражения, пропускания и флуоресценции рассеивающих биологических объектов описан в работе [1364]. Благодаря быстрому сканированию спектра за счет колебательных движений зеркала, значительной светосиле и возможности исследовать сильно рассеивающие среды он может составить в некоторых случаях альтернативу спектрометрам с многоканальными анализаторами (ОМА). Например, скорость записи спектра отражения слизистой оболочки ротовой полости человека в диапазоне 400–891 нм составляет всего 25 мс. Спектрометр имеет волоконно-оптическую систему для проведения локальных измерений отражения и пропускания.

Отражательная микроспектрофотометрия с использованием моноволоконных световодов оказывается полезной для *in vivo* исследований распределения фотосенсибилизаторов в биоткани и сдвигов их линий поглощения в живой ткани по сравнению со спектрами в растворах [1269]. При этом режим с разрешением во времени оказывается предпочтительным при определении сдвигов линий поглощения, поскольку позволяет более надежно отделить вклад поглощения от вклада рассеяния в спектр отражения (см. главу 2). В работе [1362] использовался импульсный лазер на красителях с накачкой от аргонового лазера с синхронизацией мод (диапазон длин волн — 650–695 нм, длительность импульса меньше 10 пс), средняя мощность излучения на дистальном конце световода меньше 10 мВт, диаметр сердцевины облучающего и приемного световодов 1 мм, расстояние между центрами световодов 8 мм. Торцы обоих световодов непосредственно контактируют с кожей экспериментального животного. Для фотосенсибилизатора Al-фталоцианина был надежно зарегистрирован красный сдвиг линии поглощения порядка 10–15 нм в злокачественных опухолевых тканях. Сдвиг обусловлен взаимодействием препарата с внеклеточным биологическим субстратом, величина сдвига зависит от концентрации красителя. Такой сдвиг линии поглощения необходимо учитывать при проведении фотодинамической терапии.

Как было показано в главе 2, для надежного определения коэффициента поглощения (μ_a) и приведенного коэффициента рассеяния (μ'_s) можно измерять частотные зависимости амплитуды и фазы волн фотонной плотности при заданном расстоянии между источником и приемником оптического излучения. На этой основе для *in vivo* измерений был разработан портативный, многоволновый и многоканальный модуляционный микроспектрометр со сканированием частоты модуляции от 0,3 до 1000 МГц (рис. 8.1) [1366, 1367]. Быстрая перестройка частоты модуляции четырех полупроводниковых лазеров разных длин волн осуществляется анализатором сети

(измерителем амплитудно-частотных характеристик), он же регистрирует амплитуду модуляции и соответствующий сдвиг фазы фототока лавинного фотодиода, принимающего обратно рассеянное излучение лазеров от объекта. Длины волн лазеров выбраны в полосе максимального пропускания биотканей так, чтобы эффективно определять такие физиологические параметры, как полную концентрацию гемоглобина, концентрации оксигенированной и дезоксигенированной его форм, степень насыщения гемоглобина кислородом, относительный объем крови и содержание воды в ткани. Длины волн лазеров равны 674, 811, 849 и 956 нм. Четыре градиентных ВС с диаметром сердцевины 100 мкм были использованы для связи лазеров с 8×8 мультиплексором. Небольшая часть излучения (около 5%) поступала по опорному ВС на рpн-фотодиод и далее на канал *B* анализатора сети. Это обеспечивало возможность измерения фазы модуляции и компенсацию флуктуаций источника излучения. Свет всех длин волн поступал на объект по многим каналам (до восьми), соответствующим различным положениям объекта, а диффузно отраженный свет от объекта через измерительный световод — на лавинный фотодиод и далее на канал *A* анализатора сети. Все световоды находились в непосредственном контакте с биологической тканью. Мощность излучения, которая попадала на ткань, составляла 10–30 мВт, что примерно в 10 раз меньше порога теплового повреждения ткани для диаметров сердцевины используемых световодов и выбранных длин волн излучения. Время измерений на одной длине волны при исследовании людей — 0,5 с для одного свипирования от 0,3 до 1000 МГц. Однако при двух свипированиях на каждой из четырех длин волн и с учетом времени переключения источников, преобразования данных и отображения информации полное время измерений было равно примерно 40 с. Основные компоненты спектрометра управляются компьютером. При исследовании пациентов расстояние между облучающим и приемным ВС было фиксированным и равным 17, 22 или 27 мм.

Результаты экспериментальных исследований трех пациентов с помощью описанного модуляционного микроспектрального комплекса представлены в табл. 8.1. Эти данные дополняют сведения из табл. 3.1 для измеренных *in vivo* значений оптических параметров здоровых и патологических тканей. Кроме того, в табл. 8.1 приведенные рассчитанные на основе экспериментальных данных значения физиологических параметров исследуемых тканей: абсолютные значения концентрации дезоксигемоглобина, оксигемоглобина, полного гемоглобина и воды; с использованием этих данных может быть также рассчитана и степень насыщения гемоглобина кислородом. На основании определенных из эксперимента значений коэффициента поглощения ткани $\mu_a(\lambda_i)$ для трех длин волн (674, 811 и 956 нм) и известных литературных данных для коэффициентов экстинкции ε_i (моль \cdot см⁻³) рассчитывались абсолютные концентрации искомых компонентов ткани c_i с помощью следующей системы из трех уравнений [1, 551, 1366, 1367]:

$$\varepsilon_{\text{Hb}}(\lambda_i)c_{\text{Hb}} + \varepsilon_{\text{HbO}_2}(\lambda_i)c_{\text{HbO}_2} + \varepsilon_{\text{H}_2\text{O}}(\lambda_i)c_{\text{H}_2\text{O}} = \mu_a(\lambda_i), \quad (8.1)$$

решение которой после подстановки численных данных для ε_i может быть представлено в матричной форме:

$$\begin{bmatrix} 6578300 & 740100 & 0,0748 \\ 1833100 & 2153900 & 0,427 \\ 1500600 & 3048600 & 7,24 \end{bmatrix} \times \begin{bmatrix} c_{\text{Hb}} \\ c_{\text{HbO}_2} \\ c_{\text{H}_2\text{O}} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mu_a(674) \\ \mu_a(811) \\ \mu_a(956) \end{bmatrix}. \quad (8.2)$$

Каждая колонка этой матрицы содержит значения коэффициентов экстинкции для одного из рассматриваемых хромофоров на трех выбранных длинах волн. Значения

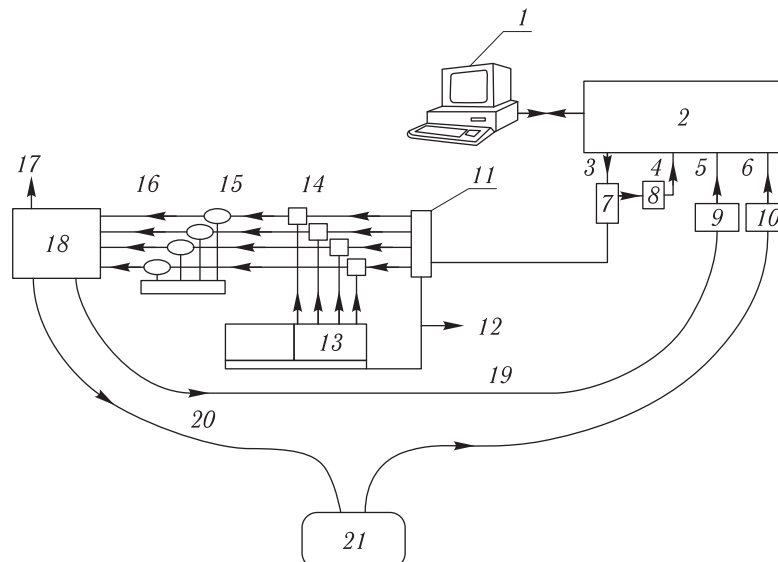


Рис. 8.1. Многоволновый, многочастотный и многоканальный модуляционный микроспектрометр [1367]: 1 — компьютер; 2 — анализатор сети; 3 — выход; 4 — опорный канал; 5 — канал B; 6 — канал A; 7 — делитель; 8 — аттенуатор; 9 — рип-фотодиод; 10 — лавинный фотодиод; 11 — модулятор тока инъекции лазеров; 12 — связь с компьютером; 13 — драйвер постоянного тока и контроля температуры; 14 — цепь питания лазеров; 15 — полупроводниковые лазеры; 16 — волоконные световоды; 17 — связь с компьютером; 18 — оптический мультиплексор; 19 — опорный ВС; 20 — измерительный ВС; 21 — объект

коэффициентов поглощения на этих длинах волн определяются на основе эксперимента.

Современные методы микроскопии развиваются в направлении обеспечения возможности исследования структуры отдельных клеток *in vivo* и *in situ* без фиксации с одновременной регистрацией внутриклеточных динамических процессов, вызванных жизнедеятельностью клетки. Примерами таких микроскопов являются лазерные доплеровские микроскопы [5, 383, 1370] и быстродействующие фазовые и голографические микроскопы с ультравысоким пространственным разрешением [708–718, 884, 1370, 1371]. Другая тенденция развития микроскопии — это *in vivo* послойный анализ биотканей с высоким пространственным разрешением. Важным примером такого направления является конфокальная микроскопия [1, 12, 13, 15, 19, 20, 22, 31, 41, 439–446, 707, 785–792]. Основные идеи и методы когерентной микроскопии изложены в главе 2. Здесь мы остановимся только на описании некоторых конкретных схем и приложений.

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия, использующая для селекции пришедших от заданного объема рассеянных фотонов конфокальный принцип (две оптически сопряженные диафрагмы или щели малых размеров в плоскости предметов и изображений), является хорошо разработанным средством визуализации в медицинских исследованиях. Получены трехмерные изображения живой ткани, в частности кожи, с разрешением, позволяющим распознавать различные типы клеток, а также одновременно наблюдать движущиеся клетки крови в микрососудах [442]. С помощью конфокальной микроскопии реального времени успешно визуализируют ткани кожи и зуба *in vivo*, что уже начинает применяться в медицинской практи-

Таблица 8.1. Результаты *in vivo* измерений оптических физиологических параметров здоровых и патологических тканей, расстояние между центрами излучающего и принимающего световодов равно 22 мм [1377, 1378]

| Биоткань | λ , нм | μ_a , см^{-1} | μ'_s , см^{-1} | C_{Hb} , мкМ | C_{HbO_3} , мкМ | $C_{\text{Hb}+\text{HbO}_2}$, мкМ | $C_{\text{H}_2\text{O}}$, М | |
|--|--------------------------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------|--------------------------|------------------------------------|------------------------------|------|
| Женская грудь (56 лет): здоровая ткань | 674 | 0,04 | 8,5 | 4,96 | 10,6 | 15,56 | 6,39 | |
| | 811 | 0,035 | 7,4 | | | | | |
| | 849 | 0,035 | 7,0 | | | | | |
| | 956 | 0,085 | 6,5 | | | | | |
| | фиброаденома с гиперплазией протоков | 674 | 0,055 | 9 | 5,65 | 22 | 27,65 | 6,02 |
| | | 811 | 0,06 | 8 | | | | |
| | | 849 | 0,055 | 7,6 | | | | |
| | | 956 | 0,12 | 7,5 | | | | |
| Женская грудь (27 лет): здоровая ткань | 674 | 0,035 | 11,1 | 4,1 | 8,13 | 12,23 | 9,4 | |
| | 811 | 0,03 | 9,6 | | | | | |
| | 849 | 0,038 | 9,6 | | | | | |
| | 956 | 0,09 | 9,7 | | | | | |
| | киста, заполненная жидкостью | 674 | 0,07 | 7,9 | 8,1 | 23,6 | 31,7 | 11,3 |
| | | 811 | 0,07 | 7,0 | | | | |
| | | 849 | 0,08 | 7,0 | | | | |
| | | 956 | 0,16 | 7,0 | | | | |
| Подкожная аденокарцинома (муж. 62 г.): область живота | здоровая ткань | | | | | | | |
| | 674 | 0,0589 (0,0036) | 8,94 (0,19) | 6,22 (0,64) | 23,9 (1,9) | 30,1 (2,0) | 4,09 (2,23) | |
| | 811 | 0,0645 (0,0032) | 8,82 (0,18) | | | | | |
| | 849 | 0,0690 (0,0025) | 8,77 (0,14) | | | | | |
| | 956 | 0,1110 (0,015) | 7,00 (0,62) | | | | | |
| | опухолевая ткань | | | | | | | |
| | 674 | 0,169 (0,02) | 8,48 (0,73) | 17,4 (3,6) | 73,4 (8,3) | 09,8 (9,0) | — | |
| | 811 | 0,190 (0,015) | 8,30 (0,49) | | | | | |
| | 849 | 0,276 (0,03) | 9,93 (0,87) | | | | | |
| | 956 | — | — | | | | | |
| | область спины | | | | | | | |
| | здоровая ткань | | | | | | | |
| | 674 | 0,0883 (0,006) | 10,7 (0,4) | 9,68 (1,04) | 33,2 (2,7) | 42,9 (2,9) | — | |
| | 811 | 0,0892 (0,005) | 9,99 (0,27) | | | | | |
| | 849 | 0,0915 (0,0030) | 9,65 (0,15) | | | | | |
| | 956 | 0,127 (0,03) | 6,3 (0,9) | | | | | |
| опухолевая ткань | | | | | | | | |
| 674 | 0,174 (0,02) | 10,4 (0,9) | 19,1 (3,7) | 66,0 (7,4) | 85,1 (8,2) | — | | |
| 811 | 0,177 (0,013) | 9,23 (0,5) | | | | | | |
| 849 | 0,190 (0,01) | 9,20 (0,33) | | | | | | |
| 956 | 0,186 (0,16) | 4,7 (2,7) | | | | | | |

ке [445]. Трехмерное изображение клеток в различных слоях эпителия роговицы позволило установить характер их митоза [443]. При исследовании структуры дентина зуба получено разрешение на уровне сканирующей электронной микроскопии с дополнительной подповерхностной визуализацией ткани с разрешением в 1 мкм на глубину 30–50 мкм [444].

Типичная схема конфокального микроскопа со сканированием вдоль оси z (вдоль светового луча) представлена на рис. 8.2 [1, 443]. Микроскоп предназначен для

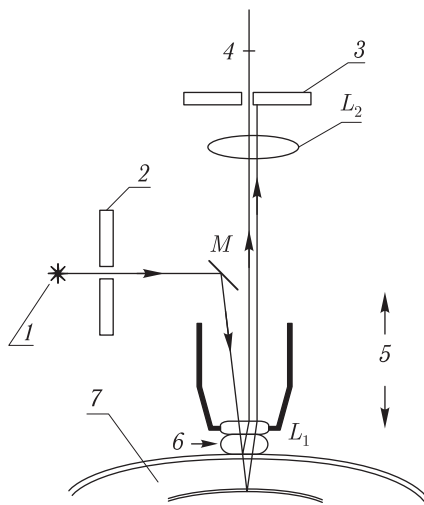


Рис. 8.2. Схема конфокального микроскопа со сканированием вдоль оси светового пучка [1, 443]: 1 — источник света (лазер или лампа) с волоконным световодом; 2, 3 — оптически сопряженные щели; 4 — к ФЭУ; 5 — сканируемый объектив; 6 — иммерсионная жидкость; 7 — роговица; L_1 , L_2 — линзы; M — зеркало

последующего анализа структуры глаза. Излучение подводится к микроскопу с помощью волоконного световода. Микроскоп содержит две оптически сопряженные щели. Изображение одной из щелей проецируется на объект, вторая щель расположена перед фотоприемником. Сканирование положения объектива вдоль оси светового пучка осуществляется с помощью пьезопривода, управляемого от компьютера. Иммерсионная жидкость служит для оптического согласования объектива и исследуемого глаза.

Другой тип щелевого сканирующего конфокального микроскопа, позволяющего получать изображения объекта на разных глубинах, показан на рис. 8.3 [441]. Микроскоп работает в реальном времени и служит для исследований тканей глаза *in vivo*. Главным элементом микроскопа является двустороннее зеркало, которое осуществляет поперечное сканирование без смещения оси отраженного пучка (такая схема впервые была предложена Г. М. Свищевым в 1969 году для исследования прозрачных рассеивающих объектов — живой нервной ткани). Для исключения влияния движения глаз пациента на качество изображений использовалась электронная схема, обеспечивающая необходимую частоту сканирования и фазовую син-

хронизацию всех элементов системы. В качестве примера на рис. 8.4 приведено изображение клеток эндотелия роговицы глаза человека [441]. Высококачественные послойные изображения клеточных структур тканей глаза в норме и патологических состояниях можно найти в работах [439–441, 443].

В зависимости от используемого источника света, приемной системы и типа исследуемой ткани для получения удовлетворительного отношения сигнала к шуму необходимо усреднение по нескольким экспозициям (фреймам). Например, для слабо отражающих тканей глаза (как правило, меньше 1%) обычно требуется от четырех до восьми фреймов, однако при использовании в качестве детектора высокочувствительной видеокамеры с широкополосным видеоманитофоном нет необходимости в усреднении по фреймам, т. е. обеспечиваются измерения *in vivo* в реальном масштабе времени. Несмотря на то что конфокальные микроскопы могут работать с ртутными, ксенонowymi дугowymi или галогеновыми лампами, монохроматическое излучение от лазеров дает более четкие изображения благодаря устранению хроматической аберрации оптической системы. Однако выбор типа лазера должен включать

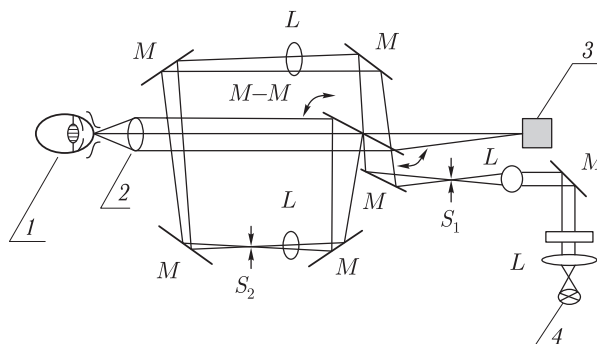


Рис. 8.3. Щелевой сканирующий конфокальный микроскоп, работающий в реальном масштабе времени [441]: 1 — глаз *in vivo*; 2 — перестраиваемый объектив; 3 — видеокамера; 4 — источник света; M — поворотные зеркала; L — линзы; S₁ и S₂ — сопряженные щели; M–M — сканирующее двустороннее зеркало

учет глубины проникновения излучения в ткань и пропускания оптической системы микроскопа.

Сравнительные исследования конфокального и гомодинного (подобного рассмотренному выше фазовому микроскопу) сканирующих микроскопов в приложении к изучению рассеивающих объектов показали, что во многих случаях ограничения конфокальной техники связаны не столько с деградацией изображения за счет рассеянного света, сколько с малым уровнем сигнала [446]. Действительно, для получения удовлетворительного разрешения по глубине (селекции фотонов, отраженных от определенного слоя, и устранения влияния рассеянного света) конфокальная система должна иметь сопряженные диафрагмы радиусом (в оптических единицах) $\nu_p \leq 2$, $\nu_p = \pi d_p a / \lambda f$, где d_p — диаметр отверстия, a и f — радиус и фокальная длина линзы, фокусирующей свет на диафрагму, которые пропускают не так много света. Например, при $\nu_p = 2$ диафрагма пропускает лишь 40% падающего в пределах ее апертуры света. В то же время интерференционная (гомодинная) схема при использовании узкополосного источника света позволяет значительно снизить это ограничение за счет оптического усиления и, в конечном итоге, получать изображения объекта при том же отношении сигнала к шуму, как и для конфокальной микроскопии, за более короткое время. Дополнительные преимущества интерференционной схемы, связанные с когерентностью света и использованием амплитудного отклика исследуемого объекта, заключаются в появлении нового механизма подавления рассеянного света и возможности регистрировать меньшие различия в отражательной способности различных слоев ткани. Ожидается, что совмещение двух рассмотренных принципов в одном микроскопе, а также использование широкополосных (низкокогерентных) источников света (см. главу 2) даст существенное увеличение селективности, необходимое для исследования рассеивающих тканей [446].

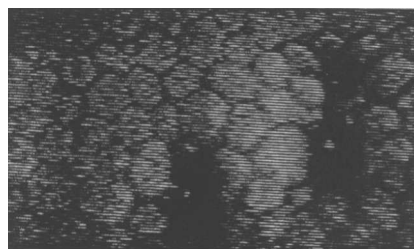


Рис. 8.4. Оптический «срез» роговицы человека *in vivo* (изображение показывает клетки эндотелия на задней поверхности роговицы, оптический «срез» сделан на 500 мкм вглубь от поверхности роговицы, темные участки изображения соответствуют патологии эндотелия) [441]

Лазерная и оптическая цитометрия является одним из важнейших направлений медицинской диагностики. Первые коммерческие оптические проточные цитометры появились около 1970 года и были использованы для исследования раковых заболеваний и дифференцирования лейкоцитов [159, 357, 712, 1372, 1373]. Современные оптические проточные цитометры оборудованы аргоновым лазером небольшой мощности (порядка 15 мВт) или дуговой лампой, иногда добавляется еще один или несколько лазеров (He-Ne-, He-Cd-, Kr-лазеры или лазер на красителях). Лазерный пучок фокусируется в пятно малого диаметра внутри проточной кварцевой ячейки (рис. 8.5). Суспензия клеток и буферная жидкость поступают в ячейку под внешним давлением или за счет прокачки насосом. Суспензия клеток инжектируется через специальное сопло в центр потока буферной жидкости, ускоряется и центрируется за счет гидродинамической фокусировки [357]. Отдельные клетки, пролетая через узкий световой пучок (перпендикулярно ему), индуцируют сигнал светорассеяния (их может быть много: под разными углами, с разными апертурами приема, состояниями поляризации) или сигнал флуоресценции. Обычно интенсивное рассеяние вперед регистрируется с помощью фотодиодов, а малоинтенсивное рассеяние под углом 90° и флуоресценция регистрируются с помощью фотоэлектронных умножителей (ФЭУ).

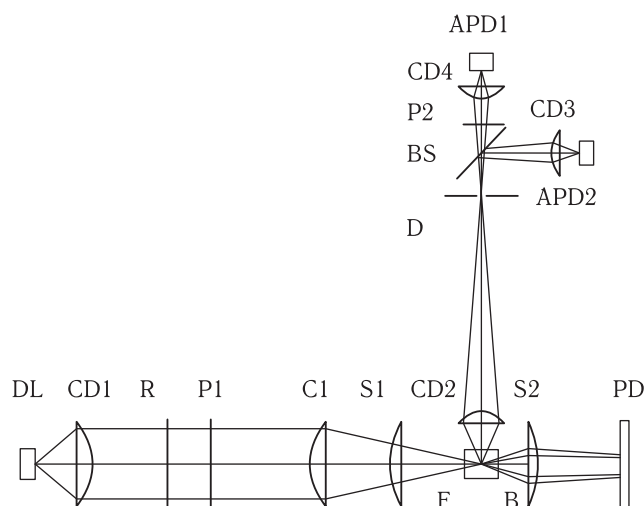


Рис. 8.5. Компактный проточный цитометр на основе полупроводникового лазера (780 нм) и лавинного фотодиода [1363]: DL — лазер; CD1–CD4 — линзы от CD-проигрывателя; R — полуволновая пластинка; P1, P2 — поляриды; C1, C2 — цилиндрические линзы; F — проточная ячейка; B — заслонка для прямого луча; S1, S2 — сферические линзы; PD — фотодиод; D — диафрагма; BS — делитель пучка; APD1, APD2 — лавинные фотодиоды

Для типичных промышленных проточных цитометров скорость анализа составляет порядка 10 000–100 000 клеток в секунду, минимальный размер анализируемой частицы 0,5 мкм и ошибка измерений (отношение стандартного отклонения к среднему значению величины) по всем параметрам не превосходит 0,5–1,0%.

Огромное количество цитометрических методов было развито для иммунологии, исследования ДНК и клинических применений [159, 357, 712, 1372, 1373]. Дифференцирование клеток белой крови человека — один из наиболее часто применяемых методов цитометрии в клинических лабораториях.

В проточной цитометрии рассеяние света используется для контроля многих параметров клеток, таких как их размер, форма, размер ядра, шероховатость мембраны,

показатель преломления, жизнеспособность, присутствие небольших внутриклеточных частиц и пр. В основе методов такой диагностики лежат измерения на одной или нескольких длинах волн, измерения под разными углами рассеяния и углами зрения фотоприемников, для различных состояний поляризации падающего и рассеянного излучения [159, 357–361, 712, 1372, 1373]. Например, многие компоненты популяции лейкоцитов человека (лимфоциты, моноциты и гранулоциты) легко разделяются при совместных измерениях интенсивности рассеяния вперед (в пределах $0,5^\circ$ – $2,0^\circ$) и под углом вблизи $90^\circ \pm 30^\circ$ или деполяризованного излучения под углом 90° . В последнем случае возможна дискриминация эозинофилов и нейтрофильных гранулоцитов.

Оптическая схема наиболее компактного и недорогого пролетного цитометра, разработанного на основе полупроводникового лазера (GaALAs, двойная гетероструктура, 780 нм, 20 мВт, одна продольная мода) и двух лавинных фотодиодов для приема рассеянного под углом 90° излучения, представлена на рис. 8.5 [1363]. В цитометре обеспечены поляризационные измерения. Использование линз от проигрывателей компактных дисков для коррекции сильно астигматического лазерного пучка полупроводникового лазера не устраняло полностью астигматизм, однако это существенно не влияло на работу устройства. На рис. 8.6 представлены два типа распределений отклика цитометра на пролетающие белые клетки крови человека. Распределения демонстрируют высокую эффективность дифференцирования клеток крови.

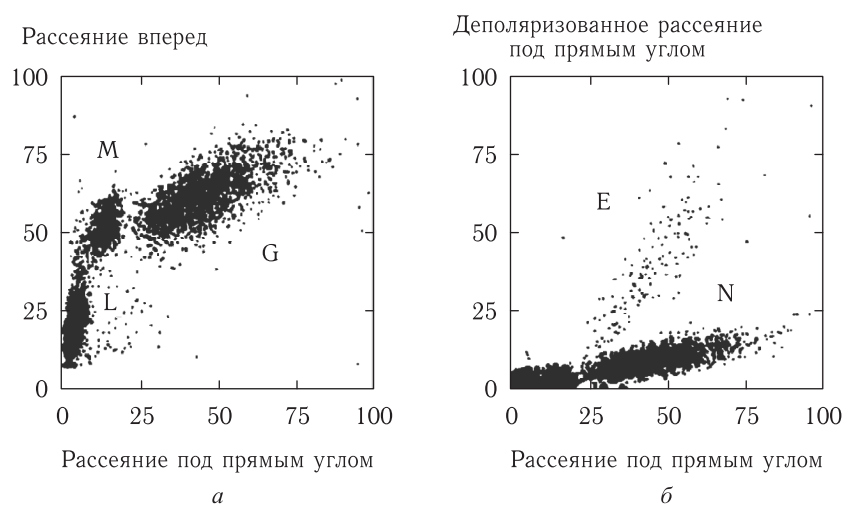


Рис. 8.6. Распределения рассеянного света при исследованиях клеток белой крови человека в координатах «рассеяние вперед — рассеяние под углом 90° » (а) и «деполяризованное рассеяние под углом 90° — рассеяние под углом 90° » (б) (L — лимфоциты, M — моноциты, G — гранулоциты, N — нейтрофилы, E — эозинофилы) [1363]. Каждая точка распределения соответствует рассеянию на отдельной частице, пролетающей через цитометр

8.3. Флуоресцентный микроанализ

Значительная чувствительность, универсальность и относительная простота реализации флуоресцентных методов привели к их широкому использованию в биологии и медицине в качестве аналитических и диагностических методов [4, 5, 8, 13, 17,

18, 34, 41, 55, 64, 205, 249–253, 257–259, 261, 293–295, 309, 310, 326, 567, 568, 970, 972, 982, 1223, 1246, 1269, 1272, 1358–1361, 1372–1413]. Именно высокая чувствительность (на три порядка выше, чем у абсорбционно-трансмиссионных методов) позволяет осуществлять лазерную микрофлуориметрию биообъектов с очень высоким пространственным разрешением (до долей микрометра) без существенных фотохимических преобразований вещества. Как правило, используется так называемая быстрая флуоресценция, связанная с переходами возбужденной лазерным излучением молекулы из синглетного состояния в основное (см. рис. 6.1; 6.2, д). В этом случае длинноволновый участок спектра флуоресценции является почти зеркальным отражением спектра поглощения.

Помимо малости объема микропробы, флуоресцентный метод характеризуется повышенным отношением сигнала к шуму за счет возможности возбуждения флуоресценции при слабом фоне, а также пропорциональностью сигнала флуоресценции концентрации исследуемого вещества при малой интенсивности флуоресценции.

Флуоресценция характеризуется рядом параметров, изменение каждого из которых несет определенную взаимно дополнительную информацию об объекте. Это такие параметры, как интенсивность флуоресценции, измеренная на определенной длине волны, $I_{\phi}(\lambda_0)$; спектр излучения — зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны излучения при фиксированной длине волны возбуждения, $\lambda_{\text{в}} = \text{const}$, $I_{\phi}(\lambda)$; спектр возбуждения — $I_{\phi}(\lambda_{\text{в}})$ при $\lambda = \text{const}$; квантовый выход флуоресценции F — число излучаемых за секунду квантов N_{ϕ} к числу поглощаемых за то же время $N_{\text{в}}$, $F = N_{\phi}/N_{\text{в}}$; время затухания флуоресценции τ_{ϕ} — время, за которое интенсивность флуоресценции уменьшается в e раз, $I_{\phi} = I_{\phi \text{ max}} \cdot e^{-t/\tau_{\phi}}$, $I_{\phi \text{ max}}$ — максимальная интенсивность флуоресценции во время возбуждения; степень поляризации излучения, $P_{\phi} = (I_{\parallel} - I_{\perp}) / (I_{\parallel} + I_{\perp})$, где I_{\parallel} и I_{\perp} — вертикальный и горизонтальный компоненты интенсивности флуоресценции, регистрируемой наблюдателем.

В настоящее время разработано и описано в литературе большое число лазерных микрофлуориметров, обладающих значительным пространственным, временным и спектральным разрешением, высокой чувствительностью и быстродействием, имеющих широкий диапазон длин волн возбуждения и регистрации флуоресценции различных биообъектов [4, 5, 8, 13, 17, 18, 34, 41, 55, 64, 205, 249–253, 257–259, 261, 293–295, 309, 310, 326, 567, 568, 970, 972, 982, 1223, 1246, 1269, 1272, 1358–1361, 1372–1419].

Лазерный микрофлуориметр собирается обычно на базе промышленных люминесцентных микроскопов, в качестве источника света такого микроскопа используются различные типы лазеров и лазерных систем, работающие в УФ- или видимой областях спектра (непрерывные и импульсные лазеры, в том числе и лазеры с модуляцией добротности и синхронизацией мод). С помощью импульсных лазеров изучают кинетику флуоресценции. Относительно простые микрофлуориметры работают с непрерывными или квазинепрерывными лазерами, чаще всего с Ar-, He–Cd- и N₂-лазерами. В более универсальных и сложных системах используются перестраиваемые лазеры на красителях с нелинейным преобразованием излучения в УФ-диапазон длин волн, а для выполнения кинетических измерений — импульсные лазеры с синхронной накачкой или еще более сложные системы со сверхкороткой длительностью импульсов (см. главу 4). Применяются также разнообразные микрофлуориметры, построенные на базе твердотельных лазеров (обычно АИГ:Nd, в последнее время стали использоваться и полупроводниковые лазеры) с преобразованием частоты в видимую или УФ-область. Требуемый лазер или лазерную систему для оптимального возбуждения флуоресценции того или иного биообъекта можно подобрать на основании данных главы 4. Необходимо только учесть диапазон

длин волн возбуждения, квантовый выход флуоресценции, ожидаемые скорости затухания флуоресценции, а также качество лазерного пучка (его однородность и расходимость), поскольку требуется высокая степень фокусировки (вплоть до долей микрометра).

Три схемы лазерных микроспектрофлуориметров представлены на рис. 8.7–8.9. Первая из них предназначена для повышения контраста при визуализации раковых опухолей путем регистрации флуоресценции накопленных в тканях эндогенных или экзогенных хромофоров (ПГП, фталоцианинов, ALA-индуцированного протопорфирина IX) на трех длинах волн: λ_1 , λ_2 и λ_3 [295]. Например, при использовании ПГП флуоресценция регистрируется на длинах волн 470, 600 и 630 нм. Главная идея схемы заключается в создании с помощью двух цилиндрических линз ленточного лазерного пучка на объекте и приеме излучения флуоресценции от освещаемой УФ-лазером полосы на объекте одновременно тремя группами элементов фотодиодной линейки (ОМА) через три интерференционных фильтра с длинами волн пропускания на λ_1 , λ_2 и λ_3 .

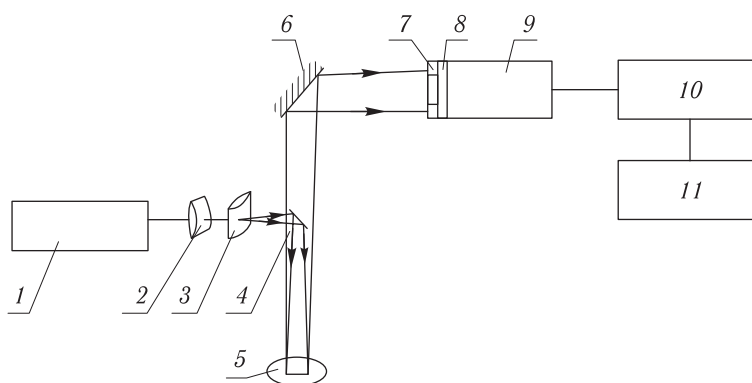


Рис. 8.7. Экспериментальная установка для пространственно-разрешенной флуоресцентной диагностики рака на трех длинах волн [295]: 1 — азотный лазер ($\lambda = 337$ нм); 2, 3 — цилиндрические линзы; 4 — дихроичное зеркало; 5 — объект; 6 — управляемое зеркало; 7 — три интерференционных фильтра на λ_1 , λ_2 и λ_3 ; 8 — линейка фотодиодов; 9 — ОМА; 10 — компьютер; 11 — графопостроитель

Типичный лазерный волоконно-оптический микроспектрофлуориметр (см. рис. 6.6 и 8.8), позволяет проводить исследования биотканей как *in vitro*, так и *in vivo*, включая эндоскопические исследования [1269, 1272, 1373, 1378, 1380, 1388–1393, 1396]. Основные его компоненты — это возбуждающий флуоресценцию лазер, семи- или десятиканальный волоконно-оптический катетер-пробник, полихроматор и ОМА на основе ПЗС или фотодиодной линейки. В работах [1388, 1389] такой спектрофлуориметр был использован для диагностики внутриэпителиальной неоплазии шейки матки. Облучающий световод имел диаметр сердцевины 200 мкм, а каждый из девяти приемных световодов — 100 мкм. Дистальный конец пробника размещался в алюминиевом защитном корпусе с внешним диаметром около 3 мм, для обеспечения постоянного расстояния между тканью и активной частью пробника на его конец прикреплялся кварцевый цилиндр диаметром 3 мм и высотой 2 мм.

Третья схема реализует измерения флуоресценции с разрешением во времени (см. рис. 8.9) [251, 1409]. Короткие УФ-импульсы излучения третьей гармоники АИГ:Nd-лазера (355 нм) с модуляцией добротности (длительность импульса 2 нс, частота повторения 10 Гц) или импульсы излучения лазера на красителях

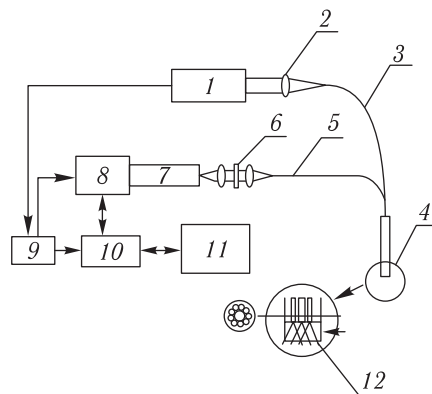


Рис. 8.8. Типичная схема микроспектрофлуориметра для диагностики *in vivo* [1388]: 1 — азотный, эксимерный или лазер на красителях; 2 — согласующая линза; 3 — возбуждающий моноволоконный световод; 4 — зонд; 5 — система собирающих световодов; 6 — согласующие линзы и фильтр; 7 — полихроматор; 8 — ОМА; 9 — генератор ворот; 10 — контроллер; 11 — компьютер; 12 — кварцевый цилиндр

(415–440 нм), накачиваемого излучением АИГ:Nd-лазера, поступают через волоконный световод на флуоресцентный микроскоп. Спектры флуоресценции регистрируются с помощью полихроматора и ОМА, а изображения объекта — с помощью быстродействующей высокочувствительной ПЗС-камеры. Работа ОМА- и ПЗС-камеры синхронизируется с соответствующей задержкой по времени с лазерными импульсами. Установка обеспечивает минимальные временные ворота для наблюдения спектров и изображений, равное 5 нс, с переменным временем задержки в диапазоне 0–20 нс. Спектры и изображения усредняются по 50–200 измерениям.

Отметим, что помимо высокого пространственного и спектрального разрешения использование импульсных лазеров в сочетании с многоканальными оптическими

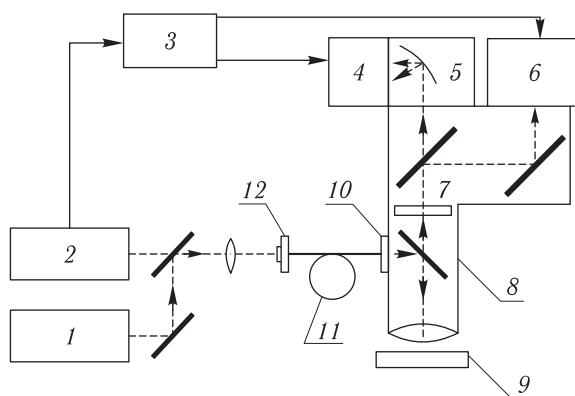


Рис. 8.9. Флуоресцентный микроскоп с временной выборкой спектров и изображений [1409]: 1 — лазер на красителях (410–440 нм) с накачкой от АИГ:Nd-лазера; 2 — АИГ:Nd-лазер (третья гармоника, 355 нм, 2 нс, 10 Гц); 3 — импульсный генератор с задержкой; 4 — ОМА; 5 — полихроматор; 6 — быстродействующая ПЗС-камера (нс); 7 — фильтр; 8 — флуоресцентный микроскоп; 9 — образец; 10 — выходное устройство связи ВС; 11 — волоконный световод (ВС); 12 — входное устройство связи ВС

анализаторами позволяет обеспечить высокое временное разрешение, вплоть до пикосекундного и субпикосекундного диапазона длительностей.

Значительные перспективы в микрофлуориметрии имеет метод фазовой модуляционной флуориметрии, основанный на измерении глубины модуляции и соответствующего сдвига фаз сигнала, пропорционального интенсивности флуоресценции в широком диапазоне модулирующих частот возбуждающего излучения [77, 249, 551, 1402]. Фазовый метод позволяет анализировать многокомпонентные вещества с короткими временами жизни, с малым стоксовым сдвигом между линиями поглощения и флуоресценции. Типичные фазовые флуориметры работают вплоть до частот модуляции, равных 0,3–30,0 ГГц.

Микрофлуоресцентный метод используется для количественного аминокислотного анализа и определения содержания ДНК в клетках бактерий, идентификации и изучения свойств пигментов и красителей в модельных системах (липосомы, тени эритроцитов) и внутри живых клеток (культура клеток почки свиньи, фибробластов человека и пр.), изучения внутриклеточного транспорта, в том числе и методом лазерного фотообесцвечивания. В практической медицине возможны флуоресцентная диагностика рака (при фотосенсибилизации опухолевых клеток различными красителями), ишемии сердечной мышцы (в нормальных физиологических условиях); флуоресцентное сопровождение операции на сердце (контроль метаболизма сердечной мышцы), лазерная ангиопластика при атеросклерозе [5].

Возможность применения флуоресцентной спектроскопии для диагностики патологических состояний биотканей основана на том, что в процессе соответствующих биохимических реакций в ткани меняется относительное содержание основных хромофоров (флуорофоров): НАДН, триптофана, эластина, коллагена, кератина и флавинов. Однако исследования в биотканях существенно затруднены из-за сильного рассеяния и поглощения нефлуоресцирующими компонентами (гемоглобином, меланином). Поэтому успех той или иной флуоресцентной методики диагностики зависит от корректности учета этих факторов.

Многие ранние работы по флуоресцентной диагностике относились в основном к анализу флуоресценции естественных флуорофоров под воздействием УФ-излучения лазеров [295, 1366, 1384]. Были проведены исследования автофлуоресценции при одноволновом возбуждении многих типов биотканей *in vitro*, включая ткани желудка, пищевода, кишечника, шейки матки, легких, почек, тимуса и зубов. Многие из этих исследований показали, что участки ткани с патологией имеют меньшую интенсивность свечения, чем здоровая ткань.

Эти работы получили развитие в последующих исследованиях по разработке флуоресцентных методик диагностики *in vivo*. В качестве источников излучения, как правило, использовались азотные лазеры (337 нм), эксимерные лазеры (308 нм), лазеры на красителях (370, 410 нм) с накачкой от азотного лазера. Типичная экспериментальная установка показана на рис. 8.8. Обследовались пациенты с патологиями пищевода, шейки матки (внутриэпителиальная неоплазия [1388, 1389]) и прямой кишки (рак, полипы). На достаточно большом материале (десятки пациентов и в некоторых случаях более ста проб по каждому исследованию) показано, что чувствительность методики лежит в диапазоне 86–100 %, а специфичность составляет 73–98 % в зависимости от типа диагностики, меньшие значения соответствуют дискриминации близких по природе образований, например неопластических и гиперпластических полипов. В качестве примера представлены спектры автофлуоресценции шейки матки двух пациентов: одной с хроническим воспалением и вирусной инфекцией (HPV — папилломавирус человека) (рис. 8.10, а), другой с различными стадиями внутриэпителиальной неоплазии и вирусной инфекцией (рис. 8.10, б), за-

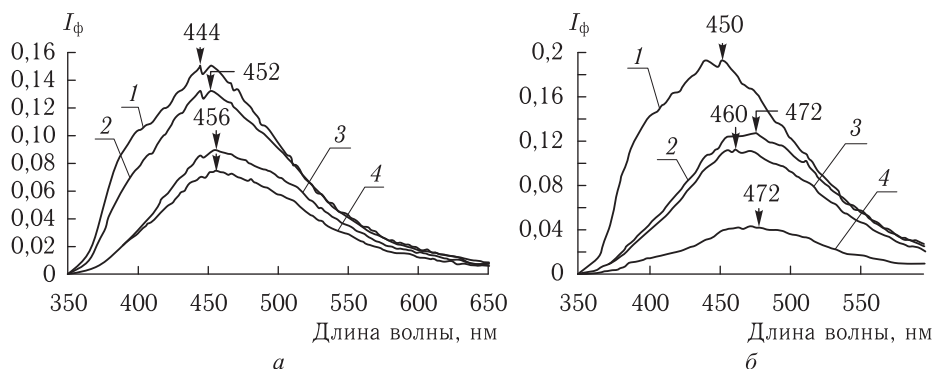


Рис. 8.10. Спектры автофлуоресценции шейки матки двух пациенток [1388]: 1, 2 — здоровая ткань, 3 — воспаленная ткань, 4 — вирусная инфекция (HPV) (а); 1 — здоровая ткань, 2 — HPV, 3 — внутриэпителиальная неоплазия (II степень), 4 — внутриэпителиальная неоплазия (III степень) (б)

регистрированные с помощью микроспектрофлуориметра (см. рис. 8.8) с азотным лазером.

Другое направление исследований вызванной лазерным излучением автофлуоресценции биотканей — это диагностика атеросклеротических изменений сосудов, что важно для сопровождения лазерной ангиопластики сосудов [295, 326, 1366, 1380, 1395, 1396]. Имеется возможность дифференцировать ткани по частичному преобразованию эластина нормальной ткани в коллаген атеросклеротической бляшки при возбуждении на $\lambda = 337$ нм [295]. При возбуждении на $\lambda = 308$ нм идентифицируется накопление модифицированных липопротеинов в стенке сосуда, что может быть индикатором ранней стадии атеросклероза [1396]. Флуоресцентное исследование ткани миокарда позволяет устанавливать статус сердечной мышцы [295]. При этом в исследованиях *in vitro* измерение двух отношений интенсивности флуоресценции на длинах волн 390/465 нм и 465/525 нм дает возможность достаточно надежно дифференцировать нормальную, жировую и зарубцованную ткань.

Лазерная автофлуоресценция находит применение при исследованиях естественной микрофлоры кожи, в частности микроорганизмов *Propionibacterium acne*, которые продуцируют флуоресцирующие порфирины и являются источниками появления вульгарных угрей [1401]. Автофлуоресцентная спектроскопия перспективна для мониторинга заживления ран и ожогов [1385, 1413]. В качестве примера на рис. 8.11 представлены два спектра флуоресценции кожи экспериментального животного (крысы), снятые в области нормальной кожи и в области раны.

Возбуждение спектров на нескольких (или многих) длинах волн позволяет исследовать поведение многих хромофоров одновременно и тем самым более надежно различать здоровую и патологическую ткань. Такие измерения были проведены *in vivo* для тканей мозга [1366] и кожи [1391] человека, для экспериментального животного (крысы) при исследовании заживления дермальных ран и ожогов [1385], а также *ex vivo* и *in vitro* при разработке методик диагностики рака прямой кишки [1397], шейки матки [1366] и мочевого пузыря [1378]. Следует отметить, что исследования *in vivo* здоровой кожи и кожи в области опухоли (злокачественная меланома, доброкачественная пигментированная опухоль и др.) в широком диапазоне длин волн возбуждения и излучения не выявили каких-либо специфических особенностей флуоресценции опухолевой ткани, в основном из-за сильных пространственных вариаций оптических свойств как здоровой, так и патологической кожи, что в настоящее

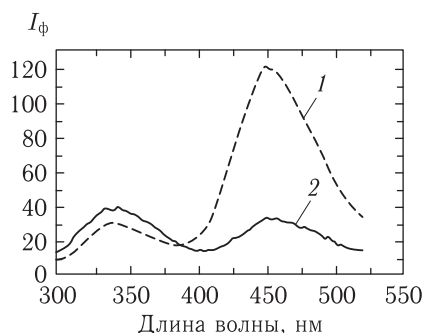


Рис. 8.11. Типичный спектр *in vivo* автофлуоресценции кожи крысы в области здоровой ткани (1) и в области раны (2), возбуждение на длине волны 275 нм [1385]

время не позволяет рекомендовать автофлуоресценцию как метод диагностики рака кожи [1391]. Тем не менее ведутся интенсивные поиски новых методик, позволяющих использовать автофлуоресценцию в сочетании со спектрофотометрией отраженного сигнала для дифференциации доброкачественных и злокачественных опухолей кожи (см. например [1419]).

Выделение сигнала флуоресценции такого компонента живой ткани, как НАДН, позволяет осуществлять контроль ряда метаболических процессов и тем самым диагностировать некоторые виды патологий [295, 1366, 1385, 1387, 1409].

Автофлуоресцентная спектроскопия особенно перспективна для исследований существенно более однородных тканей глаза [1, 484, 1366, 1376, 1377, 1381, 1382, 1403, 1405]. Например, линии аргонового лазера (351,1; 363,8 и 457,8 нм) были использованы для исследований возрастных изменений пространственных распределений синего (длина волны излучения 420 нм, свечение кристаллинов) и зеленого (520 нм, неизвестный компонент) флуорофоров в хрусталиках [1381, 1382]. Исследовались фракции растворимых и нерастворимых белков, взятые из ядерной и корковой областей хрусталика. Показано, что интенсивность флуоресценции может служить маркером появления нерастворимых белков, т. е. маркером патологических изменений ткани хрусталика.

В работах [1376, 1377] суммируются результаты исследований автофлуоресценции *in vivo* (сине-зеленая область) и спектров пропускания (450–550 нм) хрусталиков человека. Оказалось, что для здоровых пациентов интенсивность флуоресценции линейно увеличивается, а пропускание экспоненциально уменьшается с возрастом. Заболевание диабетом увеличивает интенсивность флуоресценции. Глаукома и другие заболевания не влияют существенно на интенсивность флуоресценции и пропускание хрусталика. Развитая технология может быть использована в клинике для ранней диагностики катаракты. Используемый в исследованиях промышленный сканируемый флуорофотометр позволяет исследовать распределение интенсивности флуоресценции вдоль оси хрусталика.

Для целей диагностики катаракты *in vivo* разработан измерительный прибор, одновременно регистрирующий распределение света флуоресценции и рассеяния вдоль оси хрусталика с помощью конфокального микроскопа [1403]. Прибор позволяет работать с нерасширенным зрачком, а специальная система слежения автоматически устанавливает величину измерительного объема (300 мкм по длине, 600 мкм по высоте и 80 мкм по ширине). Сигнал рассеяния служит для калибровки сигнала флуоресценции (учет поглощения и мутности ткани хрусталика). Были исследованы хрусталики 923 здоровых и 239 больных диабетом (45 типа I и 194 типа II)

добровольцев в возрасте от 23 до 75 лет. Использовались следующие пары линий для возбуждения и регистрации автофлуоресценции: 364/495, 434/495 и 485/515 нм. Также была найдена почти линейная зависимость интенсивности флуоресценции от возраста для здоровых пациентов и существенное ускорение этой зависимости для больных диабетом, что связывается с образованием коричневых флуоресцирующих белковых аддуктов и перекрестных сшивок белковых молекул с участием глюкозы. Прибор предлагается для массовых обследований населения по поводу диабетической болезни.

Отметим, что калибровка флуоресцентных измерений с помощью одновременно регистрируемых спектров отражения успешно используется в исследованиях сильно рассеивающих тканей *in vivo*, таких как кожа, слизистые внутренних органов [250, 567, 568, 1358–1361].

Для повышения контраста свечения опухолей или других локализованных патологических образований часто используют экзогенные флуорофоры или индуцирующие препараты типа ALA [4, 6, 55, 205, 295, 309, 1382, 1386, 1390, 1392, 1393]. В этом случае методика диагностики может строиться как на исследовании спектров флуоресценции экзогенных красителей, так и комбинации спектров эндогенных и экзогенных флуорофоров. Например, для слизистой оболочки ротовой полости при длине волны возбуждения 400 (± 30) нм наблюдалось возрастание интенсивности как автофлуоресценции, так и флуоресценции, вызванной индуцируемым протопорфирином IX, в ряду: здоровая ткань, новообразование, злокачественное образование [1392]. В то же время для кожи только введение ALA позволяло наблюдать надежно регистрируемое увеличение интенсивности флуоресценции по мере преобразования ткани в сторону злокачественных изменений. При этом методика двойного отношения интенсивностей флуоресценции разных диапазонов длин волн дала возможность устранить сильное влияние пространственных неоднородностей оптических свойств кожи и зависимость измерений от цвета исследуемой ткани. Отношение интенсивностей флуоресценции в красной области (660–750 нм) к желтой (550–600 нм) при возбуждении на $\lambda = 405$ нм делится на отношение интенсивностей этих же полос при возбуждении на $\lambda = 435$ нм [1393]. Эти линии возбуждения соответствуют максимуму полосы Soret для порфиринов и некоторой отстройке от ее максимума.

Для иллюстрации возможности наблюдения патологических изменений ткани и сопровождения фотодинамической терапии за счет флуоресценции ALA-индуцируемых протопорфиринов на рис. 8.12 показаны спектры флуоресценции кожи пациента с эритроплазией Кейра, снятые через 6 часов после местного введения ALA (мазь, содержащая 20% ALA) в процессе фотодинамической терапии. В области введения препарата (область патологии) интенсивность флуоресценции достаточно сильная, при этом не обнаружено флуоресценции фотопродуктов ALA в соседних участках,

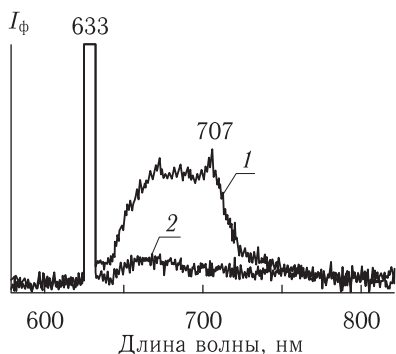


Рис. 8.12. Спектры флуоресценции кожи пациента с эритроплазией Кейра через 6 ч после местного введения ALA (крем с 20%-м содержанием ALA) в процессе фотодинамической терапии (облучение на длине волны 633 нм, 3 Дж/см²): 1 — спектр, снятый в области патологии; 2 — спектр соседнего здорового участка кожи, где крем не наносился [1379]

что свидетельствует о существенно большей скорости конверсии ALA в протопорфирин IX (пик на $\lambda = 707$ нм) и далее в компоненты типа хлорина (полоса с центром на $\lambda = 671$ нм) по сравнению со скоростью диффузии препарата.

Методика определения глубины ожога кожи также строится на определении отношений интенсивности флуоресценции предварительно сенсibilизированной ткани таким красителем, как индоцианин зеленый [1386]. Краситель вводился в кровь экспериментального животного (крысы), и определялось отношение интенсивностей ИК-флуоресценции в полосе 840–850 нм при возбуждении на $\lambda = 780$ и 369 нм, измеренное отношение является характеристичным для глубины поражения кожи.

Для мониторинга заживления ран удобен новый тип лазерного сканирующего дерматологического микроскопа «Stratum» (Opti Scan Ltd. Мельбурн, Австралия) с волоконно-оптическим пробником, который позволяет формировать горизонтальные изображения размером 250×250 мкм² с высоким разрешением [1413]. Мобильный ручной пробник содержит как оптическую систему получения изображения, так и фокусирующую систему, которые связаны с лазером и блоком детектирования через световоды. Это позволяет исследовать объекты сложной конфигурации, такие как раны и ожоги. Для возбуждения флуоресценции использовался аргоновый лазер ($\lambda = 488$ нм). Глубина зондирования устанавливается вручную и максимально составляет 250 мкм, что позволяет анализировать различные слои дермы по глубине и дифференцировать клеточные структуры ткани при использовании соответствующего красителя.

В работах [1414–1418] разработана технология визуализации опухолей кожи на основе поляризационно-чувствительной отражательной флуоресцентной спектроскопии в широком поле (~ 3 –12 см) с поперечным разрешением ~ 8 –50 мкм и продольным разрешением ~ 50 –200 мкм). Технология использовалась для определения границ опухоли, функциональной визуализации, исследования кинетики хромофоров и флуорофоров, спектрального анализа компонентов ткани с пространственным разрешением. Использование конфокальной микроскопии, а также измерение времени жизни флуоресценции позволило существенно расширить возможности этой технологии и довести пространственное разрешение до 1 мкм в поперечном измерении и до 3 мкм в продольном. Тем самым оказалось возможным обеспечить исследование локализации места связывания хромофоров и флуорофоров, функциональную визуализацию с высоким пространственным разрешением, измерение вязкости, мониторинг процесса коагуляции, исследование проницаемости веществ через кожу и фармакокинетики лекарственных препаратов *in vivo*.

Многие из приведенных выше исследований были выполнены с помощью импульсных лазеров (азотного, эксимерного и др.), однако нас пока интересовала лишь усредненная по времени интенсивность флуоресценции на разных длинах волн. В ряде случаев дополнительную информацию о флуорофорах и, соответственно, повышение эффективности дифференцирования здоровой и патологической ткани можно получить из кинетических измерений с помощью микрофлуориметров с временным разрешением. Например, интенсивность флуоресценции участков патологической ткани стенки сосуда затухает медленнее, чем здоровой, что связывают с большим временем жизни молекул коллагена в возбужденном состоянии по сравнению с временем жизни молекул эластина, поскольку эластин здоровых тканей частично преобразуется в коллаген образующейся атеросклеротической бляшки [295].

При исследованиях накопления фотосенсибилизаторов в опухолях и окружающих здоровых тканях, а также образования фотопродуктов в процессе фотодинамической терапии временной подход также оказывается полезным [55, 251, 295, 1375, 1400, 1401, 1407–1409]. Например, для молекул ПГП (фотофрин II) время затухания флуоресценции существенно выше, чем время затухания автофлуоресценции ткани

[295]. Или другой пример, под действием излучения эндогенные протопорфирины частично преобразуются в фотопродукты, называемые фотопротопорфинами, при этом из-за многокомпонентного состава протопорфиринов временной отклик флуоресценции имеет по крайней мере два характерных времени затухания: для необлученного объекта 1 и 6 нс, а для облученного, соответственно, 0,63 и 3,4 нс [1401].

С использованием микроспектрофлуориметра с временной выборкой спектров (см. рис. 8.9) можно анализировать вклады различных компонентов биоткани в формирование спектра флуоресценции. Спектры автофлуоресценции тканей мочевого пузыря человека и ряда выделенных компонентов биоткани наглядно иллюстрируют такую возможность (рис. 8.13). Оба типа исследуемой ткани показали повышенную интенсивность излучения в области 430–435 нм, что может отражать вклад связанной НАДН (для данной временной выборки спектр суспензии дрожжей определяется спектром флуоресценции свободной (максимум 460 нм) и связанной (максимум 435 нм) НАДН). Свечение соединительной ткани в красной области может быть объяснено только присутствием эластина, он же должен давать определенный вклад и в свечение ткани в области $\lambda = 465$ нм. Роль коллагена остается пока невыясненной.

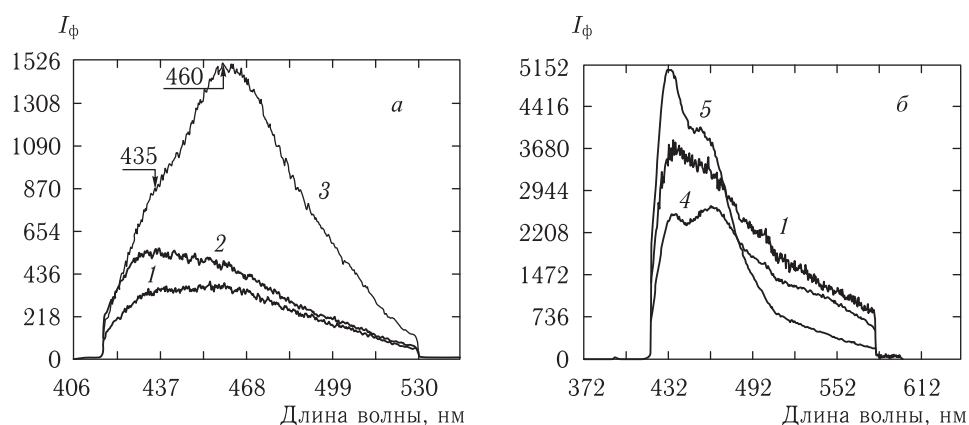


Рис. 8.13. Спектры задержанной во времени автофлуоресценции тканей стенки мочевого пузыря человека: 1 — соединительная ткань (подслизистая), 2 — эпителиальная ткань (опухоль), 3 — суспензии дрожжей (НАДН), 4 — образцов эластина, 5 — коллагена; возбуждение на длине волны 355 нм. Измерения в периоды времени 0–5 нс (а) и 5–10 нс (б) после начала действия импульса лазера [1409]

Задержанная во времени флуоресценция фталоцианинового красителя (AlS_2Pc) при малоинтенсивном возбуждении (< 100 мкВт/см²) в красной области (610, 650 и 670 нм) позволяет надежно визуализировать внутридермальные опухоли (у экспериментальных животных) [1400].

Для диагностики рака предлагается лазерная эндоскопическая система, построенная на принципе визуализации биоткани с помощью измерения пространственных распределений фазы и амплитуды модуляции интенсивности флуоресценции, вызванной модулированным по интенсивности излучением лазера [1402]. Такие измерения с разрешением во времени позволяют визуализировать пространственное распределение того или иного флуорофора по его времени жизни. Для возбуждения флуоресценции использовались лазеры аргоновый, криптоновый и на красителях, интенсивность излучения лазеров модулировалась с помощью электрооптического

модулятора, измерялись модуляционные характеристики как флуоресценции, так и обратно отраженного излучения (см. рис. 8.1). Распределение флуорофоров определялось по временам их жизни. Например, для тканей мочевого пузыря здоровая слизистая имела время затухания флуоресценции $2,6 \pm 0,2$ нс, эритематозный уротелий — $1,65 \pm 0,4$ нс, изъязвленная ткань — $1,25 \pm 0,4$ нс. В этом примере, по-видимому, основным флуорофором является НАДН (длина волны возбуждения 363 нм). И время жизни, и интенсивность флуоресценции уменьшались при эритеме и в случае патологии. Для нормальной слизистой ротовой полости характерное время жизни составляло $2,5 \pm 0,2$ нс, а для саркомы *in situ* время жизни возросло до $3,44 \pm 0,7$ нс. В этом случае имел место вклад от многих хромофоров, однако вклад от порфиринов, по-видимому, преобладал, так как длина волны возбуждения была равна 417 нм.

Лазерная микроспектрофлуориметрия является уникальным инструментом не только для рассмотренных выше прикладных биомедицинских исследований, с ее помощью успешно решаются проблемы фундаментальной медицины и биологии. Одним из важнейших направлений таких исследований является микроспектрофлуориметрия отдельных клеток и их компонентов [55].

Разработаны новые эффективные методы исследования метаболических процессов внутри отдельных клеток, в качестве только двух примеров отметим работы [1256, 1398]. В первой из них описан метод многоточечной спектроскопии и спектральной визуализации отдельных клеток, использующий фурье-спектрометр для регистрации интенсивности флуоресценции (см. главу 6). С помощью этого метода и разработанного авторами спектрометра была исследована локализация, специфика внутриклеточного взаимодействия и первичные фотобиологические реакции эндогенного ALA-индуцированного протопорфирина в отдельной живой клетке меланомы V16. Спектры флуоресценции регистрировались от каждой из $100 \cdot 100$ точек внутри клетки, что обеспечивало пространственное разрешение при локализации исследуемых процессов порядка 0,3 мкм.

Во второй работе описан новый способ удержания исследуемого объекта — клетки с помощью так называемого оптического пинцета (лазерного пучка достаточной мощности и необходимой геометрии для компенсации сил, приводящих частицу в движение). Было показано, что удержание клетки лазерным пучком с длиной волны 1064 нм и плотностью мощности до 70 МВт/см² и дозе облучения до 100 ГДж/см² не изменяет спектра автофлуоресценции клетки (под действием УФ-источника), в то же время удержание клетки лазерным излучением с длиной волны 760 нм даже при меньших уровнях плотности мощности и дозы облучения существенно влияет на автофлуоресценцию (возможно, за счет двухфотонного поглощения в клетке). Эти результаты открывают новые возможности в исследовании флуоресценции отдельных клеток.

Отметим, что лазерные микрофлуоресцентные методы широко распространены в пролетной цитометрии [357, 1372, 1373]. Возможно, что описанный выше лазерный способ удержания отдельных клеток окажется полезным для некоторых методик цитометрии, включая флуоресцентную.

Новым направлением в лазерной микроскопии биологических объектов является двухфотонная флуоресцентная сканирующая микроскопия, позволяющая осуществлять визуализацию функциональных состояний объекта или в сочетании с автокорреляционным анализом сигнала флуоресценции определять внутриклеточную подвижность в малых объемах [15, 19, 20, 41, 260–269, 707, 722, 732–738, 1404, 1405]. Для двухфотонного возбуждения, так же как и для конфокальной микроскопии, свойственно возбуждение малых объемов и дискриминация по глубине, однако без использования малых диафрагм, ограничивающих светосилу. Более того, явления

фотодеструкции и фотовысвечивания, зачастую сопровождающие исследование биологических материалов с помощью конфокальной микроскопии, не свойственны двухфотонной микроскопии. Для конфокальной схемы сбора фотонов в формировании полезного сигнала участвуют лишь баллистические фотоны, которых очень мало в рассеивающей среде, и поэтому приходится облучать объект достаточно интенсивным светом. В то же время в двухфотонной методике используются как баллистические, так и рассеянные фотоны на длине волны флуоресценции, вызванной светом второй гармоники излучения возбуждения, приходящие на широкоапертурный детектор строго из области фокуса пучка возбуждения.

Уникальным достоинством двухфотонной микроскопии является возможность исследования трехмерного распределения возбуждаемых в УФ-свете хромофоров в толстых образцах. Такая возможность обеспечивается тем, что для возбуждения хромофоров (например, поглощающих на длине волны 350 нм) можно использовать существенно более длинноволновое лазерное излучение, соответствующее значительной прозрачности биоткани (700 нм), которое проникает до глубоких слоев и в гораздо меньшей степени повреждает ткани, а излучение флуоресценции опять лежит в видимом диапазоне (> 400 нм); оно сравнительно легко выходит из ткани к фотодетектору, регистрирующему только полезный сигнал из фокального объема без какого-либо постороннего фона (см. раздел 1.6.2).

При исследованиях биотканей и клеток методом двухфотонной микроскопии типичными являются следующие параметры источников излучения — лазерных систем: длина волны 700–960 нм, длительность импульса порядка 150 фс, частота повторения импульсов 76–80 МГц, средняя мощность менее 10 мВт. Такие параметры обеспечиваются лазерами с синхронизацией мод — на красителях с накачкой от АИГ:Nd-лазера или титан-сапфировым с накачкой от аргонового лазера. Перспективными для целей двухфотонной микроскопии считаются твердотельные лазеры с диодной накачкой. Примерно такие же параметры лазеров требуются и для трехфотонной флуоресцентной микроскопии биообъектов, которая обладает всеми достоинствами двухфотонной микроскопии с несколько большим пространственным разрешением и возможностью возбуждать коротковолновые хромофоры [1406].

8.4. КР-микробиопсия

Спектроскопию комбинационного рассеяния (КР) или резонансного КР (РКР) можно также отнести к микроспектральным методам, поскольку для возбуждения КР- или РКР-спектров вещества требуется достаточно высокая плотность мощности, что достижимо только при жесткой фокусировке лазерного пучка [5, 63, 102, 107–109, 331–355, 1255, 1374, 1420–1423].

Один из вариантов лазерной КР-микробиопсии хрусталика глаза показан на рис. 8.14 [333]. В данном случае для фокусировки лазерного пучка Ar-лазера ($\lambda = 514$ нм) применяется оптический микроскоп со встроенной внутри него поворотной призмой. Лазерный пучок попадает в микроскоп через полупрозрачное поворотное зеркало. Рассеянное объектом излучение идет по тому же пути в обратном направлении и попадает на входную щель спектрометра. Для наблюдения сфокусированного лазерного пучка на объекте используется сильно ослабленный отраженный свет, прошедший поворотную призму; свет попадает или в бинокляр для визуального наблюдения, или на цветную видеокамеру для просмотра изображения на мониторе. Для фокусировки применяется 20-кратный объектив, который при размещении объекта в иммерсионной жидкости (рис. 8.14, б) позволяет получить диаметр сфокусированного пучка порядка 2 мкм на расстоянии 4 мм от края объектива. Существуют и другие системы взятия КР-микробиопсии с диаметром сфокусированно-

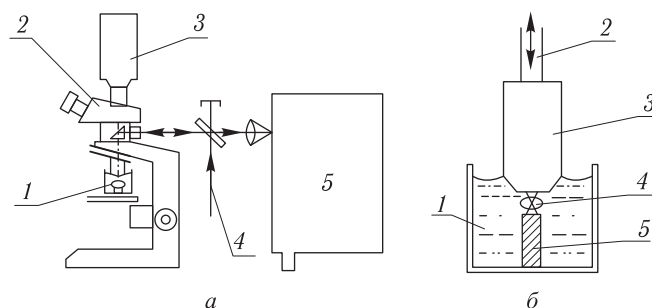


Рис. 8.14. Схематическое представление КР-микробио хрусталика глаза [333]: *а* — общая схема (1 — хрусталик; 2 — микроскоп; 3 — видеокамера; 4 — лазерный пучок; 5 — спектрометр); *б* — область фокусировки лазерного пучка (1 — иммерсионная жидкость; 2 — лазерное и рассеянное излучения; 3 — микрообъектив; 4 — хрусталик; 5 — столик)

го пучка $\leq 0,5$ мкм, например с использованием конфокального принципа (рис. 8.15) [333, 347]. Для конфокальных КР-спектрометров оптимальным является выбор не очень малых диафрагм. Например, для диафрагмы диаметром около 100 мкм при возбуждении на длине волны 660 нм измерительный объем оказывается достаточно малым для проведения исследований внутри клетки (поперечный размер $\approx 0,45$ мкм, продольный $\approx 1,3$ мкм), а КР-сигнал при этом практически не теряется [333]. Высокое пространственное разрешение при значительной амплитуде КР-сигнала без опасности разрушения объекта можно получить, используя узкие ленточные пучки и щель вместо диафрагмы для реализации конфокального приема рассеянного излучения от объекта [333] (см. также рис. 8.3).

В качестве КР-спектрометров используются как традиционные спектрометры со сканированием спектра во времени, так и полихроматоры, совмещенные с ОМА. ОМА позволяет существенно повысить быстродействие КР-микробио.

Напомним некоторые принципиальные моменты из области КР-спектроскопии [332, 982] (см. также раздел 1.8). Если молекулы облучаются монохроматическим светом с частотой ω , то рэлеевское рассеяние происходит на той же частоте ω , и интенсивность его значительна. При КР появляются новые частоты: $\omega_c = \omega_0 - \omega_k$ — стоксовы компоненты и $\omega_{ac} = \omega_0 + \omega_k$ — антистоксовы компоненты, ω_k — комбинационная частота молекулы. Комбинационные частоты соответствуют переходам между колебательными и вращательными уровнями. Однако это не обязательно те частоты, которые наблюдаются в инфракрасных абсорбционных спектрах молекул. Похожесть

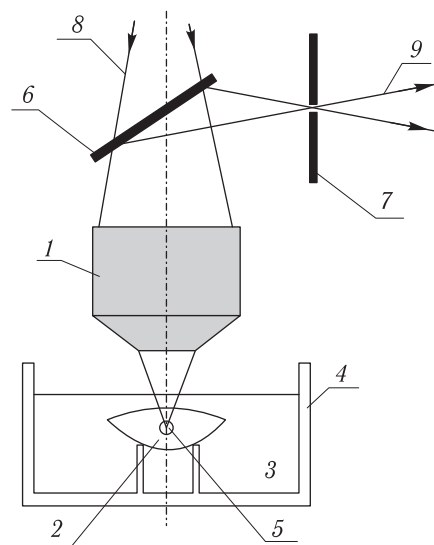


Рис. 8.15. Схематическое представление конфокального принципа регистрации КР-спектров при исследовании водного обмена в хрусталиках глаза человека [347]: 1 — объектив микроскопа; 2 — хрусталик; 3 — фосфатный буферный раствор на основе D_2O ; 4 — кювета; 5 — измерительный объем (увеличено); 6 — фильтр; 7 — точечная диафрагма; 8 — направление от лазера; 9 — направление к спектрометру

ИК-спектров поглощения и КР-спектров зависит от степени симметрии молекул. Для симметричных молекул спектры различаются более значительно, чем для частично или полностью несимметричных. Для многих молекул ИК- и КР-спектры дают взаимно дополнительную информацию о фундаментальных колебательных модах. Взаимная дополнительность КР- и ИК-спектров обусловлена различной природой процессов, лежащих в их основе. КР-спектры формируются за счет появления индуцированного дипольного момента, который в свою очередь зависит от изменения молекулярной поляризуемости в ходе колебания. Возникновение ИК-спектров связано с поглощением ИК-излучения, что оказывается возможным благодаря изменению постоянного молекулярного диполя, которое происходит из-за вариации длины связи в ходе колебания молекулы.

В квантовомеханической модели рассеяние света рассматривается как двухфотонный процесс. Сначала в результате взаимодействия с фотоном молекула переходит в более высокое энергетическое состояние, которое может соответствовать или не соответствовать квантовым уровням молекулы. В последнем случае они называются виртуальными уровнями. Далее через очень короткое время ($< 10^{-11}$ с) происходит переизлучение фотона. Энергия второго фотона в зависимости от типа процесса может быть равна энергии первого фотона (рэлеевское рассеяние), меньше (стоксов процесс КР) и больше (антистоксов процесс КР). Схематически эти процессы показаны на рис. 8.16. В том случае, если в процессе рассеяния принимают участие верхние возбужденные электронные состояния, то имеют место так называемые процессы предрезонансного и резонансного КР. В резонансной области возможно увеличение поперечного сечения КР на несколько порядков.

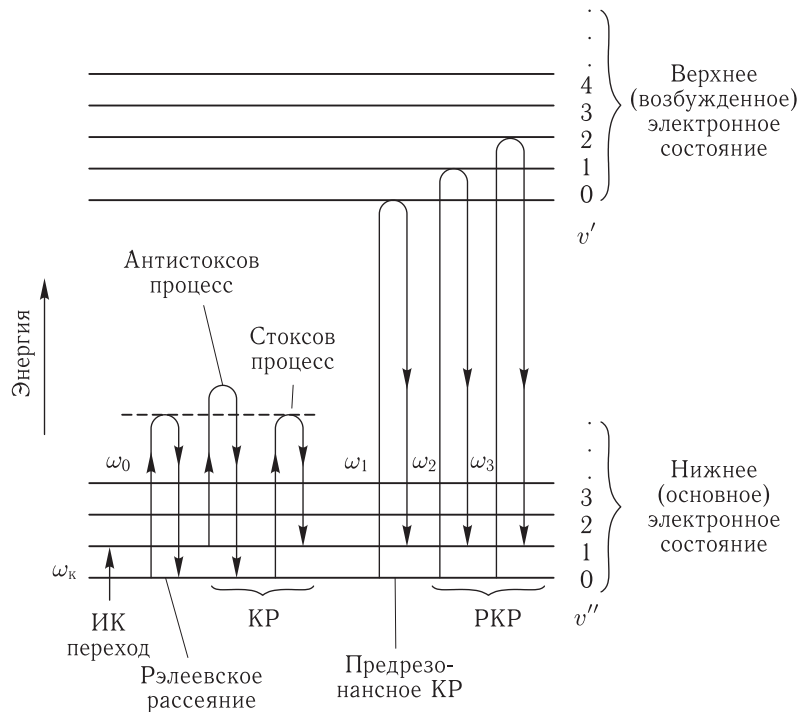


Рис. 8.16. Схематическое представление формирования КР- и РКР-спектров биомолекул [332]

Следуя методике, изложенной в работе [332], назовем главные преимущества и недостатки КР и РКР, имея в виду биомедицинские исследования.

Преимущества.

1. Спектроскопия КР может быть использована применительно к водным растворам и биотканям, так как интенсивность спектра КР воды невелика и он лишь незначительно мешает наблюдению спектра растворенного вещества. В то же время вода очень сильно поглощает ИК-излучение, что затрудняет изучение ИК абсорбционных спектров водных растворов и различных биологических тканей, содержащих значительное количество воды.

2. Спектроскопия КР в равной степени пригодна для исследования жидкостей, растворов, газов, пленок, поверхностей, волокон, тканей, твердых веществ и монокристаллов.

3. Для исследования необходимы небольшие количества вещества, объем КР-микроробы определяется поперечными размерами сфокусированного лазерного пучка.

4. Благодаря использованию лазеров, КР-спектроскопия легко реализуется для различных объектов медицинских исследований с помощью традиционного спектрального оборудования.

5. Ковалентным связям между одинаковыми атомами, такими как С–С или S–S, в спектрах КР соответствуют линии высокой или средней интенсивности. Полосы же в ИК-спектрах поглощения для данных связей имеют низкую интенсивность или вообще не проявляются.

6. С помощью обычного спектрометра КР за одно сканирование можно получить весь колебательный спектр от 10 до 4000 см⁻¹, что в ИК-абсорбционной спектроскопии сделать непросто.

7. Временную шкалу КР и РКР можно считать мгновенной. Спектр КР исследуемой системы, в которой происходит быстрый химический обмен, представляет собой наложение спектров всех участвующих в обмене частиц, причем интенсивность спектров прямо пропорциональна концентрации частиц.

8. С использованием ОМА спектр КР можно снять менее чем за 1 с.

9. Увеличение интенсивности вследствие эффекта РКР обеспечивает селективность спектральной регистрации и позволяет получать колебательный спектр хромофора, который является одним из компонентов сложной биологической смеси.

10. Интенсивность в спектрах РКР дает информацию и о возбужденных электронных состояниях. В этом заключается специфическое достоинство метода, поскольку многие важные для биологии молекулы, например хлорофилл и родопсин, реагируют в возбужденных состояниях.

Недостатки.

1. Высокая плотность лазерного излучения может вызвать нежелательные фотохимические и деструктивные эффекты.

2. КР и даже РКР относятся к числу фотопроцессов, имеющих малое поперечное сечение взаимодействия, поэтому регистрация спектров КР затруднена из-за влияния конкурирующих процессов, например флуоресценции.

3. Обычно для регистрации спектров КР необходимы концентрации веществ, которые в биохимии считаются достаточно высокими (10⁻¹–10⁻² моль/л для КР и 10⁻⁴–10⁻⁶ моль/л для РКР).

4. При регистрации спектров КР-растворов обычно необходима высокая оптическая однородность жидкости. Данные требования менее строги в случае РКР.

При исследовании биообъектов с высоким уровнем флуоресценции можно воспользоваться технически более сложным, но существенно более селективным и имеющим высокое спектральное разрешение методом активной спектроскопии КР

(АСКР) [5]. Этот метод основан на использовании двух перестраиваемых лазеров с частотами ω_1 и ω_2 , пучки которых, пересекаясь в исследуемом образце, вызывают когерентное антистоксово рассеяние на частоте $\omega_a = 2\omega_1 - \omega_2$, интенсивность которого существенно возрастает при совпадении разностной частоты, $\omega_1 - \omega_2$, с частотой исследуемого внутримолекулярного колебания. Помимо высокого спектрального разрешения, метод дает значительную интенсивность рассеянного поля и его направленность.

Возможны и более сложные варианты АСКР, применяемые, например, для исследования возбужденных электронных состояний с пикосекундным временным разрешением. В данном случае исследуемые молекулы возбуждаются излучением пикосекундного лазера накачки, а АСКР-проба осуществляется тремя лазерными пучками с фиксированной частотой ω и перестраиваемыми частотами ω_1 и ω_2 . При этом наряду с когерентным антистоксовым рассеянием ($\omega_a = 2\omega - \omega_2$) регистрируется и когерентное стоксово ($\omega_c = 2\omega_2 - \omega$) ¹⁾.

При изучении веществ низкой концентрации эффективным является так называемый метод гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) ²⁾, который заключается в существенном (до 10^5 – 10^6 раз) увеличении сечения КР молекул, адсорбированных на поверхности металла с сильной шероховатостью [5, 344, 1374, 1375].

Увеличение сечения рассеяния позволяет избежать проблемы сильного влияния флуоресценции при возбуждении ГКР в видимой области. Например, согласно [342], сильно флуоресцирующие желтые пигменты в хрусталиках человека и ряда животных не дают возможности зарегистрировать КР- и РКР-спектры, однако спектры ГКР на золях серебра довольно легко регистрируются в полосе 150 – 1800 см^{-1} при возбуждении Аг-лазером с $\lambda = 514$ нм мощностью 20 мВт.

Буквально революционные изменения происходят в настоящее время в КР-спектроскопии биологических объектов в связи с новыми возможностями возбуждения КР-спектров в ИК-области спектра, что, в частности, связано с разработкой высокочувствительных и быстродействующих ИК-фурье-спектрометров (см. главу 6) [63]. С точки зрения исследований биологических тканей, достоинства ИК-КР-фурье-спектроскопии сводятся к следующему.

1. Отсутствует проблема устранения влияния флуоресценции, так как при ИК-возбуждении флуоресценция, как правило, не возбуждается, что дает возможность исследовать новый класс сильно флуоресцирующих при возбуждении видимым светом компонентов биотканей.

2. Упрощается интерпретация спектров КР, поскольку возбуждение далеко от резонансного.

3. Появляется возможность одновременно регистрировать стоксовы и антистоксовы компоненты КР-спектра, что позволяет надежно определять колебательную температуру в рассеивающем объеме образца.

4. Вплоть до наименьших КР-сдвигов частоты (порядка 40 см^{-1}) ИК-КР-фурье-спектры имеют более тонкую структуру, чем аналогичные абсорбционные ИК-фурье-спектры.

5. Высокая прозрачность большинства биообъектов в ближней ИК- и их непрозрачность в УФ- и видимой областях спектра (см. главы 1 и 2) позволяют легко

¹⁾ В современной литературе используются следующие названия: CARS — Coherent Anti-Stokes Raman Scattering (когерентное антистоксово рамановское рассеяние) и CSRS — Coherent Stokes Raman Scattering (когерентное стоксово рамановское рассеяние).

²⁾ В зарубежной литературе такой метод называется SERS — Surface-Enhanced Raman Scattering.

скомпенсировать потери в сигнале (по сравнению с возбуждением в УФ- и видимой областях), возникающие за счет увеличения длины волны возбуждения (λ^{-4}), и дают возможность исследовать ткани без предварительной подготовки *in vitro* и *in vivo*.

6. Отсутствует необходимость тщательного перемешивания или вращения объектов исследования, так как нет опасности пиролиза цветных образцов.

7. Идеальными источниками для возбуждения КР-спектров являются АИГ:Nd-лазер с $\lambda = 1060$ нм, а также перестраиваемые в ближней ИК-области спектра лазеры на ЩГК и ионных кристаллах, сравнительно недорогие полупроводниковые лазеры претендуют стать источниками возбуждения для клинических КР-спектрометров (см. главу 4).

Технически ИК КР-фурье-микробиология реализуется следующим образом: рассеянное биообъектом излучение поступает на вход фурье-спектрометра и далее регистрируется с помощью ИК-детектора, подключенного к внешнему выходу спектрометра (см. рис. 6.8). Возбуждение рассеянного сигнала можно осуществить, например, по схеме, показанной на рис. 8.14.

Высокую чувствительность и пространственную разрешающую способность КР-спектроскопии удается обеспечить и в рамках обычного КР при возбуждении в видимой области. Например, в [333] описан высокочувствительный КР-конфокальный микроскоп с объемом микропробы порядка $0,2 \text{ мкм}^3$ ($\lambda = 660$ нм) для исследования отдельных клеток и хромосом. В микроскопе излучение флуоресценции и КР от соседних (не исследуемых) участков объекта устраняется с помощью конфокальной конфигурации приемной оптической системы (точечная диафрагма диаметром около 100 мкм в области фокуса регистрируемого светового потока от объекта). Кроме того, для подавления упруго рассеянного излучения (в 10^8 раз) и излучения флуоресценции используются узкополосный интерференционный фильтр специальной конструкции и отсекающий фильтр на основе цветного стекла. Применение фильтров допускает снятие КР-спектров в диапазоне частот $600\text{--}3000 \text{ см}^{-1}$. В качестве ОМА на выходе полихроматора используется охлаждаемая жидким азотом твердотельная ПЗС-камера. Спектрометр существует в двух модификациях: с $\lambda = 660$ нм и $\lambda = 514$ нм.

Изготовление спектрометра строго на одну из длин волн позволяет обеспечить эффективное подавление рэлеевского рассеяния и флуоресценции. Получены, например, КР-спектры цитоплазмы и ядра отдельного нейтрофильного гранулоцита, отдельного ядра лимфоцита человека, а также отдельной хромосомы в диапазоне частот $600\text{--}1700 \text{ см}^{-1}$ за время от 30 до 600 с при мощности лазера ($\lambda = 514$ нм) от 10 мВт до 1 Вт. Более длинноволновое возбуждение позволяет исследовать более широкий спектр клеточных элементов без их повреждения. Например, жизнеспособность клеток оставалась неизменной даже при облучении в течение 300 с на длине волны 660 нм при мощности 20 мВт и размере пучка лазера около $0,25 \text{ мкм}^2$ (плотность мощности 8 МВт/см^2), однако при исследовании цитоплазмы гранулоцитов было необходимо несколько снижать мощность излучения (до 6 мВт) и время измерения (до 30 с) [333].

Влияние флуоресценции существенно зависит от типа исследуемых клеток и изучаемой органеллы клетки. При исследованиях лейкоцитов на $\lambda = 660$ нм флуоресценция не наблюдалась вовсе, а ее уровень при возбуждении на $\lambda = 514$ нм не создавал трудностей при измерениях [333].

Обзор исследований бактерий и клеток животных и человека с использованием КР-микроскопии с возбуждением в УФ- и видимом диапазонах длин волн представлен в работе [333]. Достаточно детально изучены клетки крови человека: тромбоциты, эритроциты и многие типы лейкоцитов и их компоненты. КР-микроскопия дала много новой информации о функционировании этих клеток и их изменениях при

различных патологиях. Исследовались также процессы и содержание компонентов внутри фоторецепторных клеток, клеток спермы, раковых клеток [333]. Таким образом, КР-спектроскопия отдельных клеток перспективна для изучения субклеточных структур и их функциональных особенностей, а также для контроля метаболизма клеток в нормальных и патологических состояниях и их отклика на лекарственные препараты.

Спектроскопия КР как неинвазивный метод лазерной диагностики, дающий информацию об объекте на молекулярном уровне и имеющий значительные перспективы для проведения анализа *in vivo* и *in situ*, все больше проникает в область медицинских исследований. Первым и остающимся одним из основных применений КР-спектроскопии в медицине является офтальмология (изучение интактных хрусталиков животных и человека [63, 340, 341, 346, 347]). Разработка КР-микроспектрометров с многоканальной регистрацией спектров, обеспечивающих высокое быстродействие и пространственное разрешение (локальность) при значительной чувствительности, открывает возможность проведения ранней диагностики такого серьезного и массового заболевания, как катаракта. Блок-схема одного из спектрометров представлена на рис. 8.17. Главным элементом спектрометра является высокочувствительный охлаждаемый многоканальный детектор, который в сочетании с Аг-лазером ($\lambda = 488$ нм) небольшой мощности (2–30 мВт) позволяет получать КР-спектры в довольно широкой полосе частот за очень малое время (рис. 8.18) и определяет возможность снятия КР-спектров *in vivo*. Заметим, что при мощности излучения лазера 2 мВт и выше происходят повреждения ретиальной оболочки глаза при времени облучения 0,5 с.

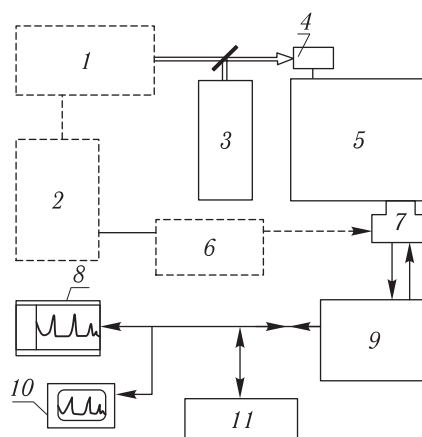


Рис. 8.17. КР-спектрометр для измерений *in vivo* [1374]: 1 — лазер на красителях; 2 — эксимерный лазер; 3 — непрерывный Аг-лазер; 4 — образец; 5 — дифракционный спектрограф; 6 — синхронный импульсный генератор; 7 — охлаждаемый многоканальный детектор; 8 — графопостроитель; 9 — компьютер; 10 — дисплей; 11 — магнитная память. Пунктиром показана часть установки для импульсной КР-диагностики

Импульсный вариант КР-спектрометра на основе перестраиваемого лазера на красителях, накачиваемого эксимерным или азотным лазером, позволяет с большей гарантией реализовать измерения *in vivo* за счет оптимизации возбуждения спектров (подстройка частоты лазера) и уменьшения экспозиции (импульсный режим) (см. рис. 8.17, показано пунктиром).

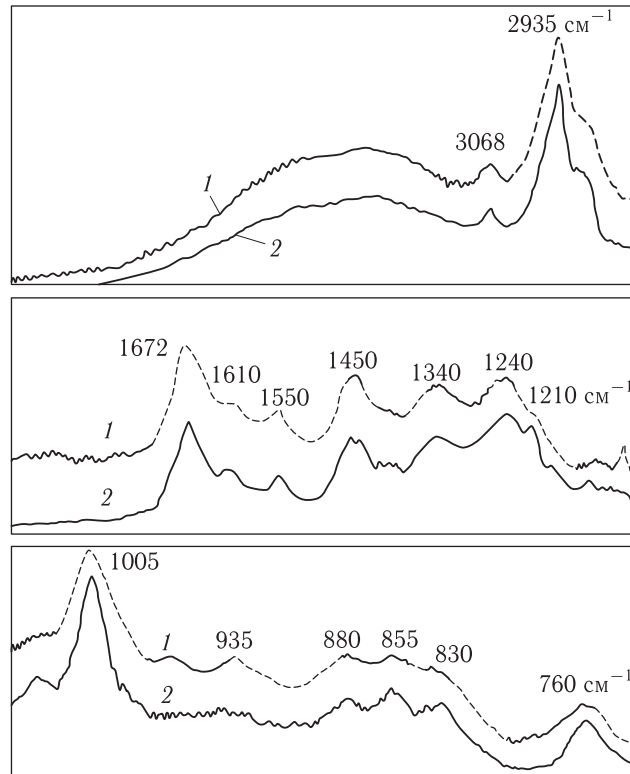


Рис. 8.18. КР-спектры хрусталика глаза кролика в области ядра при возбуждении Аг-лазером с $\lambda = 488$ нм [340]: 1 — измерения *in vivo*, мощность излучения лазера $P = 2$ мВт, 2 — измерения для изолированного хрусталика ($P = 30$ мВт). Время экспозиции для каждого из трех фрагментов спектра порядка 0,5 с

КР-микроспектрометр, работающий на линии 514 нм аргонового лазера с мощностью 60 мВт и диаметром пятна на объекте в 2 мкм, использовался для снятия спектров хрусталика в диапазонах частот 200–1400, 700–1900, 2400–3600 и 2800–4000 см^{-1} с помощью дифракционного спектрометра и многоканального анализатора с линейкой из 1024 фотодиодов [1374]. Время измерения полного спектра составляло 5–30 мин. Данные по КР-сдвигам частоты характерных полос в спектре и результаты их отнесения представлены в табл. 8.2.

КР-спектр нормального хрусталика образуется перекрывающимися спектрами так называемых α -, β - и γ -кристаллинов — структурных белков (вес которых у млекопитающих составляет приблизительно 33% от общего веса хрусталика), спектрами их производных (в основном агрегатов белков) и воды, содержащейся в хрусталике [341]. С помощью КР-спектроскопии изучается молекулярная структура нормальных, состарившихся и катарактальных хрусталиков животных и человека, в том числе и хрусталиков, подвергнутых воздействию УФ-излучения и воздействию лекарственных препаратов [63, 341, 1374]. Наиболее интересные результаты получены для вторичной структуры белков хрусталика и для микроокружения боковых групп белков (триптофана, тирозина и сульфидных групп). Для ранней диагностики катаракты представляют интерес следующие полосы [340, 1374]: широкая полоса в диапазоне частот 3600–3100 см^{-1} , определяемая наличием воды в хрусталике; полоса с ча-

Таблица 8.2. Характерные полосы спектра КР свежеприготовленного целого хрусталика глаза кролика, полученного от поверхностного слоя над ядром хрусталика (Гисберс и др. [1374])

| Сдвиг частоты, см ⁻¹ | Вещество, тип колебаний | Сдвиг частоты, см ⁻¹ | Вещество, тип колебаний |
|---------------------------------|-------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| 495 | — | 1268 | Амид III |
| 521 | — | 1278 | — |
| 622 | Ф | 1322 | С-Н |
| 644 | ТРЗ | 1342 | ТРФ |
| 697 | С-S | 1404 | -CO ₂ |
| 725 | С-S | 1450 | -CH ₂ |
| 760 | ТРФ | 1550 | ТРФ |
| 829 | ТРЗ | 1586 | ТРЗ, Ф |
| 855 | ТРЗ | 1606 | Ф |
| 880 | ТРФ | 1617 | ТРЗ |
| 936 | С-С | 1670 | Амид I |
| 961 | С-С | 2568 | S-H |
| 1005 | Ф | 2732 | — |
| 1032 | Ф | 2877 | С-Н(*) |
| 1075 | С-N | 2939 | С-Н(*) |
| 1129 | С-N | 2962 | — |
| 1159 | С-N | 3062 | С-Н(**) |
| 1177 | ТРЗ, Ф | 3287 | H ₂ O, N-H |
| 1209 | ТРЗ | 3390 | H ₂ O |
| 1240 | Амид III | | |
| 1256 | Амид III | | |

Примечание. Время измерения 5 мин. Хрусталик погружен в иммерсионную жидкость. Источник возбуждения — Аг-лазер с $\lambda = 514,5$ нм, мощность 60 мВт, размер пятна на объекте — 2 мкм. Значения КР сдвигов частоты приведены без учета нелинейности шкалы длин волн спектрографа. Ф — фенилаланин, ТРФ — триптофан, ТРЗ — тирозин; (*) — неароматический фрагмент, (**) — ароматический фрагмент.

стотой 2580 см⁻¹ ($\tilde{\nu} = 2568$ см⁻¹, по данным табл. 8.2), отнесенная к валентным колебаниям сульфидных групп цистеинового остатка; дублетные полосы тирозина на частотах 855 и 831 см⁻¹ ($\tilde{\nu} = 829$ см⁻¹, см. табл. 8.2); полосы триптофана на частотах 880 и 760 см⁻¹; конформационные полосы полипептидного основания на $\tilde{\nu} = 1672$ см⁻¹ амида I и $\tilde{\nu} = 1240$ см⁻¹ амида III; полосы триптофана на $\tilde{\nu} = 644$ см⁻¹ и фенилаланина на $\tilde{\nu} = 624$ см⁻¹ ($\tilde{\nu} = 622$ см⁻¹, см. табл. 8.2).

Отношения интенсивностей наиболее характерных КР-полос хрусталика глаза кролика, чувствительных к искусственно вызванной за счет соответствующей диеты катаракте, представлены в табл. 8.3 [1374]. Изменения в полосах, соответствующих воде, сульфидным группам, тирозину, триптофану и фенилаланину, а также амиду I и амиду III, предполагают ряд структурных модификаций, возникающих при формировании катаракты, которые приводят к частичному преобразованию триптофановых остатков белков хрусталика из «закрытой» в «открытую» форму, возможности вовлечения тирозиновых остатков в предполагаемый процесс «агрегации белков», одновременному частичному превращению SH-групп цистеина в S-S связи [1374].

Таблица 8.3. Отношение интенсивностей КР-полос хрусталика глаза кролика (катаракта вызвана искусственно за счет диеты; лекарственный препарат — Bendalina) (Бертолуцце и др. [1374])

| Частоты, см ⁻¹ | Отношение интенсивностей КР-полос | | |
|---------------------------|-----------------------------------|------------------------------|----------------------------|
| | Нормальный хрусталик | Катарактальный хрусталик | |
| | | без лекарственного препарата | с лекарственным препаратом |
| 3390/2935 | 0,40 | 0,50 | 0,43 |
| 2580/2730 | 1,53 | 1,38 | 1,43 |
| 831/855 | 0,92 | 0,96 | 0,94 |
| 880/760 | 0,78 | 0,66 | 0,71 |
| 644/624 | 1,77 | 1,44 | 1,55 |

Отношение интенсивности полосы 3390 см⁻¹ (ОН-валентные колебания) к интенсивности полосы 2935 см⁻¹ (СН-валентные колебания) изменяется от 0,40 для прозрачного хрусталика до 0,50 для катарактального хрусталика глаза кролика (см. табл. 8.3). При обработке хрусталика антикатарактальным лекарственным препаратом это соотношение устанавливается на уровне 0,43 [1374]. Обратные процессы происходят в ядре хрусталика мыши при старении, когда данное отношение уменьшается от 0,33 до 0,18 [341]. Такие изменения свидетельствуют о потере воды в процессе старения. В то же время исследования трех типов катаракты у мышей показывают, что интенсивность ОН-валентных колебаний (3390 см⁻¹) существенно возрастает по мере помутнения хрусталика. Например, отношение интенсивностей для катарактального и нормального хрусталиков при одинаковом возрасте, равном 4 месяцам, составляет 1,1–1,4. Таким образом, относительная интенсивность характеристических колебаний Н₂О может служить в качестве теста при диагностике катаракты. Однако следует помнить об адекватности моделей старения хрусталиков разных типов экспериментальных животных модели старения хрусталика человека [63].

При исследовании структурных изменений катарактальных хрусталиков человека возникают определенные трудности из-за их сильной флуоресценции, которая усиливается с возрастом. Отношение интенсивности флуоресценции к интенсивности отдельных полос в КР-спектре является мерой патологии хрусталика, что связано с его помутнением за счет высокомолекулярных агрегатов белков, которые одновременно являются и новыми либо видоизмененными флуорофорами [341]. Воздействие антикатарактальных препаратов значительно снижает фон флуоресценции в КР-спектрах, данный эффект может служить мерой действия препаратов. С другой стороны, удлинение длины волны возбуждающего лазера от 407 нм до 514 нм и далее до 647 нм позволяет сильно уменьшить фон флуоресценции и надежно регистрировать КР-спектры [63, 1374].

Как уже отмечалось выше, КР-тест на наличие катаракты определяется содержанием воды в хрусталике, что количественно может быть охарактеризовано как отношение интенсивностей КР-полос воды (3390 см⁻¹) и белка (2935 см⁻¹). В выявлении природы изменения баланса воды важное значение имеет регистрация распределения ее содержания по хрусталику. Например, с использованием конфокального КР-микроскопа (см. рис. 8.15) и сканирования возбуждающего лазерного пучка удается контролировать содержание воды в хрусталиках животных и человека с пространственным разрешением не хуже 0,1 мм или изучать водный обмен *in vitro* [347]. В последнем случае использовалась методика замещения воды в хру-

сталике на тяжелую воду, а в качестве индикаторов замещения воды в ткани на тяжелую воду служили валентные колебания OD (2450 см^{-1}) и OH (3390 см^{-1}), при этом валентное колебание СН белков хрусталика (2935 см^{-1}) использовалось как внутренний стандарт. По отношению интенсивностей линий КР I_{2450}/I_{2935} и I_{3390}/I_{2935} определяли временную зависимость относительной концентрации D_2O и H_2O . На основании этих измерений были найдены значения скорости диффузии воды в интактном и фиксированном хрусталиках, которые оказались соответственно равными $3 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$ и $0,75 \cdot 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$. Уменьшение коэффициента диффузии после фиксации может объясняться формированием дополнительных связей между молекулами белков хрусталика, которые препятствуют транспорту воды.

Для контроля процессов метаболизма хрусталиков животных и человека с целью разработки эффективной методики диагностики катаракты был создан автоматизированный спектральный комплекс лазерной флуоресцентной/КР-микропробы (рис. 8.19) [342]. В данном случае сопровождающий флуоресценцию КР-сигнал является нормирующим. Если излучение возбуждения достаточно длинноволновое, то отношение интенсивностей флуоресценции ($I_{\text{фл}}$) и КР ($I_{\text{кр}}$) может быть использовано в качестве возрастного критерия качества хрусталика (ухудшение качества с возрастом). В частности, для каждого хрусталика существует своя критическая длина волны возбуждения $\lambda_{\text{кр}}$, ниже которой КР-спектр наблюдается без флуоресцентной подставки.

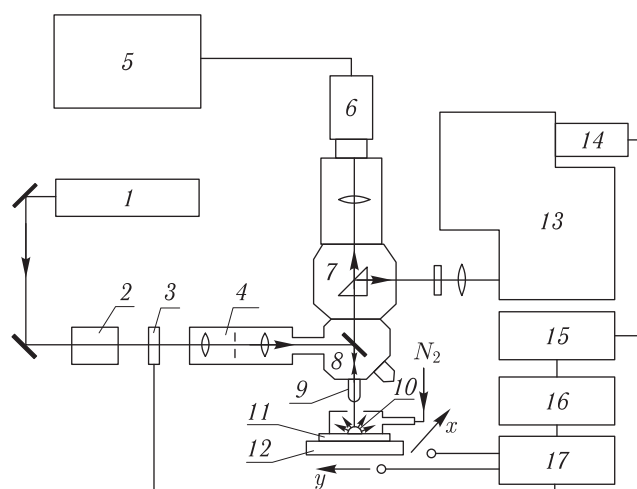


Рис. 8.19. Автоматизированная сканирующая система для лазерной КР/флуоресцентной микропробы [342]: 1 — He-Cd-лазер ($\lambda = 441,6 \text{ нм}$), Ar-лазер ($\lambda = 488,0; 514,5 \text{ нм}$) или Kr-лазер ($\lambda = 406,7; 647,1 \text{ нм}$); 2 — фильтр для устранения линий плазмы газового разряда лазера; 3 — электронноуправляемый затвор; 4 — пространственный фильтр; 5 — монитор; 6 — пространственный фильтр; 7 — видеокамера; 8 — поворотная призма; 9 — делитель пучка; 10 — объектив микроскопа; 11 — объект; 12 — охлаждаемая пластина; 12 — управляемый по осям x и y столик; 13 — трехрешетчатый монохроматор; 14 — 700-канальный оптический анализатор (РА 1420); 15 — контроллер анализатора; 16 — компьютер; 17 — интерфейс

Спектральный комплекс (см. рис. 8.19) имеет следующие важные достоинства: 1) многоканальную регистрацию для различных точек биообъекта с шагом 1–8 мкм; 2) два типа сканирования образца — микро ($10 \cdot 10 \text{ мкм}$) и макро ($2,5 \times 2,5 \text{ см}$); 3) автоматическую одновременную регистрацию интенсивности флу-

оресценции нескольких спектральных линий (вплоть до 6 линий, в максимуме или интегрально) для каждой точки объекта; 4) высокую степень фильтрации излучения, позволяющую регистрировать слабые КР-линии от твердых образцов; 5) нормировку интенсивности флуоресценции к КР-сигналу (важно для изучения пигментации); 6) представление результатов в виде трехмерных цветных карт на экране дисплея.

С помощью спектрального комплекса были проведены исследования распределения зеленого флуорофора вдоль оптической оси хрусталика глаза человека, измерена интенсивность флуоресценции от 1200 точек на площади среза хрусталика размерами $6,5 \times 9,5$ мм. Такие данные важны для изучения взаимосвязи метаболических процессов в различных частях хрусталика, включая анализ влияния эффектов дневного света на хрусталик глаза человека. Была также реализована визуализация желтого флуорофора хрусталика глаза человека.

КР-микроспектроскопия комбинируется также с исследованиями упруго рассеянного света [346]. В данном случае КР-конфокальный микроскоп служил для одновременных с упругим рассеянием измерений пространственного распределения концентрации белка по объекту. Такие комбинированные исследования важны при выяснении механизмов старения хрусталиков и образования катаракты.

Обзор достижений в области КР-диагностики рака и предраковых состояний различных тканей и органов представлен в [63]. В работе дан краткий обзор биологии рака в той части, которая имеет непосредственное отношение к возбуждению КР-спектров. Детально рассмотрено формирование КР-спектров молекул, участвующих в развитии неоплазий, которые отражают изменения взаимодействия этих молекул (белки, ДНК, взаимодействие белков и ДНК в ядре, молекулы мембран), представлены соответствующие КР-спектры. Рассмотрение КР-спектров нормальных и патологических тканей предварено обсуждением техники эксперимента, проблемы устранения сильного влияния флуоресценции, эффектов состояния образцов (фиксированные или свежие), проблемы адекватности моделей тканей экспериментальных животных тканям человека с точки зрения КР-спектроскопии, соответствия измерений *in vitro* и *in vivo*. Отметим, что многие из этих проблем кратко обсуждались выше на примере других тканей и видов патологий.

В работе [63] помимо обсуждения методических вопросов диагностики рака и предрака с помощью КР-спектроскопии приведен обширный материал по КР-спект-

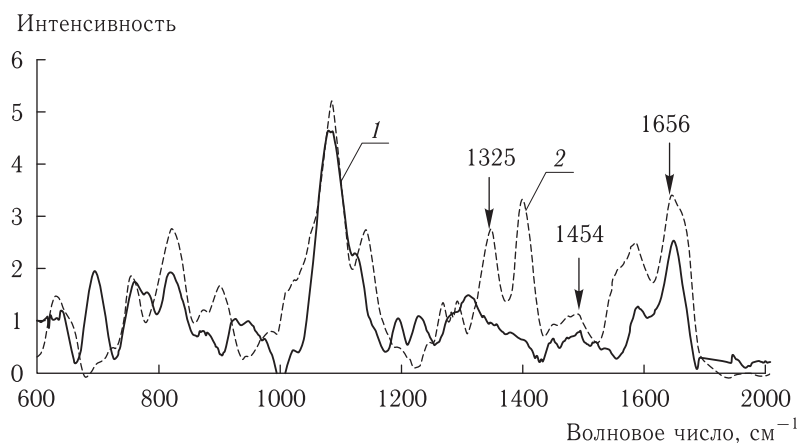


Рис. 8.20. КР-спектры здоровой (1) и предраковой (2) ткани шейки матки человека, снятые при возбуждении на $\lambda = 789$ нм (25 мВт, 15 мин) [63]

рам многих типов здоровых и патологических тканей, включая ткани мозга, груди, прямой кишки, мочевого пузыря, женской половой системы. Один из примеров КР-спектров для здоровой и предраковой ткани шейки матки человека представлен на рис. 8.20. Основные результаты по различным тканям сведены в табл. 8.4–8.6. Они убедительно показывают потенциальные возможности КР-микробиопсии в медицинских приложениях. Анализ спектров (характерных пиков и их интенсивностей) раскрывает некоторые общие черты и различия в зависимости от типа ткани и характера патологии. Например, отношение интенсивностей полос на $\lambda = 1655 \text{ см}^{-1}$ и 1450 см^{-1} может быть использовано для распознавания здоровых и раковых тканей, включая ткани мозга, груди и женской половой системы. Для некоторых тканей характерной является полоса амида II на $\lambda = 1260 \text{ см}^{-1}$. Сильный вклад ДНК в спектры КР для раковых тканей по сравнению со здоровыми также может служить индикатором патологии. С другой стороны, ткани с большим содержанием жира (грудь и внутренние органы) имеют идентичные пики, обусловленные липидами.

Таблица 8.4. Колебательные полосы, наблюдаемые для тканей мозга в норме и для различных опухолей мозга [63]

| Серое и белое вещество | Глиома III | Невринома | Нейроцитома | Тип колебаний | Вещество |
|------------------------|----------------|--------------|--------------|---|---|
| 852 875 883 | 856 930 | 956 | 960 | | Полисахариды Каротиноиды |
| 1003 1065 | 1006 1068 | 1003 | 1003 1068 | Дышащие Валентные C–O, C–O–C | Гидроксиапатит Фенилаланин Фосфолипид |
| 1080 1126 | 1130 | 1157 | 1272 | Валентные C–C, PO_2^- Валентные C–C | Фосфолипид Фосфолипид Каротиноиды |
| 1269 1300 | 1245 1304 | 1265 1296 | 1272 1315 | Амид III Амид III Крутильные и веерные CH_2 | Белки (хаотич.) Белки (α -спираль) Фосфолипид |
| 1439 | 1446 | 1439 1524 | 1446 | Деформационные CH_2 | Липиды и белки Каротиноиды |
| 1659 2850 | 1659 | 1659 | 1659 | Амид I Валентные CH_2 | Амид (белки) Углеводородные фрагменты липидов |
| 2885 | | 2885 | | Валентные CH_2 | Углеводородные фрагменты липидов |
| 2931 | 2927 | 2930 | | Валентные CH_3 | Углеводородные фрагменты липидов |

КР-спектры здоровых, раковых и предраковых тканей содержат вклады от различных биологических молекул, эти вклады определяются не только типом молекулы

Таблица 8.5. Колебательные полосы, наблюдаемые для тканей груди в норме, для инфильтрирующей карциномы протоков (ИКП) и соответствующих биологических компонентов [63]

| Норма | Метил-олеат | Тип колебаний, вещество | ИКП | Коллаген, тип I | Тип колебаний, вещество |
|-------------------|-------------|---------------------------|-------------------------------|-----------------|--|
| 727 | 728 | Плоские =C–H | 817 | 814 | C–C валентные |
| 849 | 856 | | 856 | 855 | C–C валентные |
| 870 | 868 | | 876 | 874 | C–C валентные |
| 890 | 887 | | 920 | 920 | C–C валентные |
| 972 | 973 | | Неплоские деформационные =C–H | 937 | 934 |
| 1005 ¹ | | Каротиноиды | 1004 ³ | 1002 | Фенилаланин |
| 1066 | 1067 | Валентные C–C | 1043 | 1032 | Пролин |
| 1079 | 1082 | Валентные C–C | 1125 | 1127 | |
| 1119 | 1118 | Валентные C–C | 11571 | | Каротиноиды |
| 1157 ¹ | | Каротиноиды | 1167 | 1166 | |
| 1190 ¹ | | Каротиноиды | 1190 ¹ | | Каротиноиды |
| | | | 1206 | 1206 | Оксипролин, тирозин |
| | | | 1247 | 1247 | Амид III |
| 1265 | 1268 | Плоские =C–H | 1267 | 1269 | Амид III |
| 1303 | 1304 | | Крутильные CH ₂ | 1303 | 1319 |
| | | | | 1343 | 1343 |
| 1370 ² | | Миоглобин | 1358 ² | | Миоглобин |
| 1439 | 1442 | CH ₂ ножничные | 1450 | 1451 | CH ₃ , CH ₂ деформационные |
| 1523 ¹ | | Каротиноиды | 1525 ¹ | | Каротиноиды |
| | | | | 1554 | 1554 |
| 1654 | 1655 | Валентные C=C | 1657 | 1665 | Амид I |
| 1743 | 1743 | Валентные C=O | | | |

¹ Эти полосы каротиноидов наблюдаются только при видимом возбуждении.

² Эта полоса миоглобина наблюдается только при видимом возбуждении.

³ Эта полоса относится к коллагену при ИК-возбуждении и к каротиноидам при видимом возбуждении.

(белки, липиды, ДНК и пр.), но и характером окружения и взаимодействия молекул между собой. Именно из-за значительной вариабельности окружения молекул — индикаторов патологии в объемных тканях — возникают трудности в идентификации специфических конформационных изменений молекул, связанных с возникновением патологии. Эти трудности могут быть преодолены за счет получения новой информации о биохимических процессах, происходящих в здоровых и патологических биотканях, полученной, в том числе, другими независимыми методами. Тем не менее, уже сейчас требуются широкие клинические исследования, продвижение в этом направлении обусловлено не только результатами фундаментальных биохимических и спектроскопических исследований, но и наличием простой и доступной экспериментальной базы. В связи с развитием и доступностью новых типов мощных полупроводниковых лазеров, спектрографов изображения, высокочувствительных и быстродействующих ПЗС- и КМОП-камер оказывается возможным построить

Таблица 8.6. Колебательные полосы, наблюдаемые для опухолевых тканей женской половой системы [63] (Д — доброкачественные, З — злокачественные)

| Шейка матки | | Матка | | Эндометрий | | Яичник | | Тип колебаний | Вещество |
|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---|---|
| Д | З | Д | З | Д | З | Д | З | | |
| 850 | 827 | 850 | 850 | 819 | 819 | 850 | 781 | Неплоские С-Н Пролиновые | Кровь, тирозин Коллаген, эластин |
| 934 | | 934 | 934 | | | | | | |
| 1002 | 1002 | 1002 | 1002 | 1002 | 1002 | 1002 | | Неплоские С-Н | Кровь |
| | | | 1240 | | | | 1056 | | Липид |
| 1262 | 1270 | 1262 | 1262 | 1262 | 1262 | 1262 | 1240 | Амид III | Эластин Коллаген, эластин |
| | 1300 | | 1315 | 1300 | 1300 | 1308 | | Изгибные С-Н | Липид |
| | 1330 | | 1330 | | | | 1330 | | |
| 1445 | 1445 | 1453 | 1445 | 1445 | 1450 | 1445 | 1453 | Изгибные СН ₂ -СН ₃ | Триптофан Липид |
| 1659 | 1657 | 1659 | 1659 | 1656 | 1655 | 1659 | 1651 | Амид I | Коллаген, эластин |
| $I_{1659} > I_{1445}$ | $I_{1659} < I_{1445}$ | $I_{1659} > I_{1453}$ | $I_{1659} < I_{1445}$ | $I_{1659} > I_{1445}$ | $I_{1659} > I_{1450}$ | $I_{1659} < I_{1445}$ | $I_{1659} > I_{1443}$ | | |

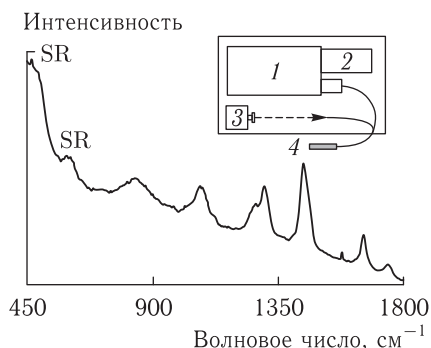


Рис. 8.21. КР-спектр здоровой ткани молочной железы, снятый с помощью портативного спектрометра на полупроводниковом лазере (782 нм) с волоконно-оптическим пробником. Измерения с полосой разрешения спектрометра $6,7 \text{ см}^{-1}$, мощность излучения возбуждения 7 мВт, время интегрирования 60 с. Полосы, отмеченные как SR, соответствуют КР-полосам кремния волоконно-оптического пробника: 1 — спектрометр; 2 — ПЗС-камера; 3 — лазер; 4 — ВО-пробник [1255]

компактный спектрометр ИК КР-микропробы с регистрацией спектров за достаточно короткое время. Один из прототипов такого прибора показан на рис. 8.21 [1255]. Современные технологии КР-микроскопии для применений в клинической медицине и микробиологии представлены в специальных выпусках журнала *J. Biophotonics* [1422, 1423].

КР-технология с возбуждением в ближнем ИК-диапазоне стала настолько доступной и совершенной, что начались интенсивные исследования и разработки по неинвазивному мониторингу содержания глюкозы в коже с целью создания глюкометра — прибора широкого медицинского применения [352]. Метод резонансного КР нашел свое применение в дерматологии для мониторинга антиоксидантов в коже в ее нормальном состоянии и при различных воздействиях на кожу, включая инфракрасное излучение и косметические препараты [343, 345, 349].

8.5. Эмиссионная спектроскопия лазерной микропробы и метод LAMMA

Эмиссионная спектроскопия лазерной микропробы относится к методам лазерной аналитической спектроскопии, использующим эффекты лазерного фотовозбуждения и фотоионизации предварительно подготовленных проб биообъектов (локальное испарение или распыление лазерным, электронным или ионным пучками или другими средствами) [293, 982, 1223, 1424–1432]. Данные методы обладают высокой чувствительностью и позволяют получить количественную информацию о содержании различных элементов в биообъектах.

Биообъект предварительно тем или иным способом атомизируется или обеспечивается десорбция молекул с его поверхности. Наряду с лазерными используются и нелазерные способы атомизации и десорбции. После подготовки образца, используя различные методы однофотонной или многофотонной ионизации лазерным излучением, получают поток ионов, который анализируют разнообразными способами, включая масс-спектрометрию. Конечно, в конкретных исследованиях фазы подготовки объекта и ионизации его компонентов могут быть совмещены во времени и обеспечены одним и тем же лазером, однако такое совмещение приводит к снижению чувствительности. Схематически фотоионизационные методы показаны на энергетической диаграмме (см. рис. 6.1). Принципиальные схемы устройств атомно-фотоионизационной спектроскопии и лазерной масс-спектрометрии даны на рис. 6.2, *е, ж*.

В лазерном микроспектральном анализе для исследования вещества, переведенного с помощью лазера в газовую фазу, можно использовать любые подходящие методы спектроскопии. Наиболее часто применяют эмиссионную и абсорбционную спектроскопию и масс-спектрометрию.

В лазерном варианте эмиссионная спектроскопия, сохраняя все свои достоинства, связанные с высокой чувствительностью, приобретает принципиально новое свойство — возможность отбора микропроб. При отборе микропроб используется высокоинтенсивное импульсное излучение лазера, которое жестко фокусируется на объект. Вещество, выброшенное из области фокуса при испарении, обычно вводится в дуговой разряд, где происходит его довозбуждение (хотя и сама лазерная плазма может быть источником излучения для спектрального анализа). Эмиссионный спектр излучения исследуется разными способами в зависимости от решаемых задач. Например, в приборе LMA-10 используется дифракционный спектрограф с фотографической регистрацией спектра. Прибор обеспечивает минимальные размеры проб, $10 \cdot 10 \text{ мкм}^2$, при аналитической чувствительности, равной 10^{-11} – 10^{-13} г. В качестве лазерного источника применяется рубиновый лазер с модуляцией добротности.

Анализ спектра лазерной плазмы может быть проведен также с помощью оптических многоканальных спектральных анализаторов с фотоэлектрической регистрацией (ОМА). Важное достоинство таких схем регистрации заключается в мгновенной обработке данных одновременно по нескольким различным элементам.

В зависимости от решаемых задач микроанализ производят в различных условиях: в вакуумированной камере ($p \leq 10^{-3}$ Па), в атмосфере буферного газа ($p \approx 10^2$ – 10^4 Па), а также при облучении образцов на открытом воздухе. Разработанные и используемые на практике приборы для лазерного микроспектрального анализа обеспечивают высокую абсолютную и относительную чувствительности, селективность отбора микропроб, высокую избирательность по отношению к исследуемым элементам, возможность одновременного определения группы элементов, не требуют предварительной подготовки объектов (возможны измерения *in situ*) и пр.

Рассмотрим несколько примеров применения эмиссионной спектроскопии лазерной микропробы в медицине. Первый пример относится к применению промышленного прибора LMA-10 для анализа микроскопических металлических инородных тел, извлеченных из глаза пациента. Анализ элементного состава инородного тела

необходим для прогнозирования состояния глаза и соответствующей лекарственной терапии для устранения химических повреждений глаза (металлоз), особенно рецепторов сетчатки.

Имеются сообщения о применении микроанализа в гистохимии для определения содержания тяжелых металлов, в частности золота, в клетках тканей. Была также предпринята попытка сделать стандартные методики для определения Fe, Co, Ni, Cu и Zn в биоматериалах лазерно-эмиссионным методом.

Индукцированный лазером эмиссионный спектр атеросклеротической бляшки показан на рис. 8.22, он был зарегистрирован через 0,6 мкс после воздействия лазерного импульса от лазера на красителях, работающего на $\lambda = 690$ нм и имеющего длительность импульса, равную 0,8 мкс. Видна широкополосная подставка в полосе длин волн 350–500 нм, обусловленная тормозным излучением, и наложенные отчетливые эмиссионные линии. Для длин волн короче 400 нм эти линии обусловлены ионами кальция (Ca II), а для более длинных волн — эмиссией

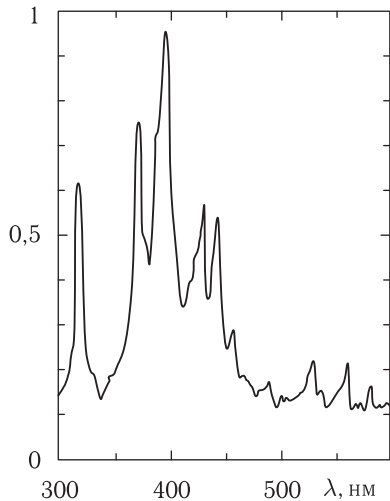


Рис. 8.22. Эмиссионный спектр атеросклеротической бляшки в обызвестленном состоянии при лазерной абляции на $\lambda = 690$ нм [46, с. 1783]

нейтрального кальция (Ca I). Характер спектра свидетельствует о возникновении плазмы при лазерной абляции биоткани и может служить в качестве контроля процесса абляции. Порог абляции заизвесткованной атеросклеротической бляшки по энергии лазерного импульса составляет примерно 100 мДж. Эмиссионный спектр регистрировался в любой момент времени после начала лазерного импульса с помощью дифракционного спектрометра и ОМА. К концу вызванного лазером свечения в области взаимодействия излучения с веществом широкополосная подставка в спектре уменьшалась по амплитуде, а эмиссионные линии становились более отчетливыми.

Совмещение лазерного испарения вещества с последующим абсорбционно-трансмиссионным анализом паров позволяет сочетать достоинства обеих методик, т. е. получать высокую степень локальности и значительную чувствительность [982]. Например, при работе со стандартными образцами, содержащими следовые концентрации Cd, Hg и Zn, оказалось возможным определять концентрации, меньшие чем 10 ppт, для диаметра кратера около 40 мкм, образованного лазерным импульсом (абсолютная чувствительность 0,1 пг вещества). Были проведены также исследования распределения содержания Cd в корковом веществе почки человека. Образцы ткани были приготовлены в виде тонких срезов толщиной 4 мкм. Калибровка осуществлялась по таким же срезам с известной концентрацией Cd. При измерениях диаметр лазерного кратера в образце составлял примерно 50 мкм. Измерения содержания Cd в различных функциональных областях коркового слоя почки человека дали такие значения: 45 ± 8 ppт (в области почечного клубочка), 80 ± 30 ppт (вблизи области прикрепления мочевых канальцев) и 60 ± 6 ppт (на периферии мочевых канальцев). Анализ после растворения в кислоте показал, что исследуемая почка содержит Cd на уровне 43 ppт во всем корковом веществе.

Фемтосекундные лазеры имеют свои особенности проведения микроспектрального анализа, которые связаны с генерацией гармоник лазерного излучения и рентгеновского излучения, что позволяет проводить дополнительную калибровку и получать новую информацию о составе вещества объекта [1432]. Спектральный анализ плазмы дентина зуба человека, создаваемой при взаимодействии сфокусированного излучения форстеритового лазера ($\lambda = 1250$ нм, $\tau_{\text{и}} \sim 110$ фс, $f_{\text{и}} \sim 10$ Гц, $E_{\text{макс}} \sim 400$ мкДж) с интенсивностью $I \sim 10^{13} - 5 \cdot 10^{15}$ Вт/см² вблизи поверхности образца, показал наличие спектральных линий следующих элементов C, O, Ca, Zn, Na, Cu (рис. 8.23). Генерация жесткого рентгеновского излучения с энергиями $E > 30$ кэВ наблюдалась при интенсивностях $I \sim 5 \cdot 10^{15}$ Вт/см² внутри абляционного кратера или канала. Скорость абляции при этом была 4 мкм на импульс, глубина канала достигала ~ 480 мкм в образце толщиной 1 мм.

Принцип масс-спектрометрии заключается в ионизации молекул исследуемого вещества, разделении ионов и анализе их по отношению массы к заряду m/z . Принципиальная схема масс-спектрометра показана на рис. 6.2, ж. Использование лазерной фотоионизации обеспечивает повышенную селективность анализа, высокий выход ионов (до 100 %) и возможность исследования короткоживущих продуктов [293]. Образование ионов под действием лазерного излучения происходит при интенсивностях в диапазоне $10 - 10^{11}$ Вт/см². Используются CO₂-, рубиновые, неодимовые, азотные, эксимерные лазеры, лазеры на красителях и другие высокоинтенсивные лазеры.

Масс-спектр представляет собой распределение массовых пиков по интенсивности и является характеристикой исследуемого биообъекта. Качество масс-спектрометрической системы определяется разрешающей способностью, $R_m = m/\Delta m$ (m — средняя масса ионов; Δm — минимальная разность масс ионов, регистрируемых отдельно), и светосилой (отношением количества ионов, дошедших до детектора, к общему числу ионов, образованных в источнике ионов) [1433]. Светосила в конеч-

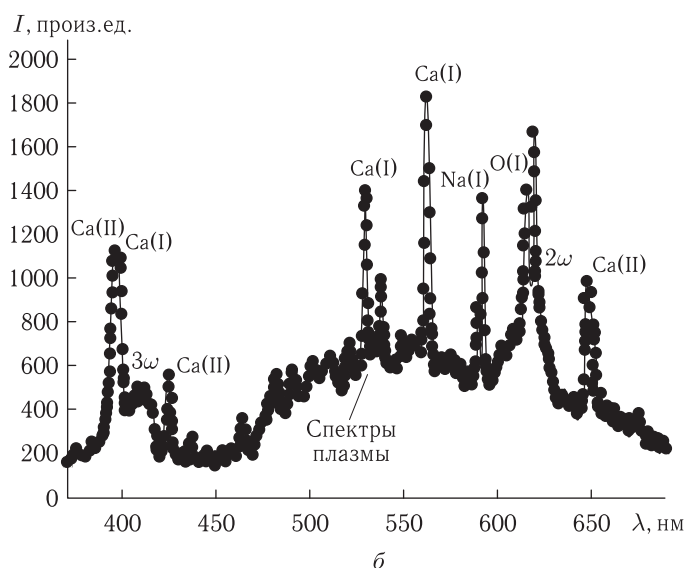
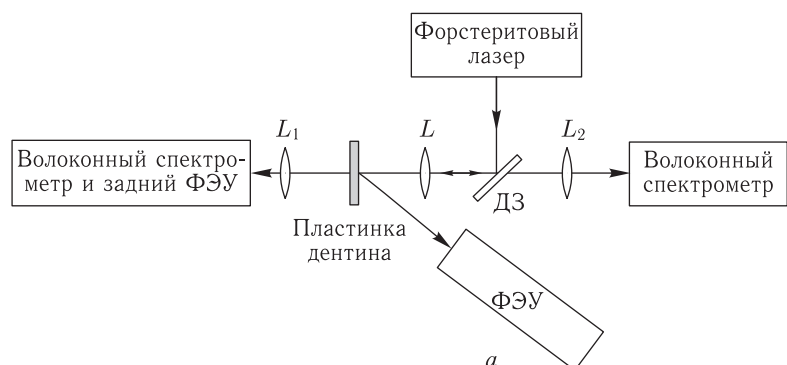


Рис. 8.23. Экспериментальная установка на основе ИК фемтосекундного форстеритового лазера ($\lambda = 1250$ нм, $\tau_i \sim 110$ фс, $f_i \sim 10$ Гц, $E_{\max} \sim 400$ мкДж) (а): ДЗ — дихроичное зеркало отражающее излучение лазера с длиной волны и пропускающее видимое излучение на спектрометр; ФЭУ — два фотоэлектронных умножителя с NaI сцинтиллятором для регистрации рентгеновского излучения с фронтальной и задней сторон образца; спектры обратно рассеянного излучения плазмы дентина при интенсивности возбуждения лазера $\sim 10^{15}$ Вт/см² от образца дентина толщиной 200 мкм; хорошо видны линии элементов, а также сигналы второй (2ω) и третьей (3ω) гармоник излучения лазера (б) [1432]

ном итоге определяет абсолютную и концентрационную чувствительности (пределы обнаружения) прибора. Абсолютный предел обнаружения — это количество вещества в граммах, которое необходимо, чтобы зарегистрировать один из элементов данного вещества. Концентрационная чувствительность представляет собой минимальную относительную концентрацию регистрируемого примесного элемента.

В лазерной масс-спектрометрии наиболее широкое применение нашли времяпролетные системы с селекцией ионов в секторных электрических или магнитных полях, статические системы с двойной фокусировкой и динамические масс-спектрометры типа «масс-рефлектор» [293, 1433].

Лазерная масс-спектрометрия используется для детектирования атомарных и молекулярных кластеров, примесных молекул и радикалов в газах, с ее помощью исследуются различные соединения, важные для биологии, медицины, фармакологии. Например, близкая к 100% эффективность двухступенчатой фотоионизации молекул нафталина излучением КгF-лазера (248 нм) позволяет детектировать одиночные молекулы в объеме облучения за один лазерный импульс [293]. В результате чувствительность анализа соответствует регистрации молекул нафталина при их парциальном давлении на уровне 10^{-12} Па или относительной концентрации в воздухе, равной 10^{-9} .

Существенным недостатком масс-спектрометрии является необходимость проведения анализа при низких давлениях ($\leq 10^{-3}$ Па), что при очень малых концентрациях примеси (порядка 10^{-9}) в пробе может привести вообще к отсутствию детектируемых частиц в объеме фотоионизации [293].

Достоинства лазерной масс-спектрометрии проявляются при изучении труднолетучих и неустойчивых к нагреванию органических и биоорганических молекул, которые трудно перевести в газовую фазу. В таком случае объект в виде твердого образца или молекул, адсорбированных на поверхности подложки, размещают непосредственно в ионизационной камере масс-спектрометра. Под действием переднего фронта УФ-лазерного импульса происходит десорбция молекул и далее их двухступенчатая резонансная фотоионизация. Число образовавшихся ионов определяется соотношением [293]

$$N_{\text{и}} = N_0 \cdot P_{\text{дес}} \eta_{\text{ф}},$$

где N_0 — число облучаемых молекул; $P_{\text{дес}}$ — вероятность десорбции; $\eta_{\text{ф}}$ — выход многофотонной ионизации. Вероятность десорбции определяется температурой нагрева поверхности, которая при постоянном потоке лазерного излучения пропорциональна коэффициенту поглощения вещества. Поэтому селективность в данном случае определяется не только процессом ступенчатой фотоионизации, но и зависимостью $P_{\text{дес}}(\lambda)$.

Масс-спектры, полученные при облучении молекулярных кристаллов аденина излучением КгF-лазера (249 нм), показывают отсутствие фрагментации аденина [293]. Дополнительно были обнаружены лишь примеси щелочных металлов Na^+ и K^+ и слабый пик кластера аденин-катион натрия. Отсутствие или малая степень фрагментации молекул объясняется очень малым нагревом образца (100°C для аденина), так как используются малые уровни плотности энергии лазерного излучения ($\sim 10^{-3}$ Дж/см²), вполне достаточные для десорбции необходимого количества молекул, которые практически без потерь преобразуются в ионы. В [293] представлены также масс-спектры молекулярных кристаллов антрацена, гуанина, тимина, урацила, цитозина и трипептида.

Оптимизация рассматриваемого процесса возможна при разделении функций по десорбции и фотоионизации молекул между двумя лазерами. Поскольку процесс десорбции носит тепловой характер, то на первом этапе используют излучение ИК-лазеров, а на втором, как обычно, — излучение УФ-лазеров [293]. Таким способом осуществлялось детектирование молекул нафталина и антрацена, адсорбированных на поверхности графита. Использовались CO_2 (10,6 мкм) и КгF (249 нм) лазеры. Чувствительность регистрации молекул нафталина на поверхности оказалась равной 10^6 молекул/см² (поверхностная концентрация) или около 10^{-8} молекулярного слоя. При оптимизации процессов десорбции и фотоионизации возможно достижение чувствительности на уровне 10^{-10} монослоя.

В ряде случаев селективность масс-спектрометрического анализа оказывается вполне достаточной, поэтому можно отказаться от второй ступени и использовать

лишь те ионы, которые образуются под действием излучения ИК-лазера (CO_2 -или Nd-лазеров), благодаря нагреву образца и подложки. При этом образуются молекулярные либо квазимолекулярные ионы за счет или реакции присоединения десорбированных катиона щелочного металла и молекулы, или термодесорбции катионов молекул с поверхности образца, или диссоциативной ионизации кластеров на горячей поверхности. Ионы наблюдаются как при импульсном (10^6 Вт/см^2), так и при непрерывном облучении (10 Вт/см^2). Нагрев образцов превышает $700\text{--}800^\circ\text{C}$. В работе [293] представлены результаты обширных исследований по масс-спектрометрии, выполненные таким способом для различных классов органических биологически активных нелетучих соединений: олигосахаридов, гликозидов, нуклеотидов, аминокислот, олигопептидов и др. Для уверенной записи масс-спектра достаточно было, например, образца сахарозы весом 5 нг. Масс-спектры полученных квазимолекулярных ионов несут информацию о массе молекул. Присутствующие в масс-спектрах некоторые специфические ионы дают информацию о строении молекул исследуемого вещества. Степень фрагментации для разных классов соединений — умеренная или даже незначительная. Лучшие результаты получаются при облучении излучением импульсного CO_2 -лазера.

Разрешение на микронном и субмикронном уровне обеспечивает лазерная микроаналитическая масс-спектрометрия или метод LAMMA (Laser microprobe mass analysis — масс-спектроскопический анализ лазерной микропробы) [293, 1433]. Этот метод и соответствующая аппаратура разрабатывались специально для элементного анализа в биообъектах. Метод LAMMA позволяет исследовать содержание любого элемента периодической таблицы в биологических веществах. Он не требует эталонов и позволяет проводить одновременный анализ многих элементов. Объекты исследования самые разнообразные: лекарственные препараты; сухая цельная кровь и ее компоненты (сыворотка, плазма, эритроциты); сетчатка глаза; ткани печени, мышц и другие ткани органов животных; почечные камни; кормовые дрожжи и др. [293, 1433, 1434]. Пространственное разрешение достигает $0,5\text{--}1,0 \text{ мкм}$, абсолютный предел обнаружения многих элементов — 10^{-19} г , а концентрационный предел обнаружения — $10^{-4}\text{--}10^{-5} \%$. Расход количества вещества при анализе составляет всего 1 пг и даже меньше. Метод позволяет проводить анализ на клеточном и суб-

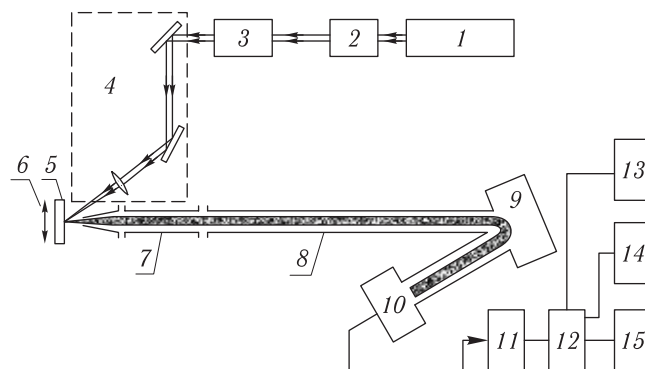


Рис. 8.24. Схема лазерного микроаналитического масс-анализатора LAMMA-1000: 1 — лазер; 2 — преобразователь частоты излучения; 3 — телескоп; 4 — система фокусировки лазерного излучения; 5 — биообъект; 6 — система перемещения образца; 7 — ионная линза; 8 — пролетная труба; 9 — отражатель ионов — рефлектрон; 10 — вторично-электронный умножитель; 11 — широкополосный усилитель; 12 — детектор; 13 — дисплей; 14 — самописец; 15 — печатающее устройство

клеточном уровнях разрешения, на одиночных бактериях и частичках пыли. Кроме элементного анализа LAMMA-метод оказался полезным при изучении масс-спектров многих классов органических и биоорганических соединений: углеводов (олигосахаридов, глюкозидов и др.), органических кислот (аскорбиновой, барбиталовой и др.), аминокислот и микропептидов (глицина, аланина, валина, лейцина, изолейцина, тирозина и фенилаланина), органических солей, ароматических соединений (антрацена, фенантрена, дибензотиофена, дибензофурана, карбазола, трифенила фосфора), металлоорганических комплексов, соединений с большим молекулярным весом (кобаламинов, гликозидадигитонина и синтетического липида при добавлении в образец хлоридов натрия, калия и цезия) [293].

Метод LAMMA реализован в разнообразных промышленных лазерных масс-спектрометрах типа LAMMA-500, LAMMA-1000 (Германия), LIMA (Англия), ЭМАЛ, ЭМАЛ-2 (Россия) [293, 1433]. В биологии наиболее широкое применение получил прибор LAMMA-500. В нем используется гранатовый лазер с модуляцией добротности ($\tau_n \approx 15$ нс) и преобразованием частоты вплоть до 4-й гармоники ($\lambda = 264$ нм). Жесткая фокусировка с помощью оптической системы с иммерсией позволяет получить диаметр пучка на объекте, равный 0,5 мкм. В одной из последних

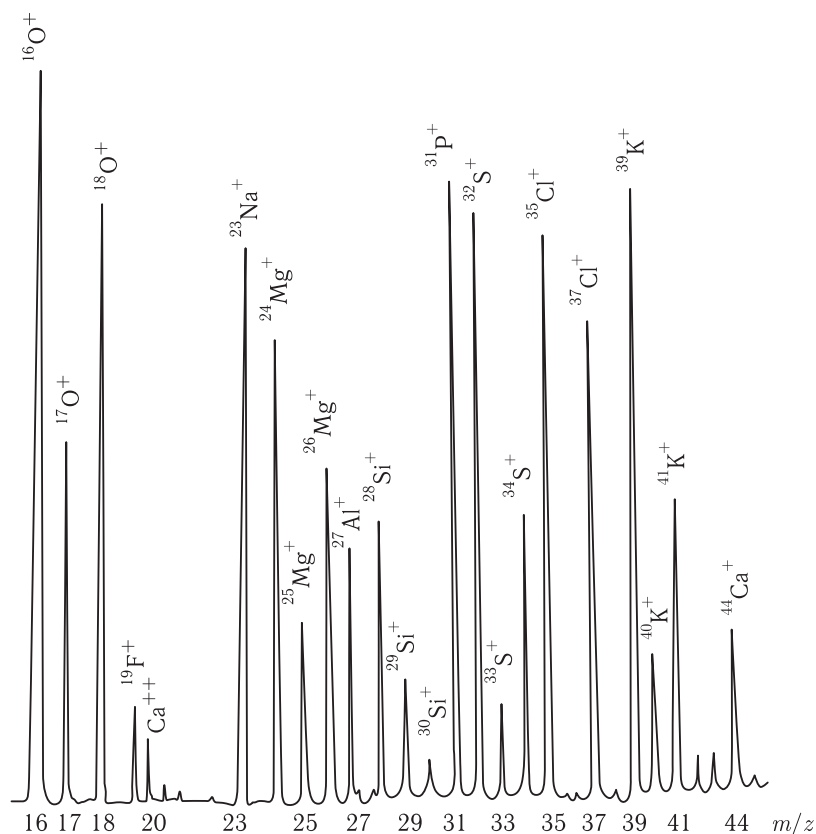


Рис. 8.25. Фрагмент масс-спектра ткани печени (белые лабораторные крысы), полученного с помощью прибора ЭМАЛ-2 [1434]. По оси абсцисс отложены массовые числа ионов (отношение массы к заряду), по оси ординат — относительная интенсивность (масштаб логарифмический)

модификаций прибора масс-спектрометр выполнен по схеме масс-рефлектрона, его разрешение по массам ионов $m/\Delta m = 200$ или от 800 до 1000 (в зависимости от модификации) [293, 1433]. Масса анализируемого вещества равна 10^{-13} г, абсолютный предел обнаружения — 10^{-18} – 10^{-20} г, концентрационный — 10^{-2} – 10^{-3} %. Главным недостатком прибора является необходимость подготовки исследуемых образцов в виде тонких полупрозрачных срезов толщиной 0,3–1,0 мкм, поскольку лазерное излучение «простреливает» объект. Данный недостаток устранен в приборе ЛАММА-1000 (рис. 8.24).

В основу лазерного энерго-масс-анализатора ЭМАЛ положена схема времяпролетного масс-спектрометра с электростатическим анализатором ионов [1433]. Массовое разрешение прибора $m/\Delta m \approx 150$, концентрационный предел обнаружения примесей — $5 \cdot 10^{-4}$ %. За счет применения масс-спектрометров с двойной фокусировкой ионов удастся достигнуть высокого массового разрешения ($m/\Delta m = 2000$ – 4000), абсолютный предел обнаружения таких систем составляет 10^{-11} – 10^{-12} г, а концентрационный — 10^{-6} – 10^{-7} %. На этом принципе работает прибор ЭМАЛ-2. Рабочее значение массового разрешения прибора $m/\Delta m = 2500$, диапазон регистрируемых масс — 1–500, расход пробы — на уровне 0,1–1,0 мг. Используется гранатовый лазер ($\lambda = 1060$ нм) в режиме модуляции добротности с длительностью импульсов около 10 нс и частотой повторения, равной 25 Гц. Плотность мощности на объекте составляет $5 \cdot 10^8$ – $2 \cdot 10^{10}$ Вт/см². Вакуум в камере источников ионов поддерживается на уровне 10^{-5} – 10^{-6} Па. Прибор позволяет проводить локальный анализ в заданной точке с разрешением в интервале 50–100 мкм с интегрированием по глубине или в полосе сканирования, обеспечивается также послойный локально-строчный анализ на глубину 2–500 мкм. Производится одновременный анализ всего состава по всем элементам периодической системы. Погрешность микроанализа без применения эталонов составляет 30 %, концентрационная чувствительность — 10^{-7} %, абсолютная — 10^{-12} г. Коэффициент относительной чувствительности, характеризуемый отношением измеренной концентрации элемента к истинной, для медико-биологических проб близок к единице в пределах 20 % погрешности при плотности лазерного излучения $5 \cdot 10^8$ – 10^9 Вт/см². Фрагмент масс-спектра ткани печени белой лабораторной крысы, полученного с помощью прибора ЭМАЛ-2, показан на рис. 8.25 [1434].

Библиографический список

1. Medical Optical Tomography: Functional Imaging and Monitoring / Ed. by Müller G., Chance B., Alfano R., et al. Bellingham, SPIE Press, 1993. V. IS11.
2. Laser-Induced Interstitial Thermotherapy / Ed. by Müller G., Roggan A. Bellingham, SPIE Press, 1995.
3. Selected Papers on Tissue Optics: Applications in Medical Diagnostics and Therapy / Ed. by Tuchin V. V. Bellingham, SPIE Press, 1994. V. MS102.
4. *Посудин Ю.И.* Лазерная фотобиология. Киев: Вища школа, 1989.
5. *Приезжев А.В., Тучин В.В., Шубочкин Л.П.* Лазерная диагностика в биологии и медицине. М.: Наука, 1989.
6. VI Biennial meeting of the International Photodynamic Association / Ed. by Bown S., Buonaccorsi G. // *Lasers Med. Sci.* 1997. V. 12, № 3. P. 180–284.
7. *Katzir A.* Lasers and Optical Fibers in Medicine. San Diego, et al., Academic Press, Inc., 1993.
8. *Посудин Ю.И.* Лазерная микрофлуориметрия биологических объектов. Киев: Вища школа, 1985.
9. *Tuchin V. V.* Lasers and fiber optics in biomedicine // *Laser Physics.* 1993. V. 3, №№ 3, 4. P. 767–820; 925–950.
10. *Tuchin V. V.* Lasers light scattering in biomedical diagnostics and therapy // *J. Laser Appl.* 1993. V. 5, № 2, 3. P. 43–60.
11. *Тучин В.В.* Лазеры и волоконные световоды в биомедицинских исследованиях. Саратов: Изд-во Саратовск. универ-та, 1998.
12. *Tuchin V. V.* Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis, SPIE Tutorial Texts in Optical Engineering. Bellingham, SPIE Press, 2000. V. TT38; 2nd edition. Bellingham, WA, SPIE Press, 2007. V. PM 166.
13. Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1, 2 / Под ред. Тучина В.В. Пер. с англ. М.: Физматлит, 2007; Handbook on Optical Biomedical Diagnostics. V. PM107 / Ed. by Tuchin V. V. Bellingham, SPIE Press, 2002.
14. Lasers in Medicine / Ed. by Vij D. R. and Mahesh K. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers, 2002.
15. Confocal and Two-Photon Microscopy: Foundations, Applications, and Advances / Ed. by Diaspro A. N. Y.: Wiley-Liss, 2002.
16. Handbook of Optical Coherence Tomography / Ed. by Bouma B. E., Tearney G. J. N. Y.: Marcel-Dekker, 2002.
17. Applied Laser Medicine / Ed. by Berlien H.-P., Müller G. J. Berlin: Springer-Verlag, 2003.
18. Biomedical Photonics Handbook / Ed. by Vo-Dinh T. Boca Raton: CRC Press, 2003.
19. Coherent-Domain Optical Methods for Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science / Ed. by Tuchin V. V. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers. V. 1 & 2, 2004.
20. Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy / Ed. by Masters B. R., So P. T. C. N. Y.: Oxford University Press, 2008.
21. *Гладкова Н.Д.* Оптическая когерентная томография в ряду методов медицинской визуализации. Н. Новгород: Институт прикладной физики РАН, 2005.
22. *Tuchin V. V.* Optical Clearing of Tissues and Blood. V. PM 154. Bellingham, WA: SPIE Press, 2006.
23. Advances in Biophotonics, NATO Science Series I. Life and Behavioural Sciences, vol. 369 / Ed. by Wilson B., Tuchin V., Tanev S. Amsterdam: IOS Press, 2005.

24. Лопатин В.Н., Приезжев А.В., Анонасенко А.Д., Шепелевич Н.В., Пожиленкова П.В., Простакова И.В. Методы светорассеяния в анализе дисперсных биологических сред. М.: Физматлит, 2006.
25. Лазерная инженерия хрящей / Под ред. Баграташвили В.Н., Соболя Э.Н., Шехтера А.Б. М.: Физматлит, 2006.
26. Жорина Л.В., Змиевской Г.Н. Основы взаимодействия физических полей с биологическими объектами. М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э.Баумана, 2006.
27. Tuchin V. V., Wang L., Zimnyakov D. A. Optical Polarization in Biomedical Applications. Berlin, Heidelberg, N. Y.: Springer-Verlag, 2006.
28. Photonics in Dentistry. Series of Biomaterials and Bioengineering / Ed. by Kishen A., Asundi A. London: Imperial College Press, 2006.
29. Руководство по оптической когерентной томографии / Под ред. Гладковой Н. Д., Шаховой Н. М., Сергеева А. М. М.: Физматлит, Медицинская книга, 2007.
30. Splinter R., Hooper B. A. An Introduction to Biomedical Optics. N. Y., London: Taylor and Francis Publishers, 2007.
31. Тучин В.В. Оптика биологических тканей: методы рассеяния света в медицинской диагностике / Пер. с англ. М.: Физматлит, 2011; Tuchin V. V. Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis. Second edition. Bellingham, WA: SPIE Press, 2007. V. PM 166.
32. Wang L. V., Wu H.-I. Biomedical Optics: Principles and Imaging. Hoboken, N. J.: Wiley-Interscience, 2007.
33. Optical Coherence Tomography: Technology and Applications / Ed. by Drexler W., Fujimoto J. G. Berlin: Springer, 2008.
34. Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues / Ed. by Tuchin V. V. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009.
35. Tuchin V. V. Dictionary of Biomedical Optics and Biophotonics. Bellingham, WA: SPIE Press, 2010.
36. Light Based Systems for Cosmetic Application / Ed. by Ahluwalia G. Norwich: William Andrew, 2009.
37. Prasad P. Introduction to Biophotonics. Hoboken, N. J.: Wiley-Interscience, 2003.
38. Optical Waveguide Sensing and Imaging, NATO SPS Series B: Physics and Biophysics / Ed. by Bock W., Gannot I., and Tanev S. Dordrecht: Springer, 2008.
39. Light-Based Therapies for Skin of Color / Ed. by Baron E. N. Y.: Springer, 2009.
40. Tuchin V. V. Optical spectroscopy of biological materials, Chapter 16, in Encyclopedia of Applied Spectroscopy / Ed. by Andrews D. L. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2009.
41. Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by Tuchin V. V. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010.
42. Sliney D. H., Trokel S. L. Medical Lasers and their Safe Use. N. Y. et al.: Academic Press, Inc., 1993.
43. Optical Properties of Mammalian Tissue / Ed. by Preuss L. E., Profio A. E. // Appl. Opt. 1989. V. 28, № 12. P. 2207–2357.
44. Photon Migration in Tissue and Biomedical Applications of Lasers / Ed. by Motamedi M. // Appl. Opt. 1993. V. 32. P. 367–434.
45. Diffusing Photons in Turbid Media / Ed. by Yodh A., Tromberg B., Sevick-Muraca E., Pine D. // Appl. Opt. 1997. V. 36. P. 9–231.
46. Lasers in Biology and Medicine // IEEE J. Quantum Electr. 1984. V. 20, № 12. P. 1342–1532; 1987. V. 23, № 10. P. 1701–1855; 1990. V. 26, № 12. P. 2146–2308.
47. Coherence Domain Optical Methods in Biomedical Science and Clinical Applications II, III / Ed. by Tuchin V. V., Izatt J. A. Proc SPIE, 1998. V. 3251; 1999. V. 3598.
48. Optical Engineering in Ophthalmology / Ed. by Jutamulia S., Asakura T. // Opt. Eng. 1995. V. 34, № 3. P. 640–707.
49. Special Section on Biomedical Optics / Ed. by Katzir A. // Opt. Eng. 1992. V. 31, № 7. P. 1399–1486; 1993. V. 32. № 2. P. 216–367.

50. Девятков Н. Д., Зубкова С. М., Лапрун И. Б., Макеева Н. С. Физико-химические механизмы биологического действия лазерного излучения // Успехи совр. биол. 1987. Т. 103, № 1. С. 31–43.
51. Photodynamic Therapy / Ed. by Dougherty T. J. // J. Clin. Laser Med. Surg. 1996. V. 14. P. 219–348.
52. Тучин В. В., Шубочкин Л. П. Применение лазеров в офтальмологии. М.: ЦНИИ «Электроника», 1984. Ч. 1; 1985. Ч. 2.
53. Letokhov V. S. Laser biology and medicine // Nature. 1985. V. 316, № 6026. P. 325–328.
54. Brunetaud J. M., Maunoury V., Cochelard D. Lasers in digestive endoscopy // J. Biomed. Opt. 1997. V. 2, № 1. P. 42–52.
55. Камалов В. Ф., Степанова Н. В., Черняева Е. Б., Чикишев А. Ю. Избирательное воздействие лазерного излучения на раковые клетки и лазерная спектроскопия клетки // Квант. электрон. 1985. Т. 12, № 10. С. 1997–2023.
56. Черницкий Е. А., Воробей А. В. Сенсibiliзируемые повреждения клеток // Успехи совр. биол. 1986. Т. 101, № 1. С. 100–114.
57. Тучин В. В. Исследование биотканей методами светорассеяния // Успехи физ. наук. 1997. Т. 167, № 5. С. 517–539.
58. Жаров В. П., Летохов В. С. Лазерная оптико-акустическая спектроскопия. М.: Наука, 1984.
59. Прохорончуков А. А., Жигина Н. А. Лазеры в стоматологии. М.: Медицина, 1986.
60. Geschwind H. J. Recent developments in laser cardiac surgery // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1, № 1. P. 28–30.
61. Verdaasdonk R. M., Borst C. Ray tracing of optically modified fiber tips 1: Spherical probes; 2: Laser scalpels // Appl. Opt. 1991. V. 30. P. 2172–2177.
62. Dosimetry of Laser Radiation in Medicine and Biology / Ed. by Мьллер G. J., Sliney D. H. // Bellingham, WA, SPIE Inst. Advanced Opt. Techn., 1989. V. IS5.
63. Mahadevan-Jansen A., Richards-Kortum R. Raman spectroscopy for detection of cancers and precancers // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1, № 1. P. 31–70.
64. Das B. B., Liu F., Alfano R. R. Time-resolved fluorescence and photon migration studies in biomedical and random media // Rep. Prog. Phys. 1997. V. 60. P. 227–292.
65. Optical Methods of Biomedical Diagnostics and Therapy / Ed. by Tuchin V. V. Bellingham, WA, SPIE, 1992. V. 1981.
66. Cell and Biotissue Optics: Applications in Laser Diagnostics and Therapy / Ed. by Tuchin V. V. Bellingham, WA, SPIE, 1994. V. 2100.
67. Конев С. В., Волотовский И. Д. Фотобиология. Минск, Изд-во Белорус. ун-та, 1974.
68. Selected Papers on Photodynamic Therapy / Ed. by Kessel D. Bellingham, WA: SPIE, 1993. V. MS82.
69. Lasers in de geneeskunde / Ed. by van Gemert M. J. C., Boon T. A. Brussel, Samsom Stafleu Alphen aan den Rijn, 1987.
70. van Gemert M. J. C., Jacques S. L., Sterenborg H. J. C. M., Star W. M. Skin optics / IEEE Trans. Biomed. Eng. 1989. V. 36, № 12. P. 1146–1154.
71. van Gemert M. J. C., Nelson J. S., Milner T. E. et al. Non-invasive determination of port wine stain anatomy and physiology for optimal laser treatment strategies // Phys. Med. Biol. 1997. V. 42. P. 937–949.
72. Sterenborg H. J. C. M., van Gemert M. J. C., Kamphorst W. et al. The spectral dependence of the optical properties of human brain // Lasers Med. Sci. 1989. V. 4. P. 221–227.
73. Cheong W.-F., Prahl S. A., Welch A. J. A review of the optical properties of biological tissues // IEEE J. Quantum Electr. V. 26, № 12. P. 2166–2185. Updated by Cheong W.-F., further additions by Wang L., Jacques S. L., August 6, 1993.
74. Jacques S. L. Monte Carlo modeling of light transport in tissues // Tissue Optics / Ed. by Welch A. J., van Gemert M. C. J. N. Y.: Academic, 1992.
75. Niemz H. Laser-Tissue Interactions. Fundamentals and Applications. Berlin et al., Springer-Verlag, 1996.

76. Johnston R. G., Singham S. B., Salzman G. C. Polarized light scattering // Comments on Molecular and Cellular Biophysics. Gordon and Breach Sci. Publ. Inc., 1988. V. 5, № 3. P. 171–192.
77. Time-Resolved Laser Spectroscopy in Biochemistry / Ed by Lakowicz J. R. Proc. SPIE, 1990. V. 1204. Pt. 1–2.
78. Coherence-Domain Methods in Biomedical Science and Clinical Applications / Ed. by Tuchin V. V., Podbielska H., Ovryn B. Proc. SPIE, 1997. V. 2981.
79. Kienle A., Lilge L., Patterson M. S. et al. Spatially resolved absolute diffuse reflectance measurements for non-invasive determination of the optical scattering and absorption coefficients of biological tissue // Appl. Opt. 1996. V. 35. P. 2304–2314.
80. Mourant J. R., Bigio I. J., Boyer J. et al. Elastic scattering spectroscopy as a diagnostic tool for differentiating pathologies in the gastrointestinal tract: preliminary testing // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1, № 2. P. 192–199.
81. Сидько Ф. Я., Лопатин В. Н., Парамонов Л. Е. Поляризационные характеристики взвесей биологических частиц. Новосибирск: Наука СО, 1990.
82. Лебедев А. Д., Левчук Ю. Н., Ломакин А. В., Носкин В. А. Лазерная корреляционная спектроскопия в биологии. Киев: Наукова думка, 1987.
83. Владимиров Ю. А., Потапенко А. Я. Физико-химические основы фотобиологических процессов: учебник для вузов. 2-е изд., перераб. и доп. М.: Дрофа, 2006.
84. Молекулярные механизмы биологического действия оптического излучения / Под ред. А. Б. Рубина. М.: Наука, 1988.
85. Лазеры в клинической медицине: руководство для практических врачей / Под ред. С. Д. Плетнева. М.: Медицина, 1996.
86. Крюк А. С., Мостовников В. А., Хохлов И. В., Сердюченко Н. С. Терапевтическое действие низкоинтенсивного лазерного света. Минск, Наука и техника, 1986.
87. Sterenborg H. J. C. M., Van der Leun J. C. Change in epidermal transmission due to UV-induced hyperplasia in hairless mice: a first approximation of the action spectrum // Photodermatology. 1988. V. 5. P. 71–82.
88. Clinical Near Infrared Spectroscopy/Imaging / Ed. by Ferrari M., Delpy D., Benaron D. A. // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1, № 4. P. 361–434; 1997. V. 2, № 1. P. 7–41.
89. Yoon G., Welch A. J., Motamedi M. et al. Development and application of three-dimensional light distribution model for laser irradiated tissue // IEEE J. Quantum Electr. 1987. V. 23, № 10. P. 1721–1733.
90. Anderson R. R., Parrish J. A. Optical properties of human skin // The Science of Photomedicine / Ed. by Regan J. D., Parrish J. A. N. Y.: Plenum Press, 1982. P. 147–194.
91. Chance B., Cope M., Gratton E., Ramanujam N., and Tromberg B. Phase measurement of light absorption and scatter in human tissue // Rev. Sci. Instrum. 1998. V. 69, № 10. P. 3457–3481.
92. Selected Papers on Optical Tomography, Fundamentals and Applications in Medicine / Ed. by Minet O., Müller G., Beuthan J. Bellingham, WA: SPIE Press, 1998. V. MS147.
93. Patterson M. S. Noninvasive measurement of tissue optical properties: current status and future prospects // Comments Mol. Cell. Biophys. 1995. V. 8. P. 387–417.
94. Bassani M., Martelli F., Zaccanti G., Contini D. Independence of the diffusion coefficient from absorption: experimental and numerical evidence. Opt. Lett. 1997. V. 22. P. 853–855.
95. Special section on medical near-infrared spectroscopy / Ed. by Okada K., Hamaoka T. J. Biomed. Opt. 1999. V. 4. P. 391–428.
96. Special issue honoring Professor Britton Chance / Ed. by Benaron D., Bigio I., Sevick-Muraca E., Yodh A. G. J. Biomed. Opt. 2000. V. 5. P. 115–248; P. 269–282.
97. Special issue on optical radiation technique in medicine and biology / Ed. by Moseley H. Phys. Med. Biol. 1997. V. 24. P. 759–996.
98. Rudolph W., Kempe M. Topical review: Trends in optical biomedical imaging / J. Modern Opt. 1997. V. 44, № 9. P. 1617–1642.
99. Roggan A., Friebel M., Dorschel K., Hahn A., Müller G. Optical properties of circulating human blood in the wavelength range 400–2500 nm / J. Biomed. Opt. 1999. V. 4, № 1. P. 36–46.

100. Nilsson A.M.K., Lucassen G.W., Verkruijse W., Andersson-Engels S., van Gemert M.J.C. Changes in optical properties of human whole blood *in vitro* due to slow heating / Photochem. Photobiology. 1997. V. 65, № 2. P. 366–373.
101. Special section on interferometry in biomedicine / Ed. by Podbielska H., Hitzengerger C.K., Tuchin V.V. J. Biomed. Opt. 1998. V. 3, № 1. P. 5–79; № 3. P. 225–266.
102. Special section on biomedical applications of vibrational spectroscopic imaging / Ed. by Morris M.D. J. Biomed. Opt. 1999. V. 4. P. 6–34.
103. Special section on optical diagnostics of biological fluids / Priezzhev A.V., Asakura T. J. Biomed. Opt. 1999. V. 4. P. 35–93.
104. Special section on coherence domain optical methods in biomedical science and clinics / Ed. by Tuchin V.V., Podbielska H., Hitzengerger C.K. J. Biomed. Opt. 1999. V. 4, № 1. P. 94–190.
105. Tuchin V.V. Coherent optical techniques for the analysis of tissue structure and dynamics // J. Biomed. Opt. 1999. V. 4, № 1. P. 106–124.
106. Schmitt J.M. Optical coherence tomography (OCT): a review // IEEE J. Select. Topics Quant. Electr. 1999. V. 5. P. 1205–1215.
107. Carden A., Morris M.D. Application of vibration spectroscopy to the study of mineralized tissues (review) // J. Biomed. Opt. 2000. V. 5. P. 259–268.
108. Hanlon E.D., Manoharan R., Koo T.-W., Shafer K.E., Motz J.T., Fitzmaurice M., Kramer J.R., Itzkan I., Dasari R.R., Feld M.S. Prospects for *in vivo* Raman spectroscopy // Phys. Med. Biol. 2000. V. 45. P. R1–R59.
109. McNichols R.J., Coté G.L. Optical glucose sensing in biological fluids: an overview // J. Biomed. Opt. 2000. V. 5. P. 5–16.
110. Biophotonics and Coherent Systems / Ed. by Belousov L., Popp F.-A., Voeikov V.L., van Wijk R.M.: Moscow Univ. Press, 2000.
111. Fujimoto J.G., Drexler W., Morgner U., Kartner F., Ippen E. Optical coherence tomography: High resolution imaging using echoes of light // Optics & Photonics News. 2000. January. P. 24–31.
112. Welzel J. Optical coherence tomography in dermatology: a review // Skin Res. Technol. 2001. V. 7. P. 1–9.
113. Sergeev A.M., Dolin L.S., Reitze D.H. Optical tomography of biotissues: past, present, and future // Optics & Photonics News. 2001. July. P. 28–35.
114. Briers J.D. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging // Physiol. Meas. 2001. V. 22. P. R35–R66.
115. Special issue on photon correlation and scattering / Ed. by Meyer W.V., Smart A.E., Brown R.G.W. Appl. Opt. 2001. V. 40, № 24. P. 3965–4242.
116. Coherence Domain Optical Methods in Biomedical Science and Clinical Applications IV–VIII / Ed. by Tuchin V.V., Izatt J.A., Fujimoto J.G. Proc. SPIE. 2000. V. 3915; 2001. V. 4251; 2002. V. 4619; 2003. V. 4956; 2004. V. 5316.
117. Coherence Domain Optical Methods and Optical Coherence Tomography in Biomedicine IX, X / Ed. by Tuchin V.V., Izatt J.A., Fujimoto J.G. Proc. SPIE. 2005. V. 5690; 2006. V. 6079; 2007. V. 6429; 2008. V. 6847; 2009. V. 7168.
118. Saratov Fall Meeting, Optical Technologies in Biophysics and Medicine / Ed. by Tuchin V.V., Zimnyakov D.A., Pravdin A.B. Proc. SPIE. 2000. V. 4001.
119. Saratov Fall Meeting, Optical Technologies in Biophysics and Medicine II–VII / Ed. by Tuchin V.V. Proc. SPIE. 2001. V. 4241; 2002. V. 4707; 2003. V. 5068; 2004. V. 5474; 2005. V. 5771; 2006. V. 6163; 2007. V. 6535.
120. Зимняков Д.А., Тучин В.В. Оптическая томография тканей (обзор) // Квантовая электроника. 2002. Т. 32, № 4. С. 849–867.
121. Zimnyakov D.A., Tuchin V.V. Optical medical tomography // Lasers in Medicine / Ed. by Vij D.R. and Mahesh K. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers, 2002. P. 147–194.
122. Special issue on biophotonics / Ed. by Chen W.R., Tuchin V.V., Luo Q., and Jacques S.L. J. X-Ray Sci. and Technol. 2002. V. 10, № 3–4. P. 139–243.

123. Special section on tissue polarimetry / Ed. by Wang L. V., Coté G. L., and Jacques S. L. J. *Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 3. P. 278–397.
124. Special issue on biophotonics / Ed. by French P., Ferguson A. I. J. *Phys. D: Appl. Phys.* 2003. V. 36, № 14. P. R207–R258; 1655–1757.
125. *Fercher A. F., Drexler W., Hitzenberger C. K., Lasser T.* Optical coherence tomography — principles and applications // *Rep. Progr. Phys.* 2003. V. 66. P. 239–303.
126. *Ophthalmic diagnostics* / Ed. by Ansari R. R., Sebag J. J. *Biomed. Opt.* 2004. V. 9, № 1. P. 8–179.
127. *Tuchin V. V.* Light-tissue interactions // *Biomedical Photonics Handbook* / Ed. by Vo-Dinh T. Boca Raton: CRC Press, 2003. P. 3-1–26.
128. *Zimnyakov D. A., Tuchin V. V.* Speckle correlometry // *Biomedical Photonics Handbook* / Ed. by Vo-Dinh T. Boca Raton: CRC Press, 2003. P. 14-1–23.
129. *Encyclopedia of Optical Engineering* / Ed. by Driggers R. G. N. Y.: Marcel-Dekker, 2003.
130. *Tuchin V. V.* Optical spectroscopy of tissue // *Encyclopedia of Optical Engineering* / Ed. by Driggers R. G. N. Y.: Marcel-Dekker, 2003. P. 1814–1829.
131. *Tuchin V. V.* Biomedical spectroscopy // *Encyclopedia of Optical Engineering* / Ed. by Driggers R. G. N. Y.: Marcel-Dekker, 2003. P. 166–182.
132. *Laser Applications in Medicine, Biology, and Environmental Science* / Ed. by Müller G., Tuchin V. V., Matvienko G. G., Werner C., Panchenko V. Ya. *Proc. SPIE.* 2003. V. 5149.
133. *Photonics and Imaging in Biology and Medicine* / Luo Q., Tuchin V. V., Gu M., Wang L. V. *Proc. SPIE.* 2003. V. 5254.
134. Utzinger U., Richards-Kortum R. Fiber-optic probes for biomedical optical spectroscopy // *J. Biomed. Opt.* 2003. V. 8. P. 121–147.
135. *Biomedical Optical Biopsy and Optical Imaging: Classic Reprints on CD-ROM Series* / Alfano R. R., Masters B. R. Washington, DC, Optical Society of America, 2004.
136. *Special Issue on Recent Developments in Biomedical Optics* / Ed. by Wang R. K., Hebden J. C., Tuchin V. V. *Phys. Med. Biol.* 2004. V. 49, № 7. P. 1083–1368.
137. *Advanced Laser Technologies: Biomedical Optics* / Ed. by Wang R. K., Hebden J. C., Priezzhev A. V., Tuchin V. V. *Proc. SPIE.* 2004. V. 5486.
138. *Complex Dynamics, Fluctuations, Chaos, and Fractals in Biomedical Photonics* / Ed. by Tuchin V. V. *Proc. SPIE.* 2004. V. 5330.
139. *Complex Dynamics and Fluctuation in Biomedical Photonics II–IV* / Ed. by Tuchin V. V. *Proc. SPIE.* 2005. V. 5696; 2006. V. 6085; 2007. V. 6436.
140. *Complex Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics V* / Ed. by Tuchin V. V., Wang L. *Proc. SPIE.* 2008. V. 6855.
141. *Dynamics and Fluctuations in Biomedical Photonics VI* / Ed. by Tuchin V. V., Wang L., Duncan D. D. *Proc. SPIE.* 2009. V. 7176.
142. *Andrzej Kowalczyk, Adolj F. Fercher, Valery V. Tuchin,* Medical Imaging, *Proc. SPIE.* 2005. V. 5959.
143. *Photonics and Imaging in Biology and Medicine* / Ed. by Xu K., Luo Q., Xing D., Priezzhev A. V., Tuchin V. V. *Proc. SPIE.* 2006. V. 6047. Part 1.
144. *Photonics and Imaging in Biology and Medicine* / Ed. by Ed. by Xu K., Luo Q., Xing D., Priezzhev A. V., Tuchin V. V. *Proc. SPIE.* 2006. V. 6047. Part 2.
145. *Tuchin V. V., Altshuler G. B.* Dental and oral tissue optics // *Photonics in Dentistry. Series of Biomaterials and Bioengineering* / Ed. by Kishen A., Asundi A. London: Imperial College Press, 2006. P. 245–300.
146. Спецвыпуск, посвященный использованию лазерных технологий в биофотонике и биомедицинских исследованиях / Под ред. Башкатова А. Н., Приезжева А. В., Тучина В. В. *Квант. электрон.* 2008. Т. 38, № 6. С. 503–611; № 7. С. 634–654.
147. *Biophotonics: Photonic Solutions for Better Health Care* / Ed. by Popp J., Drexler W., Tuchin V. V., Matthews D. L. *Proc. SPIE.* 2008. V. 6991.
148. *Altshuler G. B., Tuchin V. V.* Physics behind the light-based technology: Skin and hair follicle interactions with light // *Cosmetic Applications of Laser & Light-Based Systems* / Ed. by Ahluwalia G. A. Norwich, NY: William Andrew Inc., 2009. P. 49–109.

149. Special Section on Optical Clearing of Tissues and Cells / Ed. by Tuchin V. V., Wang R. K., Yeh A. T. J. *Biomed. Opt.* 2008. V. 13, № 2, 021101–024001.
150. Special Section on Nanophotonics for Diagnostics, Protection, and Treatment of Cancer and Inflammatory Diseases/ Ed. by Tuchin V. V., Drezek R., Nie S., Zharov V. P. J. *Biomed. Opt.* 2009. V. 14, № 2, 020901; 021001–021017.
151. Special Issue on Biophotonics / Ed. By Tanev S., Wilson B. C., Tuchin V. V., and Matthews D. *Adv. Opt. Technol.* 2008, doi: 10.1155/2008/134215, <http://www.hindawi.com/journals/aot/csi.html>
152. *Tuchin V. V.* A clear vision for laser diagnostics// *IEEE J. Select. Tops. Quant. Electr.* 2007. V. 13, № 6. P. 1621–1628.
153. *Tuchin V. V.* Optical immersion as a new tool to control optical properties of tissues and blood // *Laser Phys.* 2005. V. 15, № 8. P. 1109–1136.
154. *Tuchin V. V.* Optical clearing of tissue and blood using immersion method // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2005. V. 38. P. 2497–2518.
155. Special issue in honor of Professor Valery V. Tuchin's contribution to the field of biomedical optics / Ed. by Wang R. K., Priezzhev A. V., and Fantini S. J. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2005. V. 38. P. 2497–2747.
156. *Wang R. K. and Tuchin V. V.* Optical tissue clearing to enhance imaging performance for OCT, Chapter 28 // *Optical Coherence Tomography: Technology and Applications* / Ed. by Drexler W., Fujimoto J. G. Berlin: Springer, 2008. P. 855–886.
157. Спецвыпуск по оптике и спектроскопии в биомедицинских исследованиях / Под ред. Башкатова А. Н., Любимова В. В., Тучина В. В. *Опт. спектр.* 2009. Т. 107, № 6. С. 895–995.
158. Special issue on optical technologies in the study of tissues and biological fluids / Ed. by Genina E. A., Larin K. V., and Tuchin V. V. *J. Innov. Opt. Health Sci.* 2009. V. 2, № 3. P. 215–287.
159. Special issue on towards *in vivo* flow cytometry / Ed. by Tuchin V. V., Tárnok A., and Zharov V. P. J. *Biophotonics.* 2009. V. 2, № 8–9. P. 457–547.
160. Special issue on biophotonics for dermatology: science and applications / Ed. by Anderson R., Jacques S. L., Yaroslavsky A. N., and Tuchin V. V. *J. Biophotonics.* 2010. V. 3, № 1.
161. *Tissue optics* / Ed. by Welch A. J., van Gemert M. C. J. N. Y.: Academic, 1992.
162. *Rinneberg H.* Scattering of laser light in turbid media, optical tomography for medical diagnostics // *The Inverse Problem* / Ed. H. Lübbig. Berlin, Akademie Verlag, 1995. P. 107–141.
163. *Yodh A., Chance B.* Spectroscopy and imaging with diffusing light // *Physics Today.* 1995. March. P. 34–40.
164. *Schmitt J. M., Gandjbakhche A. H., Bonnar R. F.* Use of polarized light to discriminate short-photons in a multiply scattering medium // *Appl. Opt.* 1992. V. 31. P. 6535–6546.
165. *Bronk B. V., van de Merwe W. P., Stanley M.* *In vivo* measure of average bacterial cell size from a polarized light scattering function // *Cytometry.* 1992. V. 13. P. 155–162.
166. *Максимова И. Л., Тучин В. В., Шубочкин Л. П.* Распространение света в анизотропных биологических объектах // *Лазерные пучки.* Хабаровск: Изд-во Хабаровского политехн. ин-та, 1985. С. 91–96.
167. *Максимова И. Л., Тучин В. В., Шубочкин Л. П.* Поляризационные характеристики роговой оболочки глаза // *Опт. спектр.* 1986. Т. 60, № 4. С. 801–806.
168. *Максимова И. Л., Тучин В. В., Шубочкин Л. П.* Матрицы рассеяния света хрусталика глаза // *Опт. спектр.* 1988. Т. 65, № 3. С. 615–620.
169. *Приезжев А. В., Тучин В. В., Шубочкин Л. П.* Лазерная микродиагностика оптических тканей глаза и форменных элементов крови // *Изв. АН СССР. Сер. физическая.* 1989. Т. 53, № 8. С. 1490–1495.
170. *Королевич А. Н., Хайруллина А. Я., Шубочкин Л. П.* Матрица рассеяния монослоя оптически «мягких» частиц при их плотной упаковке // *Опт. спектр.* 1990. Т. 68. С. 403–409.
171. *Городничев Е. Е., Rogozkin Д. Б.* Малоугловое многократное рассеяние света в случайно-неоднородных средах // *ЖЭТФ.* 1995. Т. 107. С. 209–235.

172. Кузьмин В.Л., Романов В.П. Когерентные эффекты при рассеянии света в неупорядоченных системах // Успехи физ. наук. 1996. Т. 166, №3. С. 247–278.
173. Yoo K.M., Liu F., Alfano R.R. Biological materials probed by the temporal and angular profiles of the backscattered ultrafast laser pulses // J. Opt. Soc. Am. B. 1990. V.7. P. 1685–1693.
174. Рытов С.М., Кравцов Ю.А., Татарский В.И. Введение в статистическую радиофизику Ч. 2. Случайные поля. М.: Наука, 1978.
175. Coherence-domain methods in biomedical optics / Ed. by Tuchin V.V. Bellingham: SPIE, 1996. V. 2732.
176. Tuchin V.V. Coherence-domain methods in tissue and cell optics // Laser Physics. 1998. V. 8, №2. P. 1–43.
177. Спектроскопия оптического смещения и корреляция фотонов / Под ред. Камминса Г., Пайка Е. // Пер. с англ. под ред. Бункина Ф.В. М.: Мир, 1978; Photon Correlation and Light Beating Spectroscopy / Ed. by Cummins H.Z., Pike E.R. N.Y.: Plenum, 1974.
178. Photon Correlation Spectroscopy and Velocimetry / Ed. by Cummins H.Z., Pike E.R. N.Y.: Plenum, 1977.
179. Kao M.H., Yodh A.G., Pine D.J. Observation of Brownian motion on the time scale of hydrodynamic interactions // Phys. Rev. Lett. 1993. V. 70. P. 242–245.
180. Kaplan P.D., Dinsmore A.D., Yodh A.G., Pine D. Diffuse-transmission spectroscopy: a structural probe of opaque colloidal mixtures // Phys. Rev. E. 1994. V. 50. P. 4827–4835.
181. Briers J.D. Laser Doppler and time-varying speckle: a reconciliation // J. Opt. Soc. Amer. A. 1996. V. 13. P. 345–350.
182. Briers J.D., Webster S. Laser speckle contrast analysis (LASCA): a non-scanning, full-field technique for monitoring capillary blood flow // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1. P. 174–179.
183. Fercher A.F. Optical coherence tomography // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1. P. 157–173.
184. Mishchenko M.I., Travis L.D., and Lacis A.A. Multiple Scattering of Light by Particles: Radiative Transfer and Coherent Backscattering. N.Y.: Cambridge University Press, 2006.
185. Yu G., Lech G., Zhou C., Chance B., Mohler III E.R., and Yodh A.G. Time-dependent blood flow and oxygenation in human skeletal muscles measured with noninvasive near-infrared diffuse optical spectroscopies // J. Biomed. Opt. 2005. V. 10, №2. P. 024027-1–7.
186. Gueymard C.A., Myers D. and Emery K. Proposed reference irradiance spectra for solar energy systems testing // Solar Energy. 2002. V. 73. P. 443–467.
187. Lychagov V.V., Tuchin V.V., Vilensky M.A., Reznik B.N., Ichim T., De Taboada L. Experimental study of NIR transmittance of the human skull // Proc. SPIE. 2006. V. 6085. P. 60850T.
188. Waigh T.A. Applied Biophysics. A Molecular Approach for Physical Scientists. Chichester: John Wiley & Sons Ltd., 2007.
189. Schaefer H. and Redelmeier T.E. Skin Barrier: Principles of Percutaneous Absorption. Basel: Karger, 1996.
190. Backman V., Gurjar R., Badizadegan K., Dasari R., Itzkan I., Perelman L.T., and Feld M.S. Polarized light scattering spectroscopy for quantitative measurement of epithelial cellular structures *in situ*. IEEE J. Sel. Top. Quant. Elect. 1999. V. 5. P. 1019–1027.
191. Альтшуллер Г.Б., Грисимов В.Н. Эффект волноводного распространения света в зубе человека // Докл. АН СССР. 1990. Т. 310, №5. С. 1245–1248.
192. Альтшуллер Г.В. Оптическая модель тканей зуба человека // Оптический журнал. 1995. Т. 62. С. 516–520.
193. Zijp J.R. and ten Bosch J.J. Anisotropy of volume-backscattered light // Appl. Opt. 1997. V. 36. P. 1671–1680.
194. Fried D. Optical methods for caries detection, diagnosis, and therapeutic intervention // Biomedical Photonics Handbook / Ed. by Vo-Dinh T. Boca Raton: CRC Press, 2003.
195. Kienle A., Forster F.K., Diebold R., and Hibst R. Light propagation in dentin: influence of microstructure on anisotropy // Phys. Med. Biol. 2003. V. 48. P. N7–N14.
196. Sivakumar M., Oliveira V., Vilar R., Oliveira S., Leitao J. Sealing of human dentinal tubules by KrF 248 nm laser radiation, J. Laser Appl. 2006. V. 18. P. 330–333.

197. *Mjör I.A. and Nordahl I.* The density and branching of dentinal tubules in human teeth. *Archs. Oral Biol.* 1996. V.41. P.401–412.
198. *Грисимов В.Н.* Показатель преломления основного вещества дентина // *Опт. спектр.* 1994. Т.77. С.272–273.
199. *Wang X.J., Milner T.E., de Boer J.F., Zhang Y., Pashley D.H., and Nelson J.S.* Characterization of dentin and enamel by use of optical coherence tomography // *Appl. Opt.* 1999. V.38. P.2092–2096.
200. *Ohmi M., Ohnishi Y., Yoden K., and Haruna M.* *In vitro* simultaneous measurement of refractive index and thickness of biological tissue by the low coherence interferometry // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2000. V.47. P.1266–1270.
201. *Dunn A., Smithpeter C., Welch A.J., Richards-Kortum R.* Finite-difference time-domain simulation of light scattering from single cells // *J.Biomed. Opt.* 1997. V.2, №3. P.262–266.
202. *Beauvoit B., Kitai T., Chance B.* Contribution of the mitochondrial compartment to the optical properties of the rat liver: a theoretical and practical approach // *Biophys. J.* 1994. V.67. P.2501–2510.
203. *Young A.R.* Chromophores in human skin // *Phys. Med. Biol.* 1997. V.42. P.789–802.
204. *Duck F.A.* Physical properties of tissue: a comprehensive reference book. L.: Academic, 1990.
205. Прикладная лазерная медицина. Учеб. справ. пособие / Под ред. Х.-П. Берлиена, Г.И. Мюллера. М.: Интерэксперт, 1997; *Applied Laser Medicine* / Ed. by Berlien H.-P. and Müller G. J. Berlin, Springer-Verlag, 2003.
206. *Photon Migration in Tissue* / Ed. B. Chance. N. Y.: Plenum, 1989.
207. *Quantitative Spectroscopy in Tissue* / Eds. K. Frank, M. Kessler. Frankfurt am Main: pmi Verlag, 1992.
208. *Photodynamic Therapy: Basic Principles and Clinical Applications* / Eds. B. W. Henderson, T. J. Dougherty. N. Y.: Marcel Dekker, Inc. 1992.
209. *Marks F.A.* Optical determination of the hemoglobin oxygenation state of breast biopsies and human breast cancer xenografts in unde mice // *Proc. SPIE.* Bellingham, 1992. V.1641. P.227–237.
210. *Star W.M., Wilson B.C., Patterson M.S.* Light delivery and dosimetry in photodynamic therapy of solid tumors // *Photodynamic therapy, basic principles and clinical applications* / Eds B. W. Henderson, T. J. Dougherty. N. Y.: Marcel Dekker, Inc. 1992. P.335–368.
211. *Star W.M.* Light dosimetry *in vivo* // *Phys. Med. Biol.* 1997. V.42. P.763–787.
212. *Groenhuis R.A.J., Ferwerda H.A., ten Bosch J.J.* Scattering and absorption of turbid materials determined from reflection measurements. 1. Theory // *Appl. Opt.* 1983. V.22. P.2456–2462.
213. *Groenhuis R.A.J., ten Bosch J.J., Ferwerda H.A.* Scattering and absorption of turbid materials determined from reflection measurements. 2. Measuring method and calibration // *Appl. Opt.* 1983. V.22. P.2463–2467.
214. *Hourdakis C.J., Perris A.* A Monte Carlo estimation of tissue optical properties for use in laser dosimetry // *Phys. Med. Biol.* 1995. V.40. P.351–363.
215. *Schmitt J.M. and Kumar G.* Turbulent nature of refractive-index variations in biological tissue // *Opt. Lett.* 1996. V.21. P.1310–1312.
216. *Schmitt J.M. and Kumar G.* Optical scattering properties of soft tissue: a discrete particle model // *Appl. Opt.* 1998. V.37, №13. P.2788–2797.
217. *Борен К., Хафмен Д.* Поглощение и рассеяние света малыми частицами. М.: Мир, 1986 / Пер. с англ., Bohren C.F. and Huffman D.R. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles.* NY: Wiley, 1983.
218. *Борн М., Вольф Э.* Основы оптики. М.: Наука, 1970 / Пер. с англ. под ред. Г.П. Мотулевич; Born M. and Wolf E. *Principles of Optics*, 7th ed., Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1999.
219. *Light Scattering by Nonspherical Particles* / Ed. by Mishchenko M. I., Hovenier J. W., and Travis L. D. San Diego: Academic Press, 2000.

220. Scattering, Absorption, and Emission of Light by Small Particles / Mishchenko M. I., Travis L. D., and Lacis A. A. Cambridge: Cambridge Univ. Press, 2002.
221. Шифрин К.С. Введение в оптику океана. Л.: Гидрометеиздат, 1983; Shifrin K.S. Physical Optics of Ocean Water. N. Y.: American Institute of Physics, 1988.
222. Бакуткин В.В., Максимова И.Л., Сапрыкин П.И. и др. Рассеяние света склеральной оболочкой глаза человека // ЖПС. 1987. Т. 46, № 1. С. 104–107.
223. Tuchin V. V., Maksimova I. L., Zimnyakov D. A. et al. Light propagation in tissues with controlled optical properties // Proc. SPIE. 1996. V. 2925. P. 118–142.
224. Tuchin V. V., Maksimova I. L., Zimnyakov D. A. et al. Light propagation in tissues with controlled optical properties // J. Biomed. Opt. 1997. V. 2, № 4. P. 304–321.
225. Beck G. C., Akgun N., Rück A., and Steiner R. Developing optimized tissue phantom systems for optical biopsies // Proc SPIE. 1997. V. 3197. P. 76–85.
226. Beck G. C., Akgun N., Rück A., and Steiner R. Design and characterization of a tissue phantom system for optical diagnostics // Lasers Med. Sci. 1998. V. 13. P. 160–171.
227. Хлебцов Н.Г., Максимова И.Л., Тучин В.В., Ванг Л.В. Введение в рассеяние света биологическими объектами // Оптическая биомедицинская диагностика, том. 1 / Под ред. Тучина В.В. М.: Физматлит, 2007. С. 36–156.
228. Kumar G. and Schmitt J. M. Micro-optical properties of tissue. Proc. SPIE. 1996. V. 2679. P. 106–116.
229. Tuchin V. V., Zhestkov D. M. Tissue structure and eye lens transmission and scattering spectra // Proc. SPIE, 1997. V. 3053. P. 123–128.
230. Mourant J. R., Johnson T. M., Carpenter S., Guerra A., Aida T., and Freyer J. P. Polarized angular dependent spectroscopy of epithelial cells and epithelial cell nuclei to determine the size scale of scattering structures // J. Biomed. Opt. 2002. V. 7, № 3. P. 378–387.
231. Maurice D. M. The cornea and sclera // The Eye / Ed. by Davson H. Orlando: Academic Press, 1984. P. 1–158.
232. Hart R. W. and Farrell R. A. Light scattering in the cornea // J. Opt. Soc. Am. 1969. V. 59, № 6. P. 766–774.
233. McCally R. L. and Farrell R. A. Light scattering from cornea and corneal transparency // Noninvasive Diagnostic Techniques in Ophthalmology / Ed. by Master B. R. N. Y.: Springer-Verlag, 1990. P. 189–210.
234. Максимова И.Л., Шубочкин Л.П. Матрица рассеяния света на плотно упакованной бинарной системе твердых сфер // Опт. спектр. 1991. Т. 70, № 6. С. 1276–1281.
235. Shankaran V., Everett M. J., Maitland D. J., and Walsh, Jr. J. T. Polarized light propagation through tissue phantoms containing densely packed scatterers // Opt. Lett. 2000. V. 25, № 4. P. 239–241.
236. Shankaran V., Walsh, Jr. J. T., and Maitland D. J. Comparative study of polarized light propagation in biological tissues // J. Biomed. Opt. 2002. V. 7, № 3. P. 300–306.
237. Izotova V. F., Maksimova I. L., Nefedov I. S., and Romanov S. V. Investigation of Mueller matrices of anisotropic nonhomogeneous layers in application to optical model of cornea // Appl. Opt. 1997. V. 36, № 1. P. 164–169.
238. Максимова И.Л. Рассеяние излучения регулярными и случайными системами, образованными параллельными длинными цилиндрическими стержнями // Опт. спектр. 2002. Т. 93, № 4. С. 663–673.
239. Wang R. K. Modelling optical properties of soft tissue by fractal distribution of scatterers // J. Modern Opt. 2000. V. 47, № 1. P. 103–120.
240. Cilesiz I. F., Welch A. J. Light dosimetry: effects of dehydration and thermal damage on the optical properties of the human aorta // Appl. Opt. 1993. V. 32. P. 477–487.
241. Lin W.-C., Motamedi M., and Welch A. J. Dynamics of tissue optics during laser heating of turbid media // Appl. Opt. 1996. V. 35, № 19. P. 3413–3420.
242. Vargas G., Chan E. K., Barton J. K., Rylander III H. G., and Welch A. J. Use of an agent to reduce scattering in skin // Laser. Surg. Med. 1999. V. 24. P. 133–141.
243. Doornbos R. M. P., Lang R., Aalders M. C., Cross F. W., and Sterenborg H. J. C. M. The determination of *in vivo* human tissue optical properties and absolute chromophore

- concentrations using spatially resolved steady-state diffuse reflectance spectroscopy // *Phys. Med. Biol.* 1999. V. 44. P. 967–981.
244. *Twersky V.* Absorption and multiple scattering by biological suspensions // *J. Opt. Soc. Am.* 1970. V. 60. P. 1084–1093.
245. *Ишимару А.* Распространение и рассеяние волн в случайно-неоднородных средах. М.: Мир, 1981; *Ishimaru A.* Wave Propagation and Scattering in Random Media. N. Y.: IEEE Press, 1997.
246. *Twersky V.* Interface effects in multiple scattering by large, low refracting, absorbing particles // *J. Opt. Soc. Am.* 1970. V. 60, № 7. P. 908–914.
247. *Steinke J. M., Shepherd A. P.* Diffusion model of the optical absorbance of whole blood // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1988. V. 5. P. 813–822.
248. *Meinke M., Müller G., Helfmann J., and Friebe M.* Empirical model functions to calculate hematocrit-dependent optical properties of human blood // *Appl. Opt.* 2007. V. 46, № 10. P. 1742–1763.
249. *Лакович Дж.* Основы флуоресцентной спектроскопии. М.: Мир, 1986; *Lakowicz J. R.* Principles of Fluorescence Spectroscopy. 2nd ed., NY: Kluwer Academic / Plenum Publ., 1999.
250. *Синичкин Ю. П., Коллиас Н., Зониос Г., Утц С. Р., Тучин В. В.* Отражательная и флуоресцентная спектроскопия кожи человека *in vivo* // Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 2 / Под ред. Тучина В. В. М.: Физматлит, 2007. С. 77–124; пер. с англ. под ред. Тучина В. В. Handbook of Optical Biomedical Diagnostics / Ed. by Tuchin V. V. Bellingham, WA: SPIE Press, 2002.
251. *Шнекенбюргер Г., Штайнер Р., Штраус В., Шайлер Р.* Флуоресцентные технологии в биомедицинской диагностике // Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 2 / Под ред. Тучина В. В. М.: Физматлит, 2007. С. 155–194; пер. с англ. под ред. Тучина В. В. Handbook of Optical Biomedical Diagnostics / Ed. by Tuchin V. V. Bellingham, WA: SPIE Press, 2002.
252. *Sinichkin Yu. P., Utz S. R., Mavlutov A. H., and Pilipenko H. A.* *In vivo* fluorescence spectroscopy of the human skin: experiments and models // *J. Biomed. Opt.* 1998. V. 3. P. 201–211.
253. *Drezek R., Sokolov K., Utzinger U., Boiko I., Malpica A., Follen M., and Richards-Kortum R.* Understanding the contributions of NADH and collagen to cervical tissue fluorescence spectra: modeling, measurements, and implications // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6, № 4. P. 385–396.
254. *Lucchina L. C., Kollias N., Gillies R., Phillips S. B., Muccini J. A., Stiller M. J., Trancik R. J., and Drake L. A.* Fluorescence photography in the evaluation of acne // *J. Am. Acad. Dermatol.* 1996. V. 35. P. 58–63.
255. *Soukos N. S., Som S., Abernethy A. D., Ruggiero K., Dunham J., Lee C., Doukas A. G., and Goodson J. M.* Phototargeting oral black-pigmented bacteria // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. V. 49. P. 1391–1396.
256. *Abugo O. O., Herman P., and Lakowicz J. R.* Fluorescence properties of albumin blue 633 and 670 in plasma and whole blood // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6, № 3. P. 359–365.
257. *Budaj J. E., Achilefu S., Dorshow R. B., and Rajagopalan R.* Novel fluorescent contrast agents for optical imaging of *in vivo* tumors based on a receptor-targeted dye-peptide conjugate platform // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6, № 2. P. 122–133.
258. *Suhling K., Siegel J., Phillips D., French P. M. W., Leveque-Fort S., Webb S. E. D., and Davis D. M.* Imaging the environment of green fluorescent protein // *Biophys. J.* 2002. V. 83. P. 3589–3595.
259. *Gannot I., Garashi A., Gannot G., Chernomordik V., and Gandjbakhche A.* *In vivo* quantitative three-dimensional localization of tumor labeled with exogenous specific fluorescence markers // *Appl. Opt.* 2003. V. 42, № 16. P. 3073–3080.
260. *Denk W.* Two-photon excitation in functional biological imaging // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 3. P. 296–304.

261. *Berland K.M., So P.T.C., Gratton E.* Two-photon fluorescence correlation spectroscopy: method and application to the intracellular environment // *Biophys. J.* 1995. V.68. P.694–701.
262. *Hell S.W., Bahlmann K., Schrader M., et al.* Three-photon excitation in fluorescence microscopy // *J. Biomed. Opt.* 1996. V.1, №4. P.71–74.
263. *Masters B.R., So P.T.C., and Gratton E.* Multi-photon excitation fluorescence microscopy and spectroscopy of *in vivo* human skin // *Biophys. J.* 1997. V.72. P.2405–2412.
264. *Masters B.R.* Confocal laser scanning microscopy // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by Tuchin V.V. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. P.364–415.
265. *So P.T.C., Dong C.Y., and Masters B.R.* Two-photon excitation fluorescence microscopy // *Biomedical Photonics Handbook* / Ed. by Vo-Dinh T., Boca Raton, Florida: CRC Press, 2003. P.11-1–17.
266. *Zhang Z.X., Sonek G.J., Wei X.B., Sun C., Berns M.W., and Tromberg B.J.* Cell viability and DNA denaturation measurements by two-photon fluorescence excitation in CW Al:GaAs diode laser optical traps // *J. Biomed. Opt.* 1999. V.4, №2. P.256–259.
267. *Dunn A.K., Wallace V.P., Coleno M., Berns M.W., and Tromberg B.J.* Influence of optical properties on two-photon fluorescence imaging in turbid samples // *Appl. Opt.* 2000. V.39, №7. P.1194–1201.
268. *Cicchi R., Pavone F.S., Massi D., and Sampson D.D.* Contrast and depth enhancement in two-photon microscopy of human skin *ex vivo* by use of optical clearing agents // *Opt. Express.* 2005. V.13. P.2337–2344.
269. *Zipfel W.R., Williams R.M., and Webb W.W.* Nonlinear magic: multiphoton microscopy in the bioscience // *Nature Biotechnol.* 2003. V.21. P.1369–1377.
270. Хронобиология и хрономедицина / Руководство под ред. акад. АМН СССР Комарова Ф.И. М.: Медицина, 1989.
271. *Бейлин Е.Н., Дмитриев А.К., Лехциер Е.Н. и др.* Пиковые давления и температуры при УФ лазерной абляции роговицы // *Изв. АН СССР. Сер. физическая* 1990. Т.54, №8. С.1581–1585.
272. *Есеналиев Р.О., Ораевский А.А., Летохов В.С. и др.* Исследование процесса лазерной абляции тканей атеросклеротических сосудов при различных условиях облучения // *Изв. АН СССР. Сер. физическая.* 1990. Т.54, №8. С.1586–1596.
273. *Ivanenko M., Werner M., Afilal S., Klasing M., Hering P.* Ablation of hard bone tissue with pulsed CO₂ lasers // *Med. Laser Appl.* 2005. V.20(1). P.13–23.
274. *Apitz I., Vogel A.* Material ejection in nanosecond Er:YAG laser ablation of water, liver, and skin // *Appl. Phys. A.* 2005. V.81. P.329–338.
275. *Wright C.H.G., Barrett S.F., and Welch A.J.* Laser-tissue interaction // *Lasers in Medicine* / Ed. by Vij D.R. and Mahesh K. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers, 2002.
276. *Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue* / Ed. by Welch A.J. and van Gemert M.J.C. N.Y.: Plenum Press, 1995.
277. *Laser-Tissue Interaction: Photochemical, Photothermal, Photomechanical I–XIII* / Ed. by Jacques S.L. // *Proc. SPIE, Annual collection of papers.* Bellingham, WA: SPIE, 1990–2002.
278. *Gore J.P. and Xu L.X.* Thermal imaging for biological and medical diagnostics // *Biomedical Photonics Handbook* / Ed. by Vo-Dinh T., Boca Rotan, Florida: CRC Press, 2003. P.17-1-12.
279. *Anderson R.R. and Parrish J.* Selective photothermolysis: Precise microsurgery by selective absorption of the pulsed radiation // *Science* 1983. V.220. P.524–526.
280. *Altshuler G.B., Anderson R.R., Manstein D., Zenzie H.H., and Smirnov M.Z.* Extended theory of selective photothermolysis // *Lasers Surg. Med.* 2001. V.29, №5. P.416–432.
281. *Tuchin V.V., Genina E.A., Bashkatov A.N., Simonenko G.V., Odoevskaya O.D., and Altshuler G.B.* A pilot study of ICG laser therapy of acne vulgaris: Photodynamic and photothermolysis treatment // *Lasers Surg. Med.* 2003. V.33, №5. P.296–310.

282. Genina E.A., Bashkatov A.N., Simonenko G.V., Odoevskaya O.D., Tuchin V.V., and Altshuler G.B. Low-intensity ICG-laser phototherapy of *acne vulgaris*: A pilot study // J. Biomed. Opt. 2004. V. 9, № 4. P. 828–834.
283. Terentyuk G.S., Maslyakova G.N., Suleymanova L.V., Khlebtsov N.G., Khlebtsov B.N., Akchurin G.G., Maksimova I.L., and Tuchin V.V. Laser-induced tissue hyperthermia mediated by gold nanoparticles: Toward cancer phototherapy // J. Biomed. Opt. 2009. V. 14, № 2. P. 021016.
284. Terentyuk G.S., Maslyakova G.N., Suleymanova L.V., Khlebtsov B.N., Kogan B.Ya., Akchurin G.G., Shantrocha A.V., Maksimova I.L., Khlebtsov N.G., and Tuchin V.V. Circulation and distribution of gold nanoparticles and induced alterations of tissue morphology at intravenous particle delivery // J. Biophoton. 2009. V. 2, № 5. P. 292–302.
285. Terentyuk G.S., Akchurin G.G., Maksimova I.L., Maslyakova G.N., Khlebtsov N.G., and Tuchin V.V. Cancer laser thermotherapy mediated by plasmonic nanoparticles, Chapter 29 in Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by Tuchin V.V. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 763–797.
286. Chen W.R., Li X., Naylor M.F., Liu H., and Nordquist R.E. Advances in cancer photothermal therapy, Chapter 28 in Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by Tuchin V.V. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 739–761.
287. Chen W.R., Adams R.L., Heaton S., Dickey D.T., Bartels K.E., and Nordquist R.E. Chromophore-enhanced laser-tumor tissue photothermal interaction using 808 nm diode Laser // Cancer Lett. 1995. V. 88. P. 15–19.
288. Колесникова Т.А., Хлебцов Б.Н., Щукин Д.Г., Горин Д.А. Характеризация чувствительных к ультразвуковому воздействию нано-композитных микрокапсул методом атомно-силовой микроскопии // Российские нанотех. 2008. Т. 3, № 9–10. С. 48–57.
289. Khlebtsov N.G., Dykman L.A. Plasmonic nanoparticles: Fabrication, optical properties, and biomedical applications, Chapter 2 in Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by Tuchin V.V. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 37–85.
290. Sobol E.N. Phase Transformations and Ablation in Laser-Treated Solids. Hoboken, N.J.: Wiley-Interscience, 1995.
291. Скобелкин О.К. Лазеры в хирургии. М.: Медицина, 1989.
292. Соколов А.Л. Эндовенозная лазерная коагуляция в лечении варикозной болезни. М.: Медпрактика-М, 2007.
293. Лазерная аналитическая спектроскопия / Под ред. Летохова В.С. М.: Наука, 1986.
294. Лазерная пикосекундная спектроскопия и фотохимия биомолекул / Под ред. Летохова В.С. М.: Наука, 1987.
295. Svanberg S. New developments in laser medicine // Phys. Scripta. 1997. V. T72. P. 69–75.
296. Watson I.A., Ward G.D., Wang R.K. et al. Comparative bactericidal activities of lasers operating at seven different wavelengths // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1, № 4. P. 466–472.
297. Tuchin V.V., Utz S.R., Barabanov A.Yu. et al. Laser photochemotherapy of psoriasis // Laser in Dermatology and Tissue Welding / Ed. by Tan O.T., White R.A., White J.V. Bellingham, SPIE, 1991. V. 1422. P. 85–96.
298. Довжанский С.И., Утц С.Р. Псориаз или псориагическая болезнь. Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та, 1992. Ч. 1, 2.
299. Гуринович Г.П., Зорина Т.Е., Зорин В.П. и др. Повреждение опухолевых клеток излучением гелий-неонового лазера в присутствии хлоринов и порфиринов // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1989. Т. 53, № 6. С. 1153–1156.
300. Странадко Е.Ф., Титова В.А., Рябов М.В., Петровский В.Ю. Фотодинамическая терапия рака нижней губы: опыт применения в комбинации с традиционными методами профилактики метастазирования // Лазерная медицина. 2006. Т. 10, № 3. С. 41–47.
301. Wilson B.C., Patterson M.S., Lilge L. Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: a new paradigm // Lasers Med. Sci. 1997. V. 12. P. 182–199.
302. Judy M.M. Photodynamic inactivation of enveloped viruses: potential application for blood banking // J. Clinical Laser Med. Surg. 1990. August. P. 49–52.

303. *Matthews J. L., Sogandares-Bernal F., Judy M. M. et al.* Preliminary studies of photoinactivation of human immunodeficiency viruses in blood // *Transfusion*. 1991. Vol. 31, № 7. P. 636–641.
304. *Толстых П. И., Клебанов Г. И., Шехтер А. Б., Толстых М. П.* Антиоксиданты и лазерное излучение в терапии ран и трофических язв. М.: Изд. дом «Эко», 2002.
305. *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical / Ed. by Hamblin M., Mroz P.* Boston/London: Artec, 2008.
306. *Wilson B. C.* Photodynamic therapy/diagnostics: Principles, practice and advances, Chapter 25 in *Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by Tuchin V. V.* London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 649–686.
307. *Красновский А. А.* Синглетный кислород и механизм фотодинамического действия порфиринов // *Успехи химии порфиринов / Под ред. Голубчикова О. А.* Санкт-Петербург: Изд-во НИИ химии СПбГУ, 2002. Т. 3. С. 191–216.
308. *Красновский А. А.* Фотодинамическое действие и синглетный кислород // *Биофизика*. 2004. Т. 49(2). С. 305–322.
309. *Черницкий Е. А., Слобожанина Е. И.* Спектральный люминесцентный анализ в медицине. Минск: Наука и техника, 1989.
310. *Гайдук М. И., Григорьянц В. В., Мененков В. Д. и др.* Волоконно-лазерная люминесцентная диагностика новообразований на основе редкоземельных порфиринов // *Изв. АН СССР. Сер. физическая*. 1990. Т. 54, № 10. С. 1904–1908.
311. *Karu T. I.* Photobiology of Low-Power Laser Therapy. Chur et al., Harwood Academic Publ., 1989.
312. *Karu T. I.* Low-power laser therapy, Chapter 48 in *Biomedical Photonics Handbook / Ed. by Vo-Dinh T.* Boca Raton: CRC Press, 2003. P. 48-1–48-25.
313. *Huang Y.-Y., Chen A. C.-H., and Hamblin M. R.* Advances in low-intensity laser and phototherapy, Chapter 26 in *Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by Tuchin V. V.* London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 687–716.
314. *Huang Y.-Y., Hamblin M. R., and De Taboada L.* Low-level laser therapy in stroke and central nervous system, Chapter 27 in *Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by Tuchin V. V.* London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 717–737.
315. *Подколзин А. А., Маркин Е. П., Амбарцумян Р. В. и др.* Выяснение механизмов лазерного воздействия при экспериментальном тромбофлебите // *Изв. АН СССР. Сер. физическая*. 1990. Т. 54, № 10. С. 1961–1963.
316. *Захаров С. Д., Скопинов С. А., Чудновский В. М. и др.* Первичные механизмы неспецифического действия низкоинтенсивного лазерного излучения на эритроциты с участием молекулярного кислорода // *Изв. АН СССР. Сер. физическая*. 1990. Т. 54, № 8. С. 1629–1635.
317. *Labbe R. F., Skogerboe K. J., Davis H. A., Rettmer R. L.* Laser photobioactivation mechanisms: *in vitro* studies using ascorbic acid uptake and hydroxyproline formation as biochemical markers of irradiation response // *Lasers Surg. Med.* 1990. V. 10, № 2. P. 201–207.
318. *Галанжа Е. И., Брилли Г. Е., Соловьева А. В., Степанова Т. В.* Участие оксида азота в регуляции функций лимфатических микрососудов. *Рос. физиолог. журнал им. И. М. Сеченова*. 2002. Т. 88, № 2. С. 983–989.
319. *Владимиров Ю. А., Клебанов Г. И., Борисенко Г. Г. и др.* Молекулярные и клеточные механизмы действия низкоинтенсивного лазерного излучения // *Биофизика*. 2004. Т. 49, № 2. С. 339–350.
320. *Владимиров Ю. А., Осипов А. Н., Клебанов Г. И.* Фотобиологические основы терапевтического применения лазерного облучения // *Биохимия*. 2004. Т. 69, № 1. С. 81–90.
321. *Клебанов Г. И., Шураева Н. Ю., Чичук Т. В., Сидорина Н. Г.* Роль оксида азота, цитокинов и активности супероксиддисмутазы в заживление экспериментальных ран у крыс // *Лазерная медицина*. 2005. Т. 9, № 1. С. 23–31.
322. *Karu T. I., Pyatibrat L. V., and Afanasyeva N. I.* Cellular effects of low power laser therapy can be mediated by nitric oxide // *Lasers Surg Med.* 2005. V. 36. P. 307–314.
323. *Karu T. I. and Kolyakov S. F.* Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy // *Photomed. Laser Surg.* 2005. V. 23. P. 355–361.

324. Рубинов А.Н., Афанасьев А.А. Нерезонансные механизмы биологического действия когерентного и некогерентного света // Опт. спектроск. 2005. Т. 98, № 6. Р. 1027–1032.
325. Бриль Г.Е., Бугаева И.О. Изменение содержания депротенизированной ДНК и уровня РНК в клетках лимфоидных органов при облучении животных инфракрасным лазером // Лазерная медицина. 2005. Т. 9, № 3. С. 48–52.
326. Ораевский А.А., Летохов В.С., Рагимов С.Э. и др. Спектральная диагностика атеросклеротических бляшек в сосудах человека // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1990. Т. 54, № 10. С. 1900–1903.
327. Chance B., Luo Q., Nioka S., Alsop D.C., and Detre J.A. Optical investigations of physiology: a study of intrinsic and extrinsic biomedical contrast // Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. 1997. V. 352. P. 707–716.
328. Yaroslavsky A.N., Barbosa J., Neel V., DiMarzio C., and Anderson R.R. Combining multispectral polarized light imaging and confocal microscopy for localization of nonmelanoma skin Cancer // J. Biomed. Opt. 2005. V. 10, № 10. P. 014011-1-6.
329. Тучин В.В., Мироньев А.П. Оптико-акустическая спектроскопия в биологических и медицинских исследованиях // Зарубежная радиоэлектроника. 1986. № 9. С. 51–73.
330. Photoacoustic Imaging and Spectroscopy / Ed. by Wang L. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009.
331. Tu A.T. Raman Spectroscopy in Biology. N.Y.: John Wiley & Sons Ltd, 1982.
332. Кери П.П. Применение спектроскопии КР и РКР в биохимии. М.: Мир, 1985.
333. Greve J., Puppels G.J. Raman microspectroscopy of single whole cells // Advances in Spectroscopy. V. 20A. Biomolecular spectroscopy. Pt. A / Ed. by Clark R.J.H., Hester R.E. N.Y.: J. Wiley & Sons Ltd., 1993. P. 231–265.
334. Лукасен Дж.В., Касперс П.Дж., Паппелс Х.Дж. Спектроскопия инфракрасного поглощения и комбинационного рассеяния кожи человека *in vivo*, в кн. Оптическая биомедицинская диагностика, том 2 / Под ред. Тучина В.В., М.: Физматлит, 2007, С. 125–154.
335. Petry R., Schmitt M., and Popp J. Raman spectroscopy — a prospective tool in the life sciences // Chemphyschem. 2003. V. 4. P. 14–30.
336. Perelman L.T., Modell M.D., Vitkin E., and Hanlon E.B. Light scattering spectroscopy: from elastic to inelastic, Chapter 9, in Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science. V.1 / Ed. by Tuchin V.V. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. P. 355–395.
337. Biophotonics: Visions for Better Health Care / Ed. by Popp J., Strehle M. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006.
338. Krafft C., Steiner G., Beileites C., Salzer R. Disease recognition by infrared and Raman spectroscopy // J. Biophoton. 2008. V. 2. P. 13–28.
339. Krafft C., Popp J. Raman and CARS microscopy of cells and tissues, Chapter 7 in Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by Tuchin V.V. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 197–227.
340. Bertoluzza A., Fagnano S., Monti P. et al. Raman spectra of the human lens in relation to pathology and the anticataract effect of drugs // J. Raman Spectr. 1986. V. 17, № 1. P. 133–137.
341. Ozaki Y. Medical Application of Raman Spectroscopy // Appl. Spectroscopy Reviews. 1988. V. 24, № 3. P. 259–312.
342. Yu N.-T., Cai M.-Z., Ho D.J.-Y., Kuck J.F.R. Automated laser-scanning-microbeam fluorescence Raman image analysis of human lens with multichannel detection: evidence for metabolic production of a green fluorophor // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. Biophysics. 1988. V. 85, № 1. P. 103–106.
343. Darvin M.E., Gersonde I., Meinke M., Sterry W., and Lademann J. Non-invasive *in vivo* determination of the carotenoids beta-carotene and lycopene concentrations in the human skin using the Raman spectroscopic method // J. Phys. D: Appl. Phys. 2005. V. 38. P. 2696–2700.

344. *Набиев И.Р., Ефремов Р.Г.* Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния и ее применение к изучению биологических объектов // Итоги науки и техн. Сер. биоорганическая химия. 1989. Т. 15.
345. *Darvin M.E., Gersonde I., Albrecht H., Sterry W., and Lademann J.* *In vivo* Raman spectroscopic analysis of the influence of IR radiation on the carotenoid antioxidant substances beta-carotene and lycopene in the human skin. Formation of free radicals // *Laser Phys. Letts.* 2007. V. 4, № 4. P. 318–321.
346. *Yaroslavsky I.V., Yaroslavsky A.N., Otto C. et al.* Combined elastic and Raman light scattering of human eye lenses // *Exp. Eye. Res.* 1994. 59. P. 393–400.
347. *Ярославская А.Н., Ярославский И.В., Отто К., Пуппелс Х.Ж., Дуиндам Х., Френсен Х.Ф.Я.М., Хреве Я., Тучин В.В.* Исследование водного обмена хрусталика глаза человека с помощью конфокальной микроскопии комбинационного рассеяния // *Биофизика.* 1998. Т. 43, № 3. С. 109–114.
348. *Darvin M.E., Sterry W., and Lademann J.* Resonance Raman spectroscopy as an effective tool for determination of antioxidative stability of cosmetic formulations // *J. Biophotonics.* 2010. V. 3, № 1–2. P. 82–88.
349. *Lawson E.E., Edwards H.G.M., Williams A.C., Barry B.W.* Application of Raman spectroscopy to skin research // *Skin Res. Techn.* 1997. V. 3. P. 147–153.
350. *Utzing U., Heintzelman D.L., Mahadevan-Jansen A., Malpica A., Follen M., and Richards-Kortum R.* Near-infrared Raman spectroscopy for *in vivo* detection of cervical precancers // *Appl. Spectrosc.* 2001. V. 55. P. 955–959.
351. *Skrebova-Eikje N., Ozaki Y., Aizawa K., and Arase S.* Fiber optic near-infrared Raman spectroscopy for clinical noninvasive determination of water content in diseased skin and assessment of cutaneous edema // *J. Biomed. Opt.* 2005. V. 10. P. 014013-1–13.
352. *Shih W.-C., Bechtel K.L., and Feld M.S.* Quantitative biological Raman spectroscopy // *Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues* / Ed. by Tuchin V.V. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009.
353. *Kneipp K., Haka A.S., Kneipp H., Badizadegan K., Yoshizawa N., Boone C., Shafer-Peltier K.E., Motz J.T., Dasari R.R., and Feld M.S.* Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in single living cells using gold nanoparticles // *Appl. Spectrosc.* 2002. V. 56. P. 150–154.
354. *Rodriguez L.G., Lockett S.J., Holtom G.R.* Coherent anti-stokes Raman scattering microscopy: a biological review // *Cytometry A* 2006. V. 69. P. 779–791.
355. *Freudiger C.W., Min W., Saar B.G., Lu S., Holtom G.R., He C., Tsai J.C., Kang J.X., Xie X.S.* Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy // *Science.* 2008. V. 322. P. 1857–1861.
356. *Advanced Optical Cytometry: Methods and Disease Diagnoses* / Ed. by Tuchin V.V. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2010.
357. *Культура животных клеток: Методы* / Под ред. Фрешни Р. М.: Мир, 1989.
358. *Salzmann G.C., Singham S.B., Johnston R.G., Bohren C.F.* Light scattering and cytometry // *Flow Cytometry and Sorting* / 2nd ed. Ed. by Melamed M.R., Lindmo T., Mendelsohn M.L. N. Y.: Wiley-Liss Inc., 1990. P. 81–107.
359. *de Grooth B.G., Terstappen L.W.M.M., Puppels G.J., Greve J.* Light-scattering polarization measurements as a new parameter in flow cytometry // *Cytometry.* 1987. V. 8. P. 539–544.
360. *Terstappen L.W.M.M., de Grooth B.G., Visscher K. et al.* Four-parameter white blood cell differential counting based on light scattering measurements // *Cytometry.* 1988. V. 9, № 1. P. 39–43.
361. *Hoekstra A.G., Doornbos R.M.P., Deurloo K.E.I. et al.* Another face of Lorenz–Mie scattering: monodisperse distributions of spheres produce Lissajous-like patterns // *Appl. Opt.* 1994. V. 33. P. 494–500.
362. *Галанжа Е.И., Бриль Г.Е., Айзу Й., Ульянов С.С., Тучин В.В.* Использование динамики спеклов и эффекта Доплера при исследовании микропотоков лимфы и крови // *Оптическая биомедицинская диагностика* / Под ред. Тучина В. В. Т. 2. М.: Физматлит, 2007. С. 199–240.

363. Galanzha E.I., Tuchin V.V., and Zharov V.P. Advances in small animal mesentery models for *in vivo* flow cytometry, dynamic microscopy, and drug screening (invited review) // World J. Gastroenterology 2007. V. 13, № 2. P. 198–224.
364. Georgakoudi I., Solban N., Novak J., Rice W., Wei X., Hasan T., and Lin C.P. *In vivo* flow cytometry: A new method for enumerating circulating cancer cells. Cancer Res. 2004. V. 64. P. 5044–5047.
365. Zharov V.P., Galanzha E.I., and Tuchin V.V. Photothermal image flow cytometry *in vivo*. Opt. Lett. 2005. V. 30, № 6. P. 107–110.
366. Zharov V.P., Galanzha E.I., and Tuchin V.V. Integrated photothermal flow cytometry *in vivo* // J. Biomed. Opt. 2005. V. 10. P. 51502–51510.
367. Galanzha E.I., Tuchin V.V., and Zharov V.P. *In vivo* integrated flow image cytometry and lymph/blood vessels dynamic microscopy // J. Biomed. Opt. 2005. V. 10. P. 54018–54026.
368. Galanzha E.I., Chowdhury P., Tuchin V.V., and Zharov V.P. Monitoring of nicotine impact on microlymphatics of rat mesentery with time-resolved microscopy // Lymphology. 2005. V. 38. P. 181–192.
369. Sipkins D.A., Wei X., Wu J.W., Runnels J.M., Côté D., Means T.K., Luster A.D., Scadden D.T., and Lin C.P. *In vivo* imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment // Nature (London). 2005. V. 435. P. 969–973.
370. Dixon J.B., Zawieja D.C., Gashev A.A., Coté G.L. Measuring microlymphatic flow using fast video microscopy // J. Biomed. Opt. 2005. V. 10. P. 064016-1–7.
371. BOUTRUS S., GREINER C., HWU D., CHAN M., KUPERWASSER C., LIN C.P., and GEORGAKOUIDIA I. Portable two-color *in vivo* flow cytometer for real-time detection of fluorescently-labeled circulating cells // J. Biomed. Opt. 2007. V. 12, № 2. P. 020507-1–3.
372. Zharov V.P., Galanzha E.I., Tuchin V.V. *In vivo* photothermal flow cytometry: Imaging and detection of individual cells in blood and lymph flow // J. Cell Biochem. 2006. V. 97, № 5. P. 916–930.
373. Zharov V., Galanzha E., Shashkov E., Khlebtsov N., and Tuchin V. *In vivo* photoacoustic flow cytometry for monitoring circulating cells and contrast agents // Opt. Lett. 2006. V. 31. P. 3623–3625.
374. Zharov V.P., Galanzha E.I., Menyayev Yu., Tuchin V.V. *In vivo* high-speed imaging of individual cells in fast blood flow // J. Biomed. Opt. 2006. V. 11, № 5. P. 054034-1–4.
375. Zharov V., Galanzha E., Shashkov E., Khlebtsov N., Tuchin V. *In vivo* photoacoustic flow cytometry for real-time monitoring of circulating cells and nanoparticles // SPIE News room. 2006. 10.1117/2.1200609.0391. P. 1–3.
376. Galanzha E.I., Tuchin V.V., and Zharov V.P. Optical monitoring of microlymphatic disturbances at experimental lymphedema // Lymphat. Res. Biol. 2007. V. 5. P. 11–27.
377. Zharov V.P., Galanzha E.I., Tuchin V.V. Photothermal flow cytometry *in vivo* for detection and imaging of individual moving cells // Cytometry A. 2007. V. 71A. P. 191–206.
378. Zharov V.P., Galanzha E.I., Shashkov E.V., Kim Jin-Woo, Khlebtsov N.G., and Tuchin V.V. Photoacoustic flow cytometry: principle and application for real-time detection of circulating single nanoparticles, pathogens, and contrast dyes *in vivo* // J. Biomed. Opt. 2007. V. 12, № 5. P. 051503.
379. Galanzha E.I., Shashkov E.V., Tuchin V.V., and Zharov V.P. *In vivo* multispectral photoacoustic lymph flow cytometry with natural cell focusing and multicolor nanoparticle probes // Cytometry. 2008. V. 73. P. 884–894.
380. Galanzha E.I., Kokoska M.S., Shashkov E.V., Kim J.-W., Tuchin V.V., and Zharov V.P. *In vivo* fiber photoacoustic detection and photothermal purging of metastasis targeted by nanoparticles in sentinel lymph nodes at single cell level // J. Biophoton. 2009. V. 2. P. 528–539.
381. Tanev S., Sun W., Pond J., Tuchin V.V., and Zharov V.P. Flow cytometry with gold nanoparticles and their clusters as scattering contrast agents: FDTD simulation of light-cell interaction // J. Biophotonics. 2009. V. 2. P. 505–520.
382. Лопатин В.Н., Сидько Ф.Я. Введение в оптику взвесей клеток. Новосибирск: Наука СО, 1988.

383. *Peironen K.-E., Myllylä R., and Priezhev A. V.* Optical Measurement Techniques, Innovations for Industry and the Life Science. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2009.
384. *Перельман Л. Т., Бекман В.* Спектроскопия рассеяния света эпителиальными тканями: принципы и приложения // Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 2 / Под ред. Тучина В. В. М.: Физматлит, 2007. С. 34–124; пер. с англ. под ред. Тучина В. В. Handbook of Optical Biomedical Diagnostics / Ed. by Tuchin V. V. Bellingham, WA: SPIE Press, 2002.
385. *Дубнищев Ю. Н., Арбузов В. А., Белоусов П. П., Белоусов П. Я.* Оптические методы исследования потоков / Под ред. акад. РАН Накорякова В. Е. Новосибирск: Сибирское университетское изд-во, 2003.
386. *Dhadwal H. S., Ansari R. R., DellaVecchia M. A.* Coherent fiber optic sensor for early detection of cataractogenesis in the human eye lens // Opt. Eng. 1993. V. 32. P. 233–238.
387. Handbook of Non-Invasive Methods and the Skin / Ed. by Serup J., Jemee B. E. Boca Raton et al., CRC Press, 1995.
388. *Shepherd A. P., Öberg P. E.* Laser Doppler Blood Flowmetry. Boston: Kluwer, 1990.
389. *Fein M. E., Gluskin A. H., Goon W. W. Y. et al.* Evolution of optical methods of detecting dental pulp vitality // J. Biomed. Opt. 1997. V. 2, № 1. P. 58–73.
390. *de Mul F. F. M., Koelink M. H., Weijers A. L. et al.* Self-mixing laser-Doppler velocimetry of liquid flow and blood perfusion of tissue // Appl. Opt. 1992. V. 31. P. 5844–5851.
391. *Leahy M., Enfield J. G., Clancy N. T., O'Doherty J., McNamara P., and Nilsson G. E.* Biophotonic methods in microcirculation imaging // Med. Laser Appl. 2007. V. 22. P. 105–126.
392. *Романовский Ю. М., Теплов В. А.* Физические основы клеточного движения. Механизмы самоорганизации амебодной подвижности // Успехи физ. наук. 1995. Т. 165. С. 555–578.
393. *Inaba H.* Coherent detection imaging for medical laser tomography // Medical Optical Tomography: Functional Imaging and Monitoring / Eds G. Müller, B. Chance, R. Alfano et al. Bellingham, SPIE. 1993. V. IS11. P. 317–347.
394. *Dörschel K., Messer B., Minet O., Müller G.* High resolution coherent tomography // Medical Optical Tomography: Functional Imaging and Monitoring / Eds G. Müller, B. Chance, R. Alfano et al. Bellingham: SPIE. 1993. V. IS11. P. 348–354.
395. *Poupinet L., Jarry G.* Heterodyne detection for measuring extinction coefficient in mammalian tissue // J. Optics (Paris). 1993. V. 24. P. 279–285.
396. *Jones R., Hyde S. C. W., Lynn M. J. et al.* Holographic storage and high background imaging using photorefractive multiple quantum wells // Appl. Phys. Lett. 1996. V. 69. P. 1837–1839.
397. *Woisetschlager J., Sheffer D. B., Loughry C. W. et al.* Phase-shifting holographic interferometry for breast cancer detection // Appl. Opt. 1994. V. 33, № 22. P. 5011–5015.
398. *Соколов А. В.* Применение методов оптической голографии для исследования биологических микрообъектов. Л.: Знание, 1978.
399. *Василенко Г. И., Цибульский Л. М.* Голографические распознающие устройства. М.: Радио и связь, 1985.
400. *Ul'yanov S. S., Zimnyakov D. A., Tuchin V. V.* Fundamentals and applications of dynamic speckles induced by focused laser beam scattering // Opt. Eng. 1994. V. 33, № 10. P. 3189–3201.
401. *Navarro R., Mendez-Morales J. A., Santamaria J.* Optical Quality of the eye lens surface from roughness and diffusion measurements // J. Opt. Soc. Am. 1986. V. 3, № 2. P. 228–234.
402. *Салех Б. Е. А.* Оптическая обработка информации и зрение человека // Применение методов Фурье-оптики / Под ред. Г. Старка. М.: Мир, 1988. С. 412–439.
403. *Aizu Y., Asakura T.* Bio-speckle phenomena and their application to the evaluation of blood flow // Opt. Laser Technol. 1991. V. 23. P. 205–219.
404. *Ruth B.* Measuring the steady-state value and the dynamics of the skin blood flow using the non-contact laser method // Med. Eng. Phys. 1994. V. 16, P. 105–111.
405. *Konishi N., Fujii H.* Real-time visualization of retinal microcirculation by laser flowgraphy // Opt. Eng. 1995. V. 34. P. 753–757.

406. Беднов А., Ульянов С. С., Тучин В. В. и др. Исследование динамики лимфотока методами спекл-интерферометрии // Изв. вузов. Прикл. нелинейн. динам. 1996. Т. 4, № 6. С. 45–54.
407. Ul'yanov S. S., Ryabukho V. P., Tuchin V. V. Speckle interferometry for biotissue vibration measurement // Opt. Eng. 1994. V. 33, № 3. P. 908–914.
408. Khanna S. M., Danliker R., Willemin J.-F. et al. Cellular vibration and motility in the organ of corti // Acta Oto-Laryngologica. 1989. Suppl. 467.
409. Меглинский И. В., Боас Д. А., Йод А. Г. и др. Развитие метода корреляции флуктуаций интенсивности лазерного излучения для неинвазивного мониторинга и измерения параметров кровотока // Изв. вузов. Прикл. нелинейн. динам. 1996. Т. 4, № 6. С. 72–81.
410. Fitzpatrick R. E., Goldman M. P., Satur N. M., Tope W. D. Pulsed carbon dioxide laser resurfacing of photoaged facial skin // Arch. Dermatol. 1996. V. 132. P. 395–402.
411. Wheeland R. G. Laser-assisted hair removal // Dermatol. Clinics. 1997. V. 15, № 3. P. 469–477.
412. Moskalik K. G., Wagner R. I., Kozlov A. P. Treatment of skin melanoma with pulsed radiation from a neodymium laser // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1, № 4. P. 448–454.
413. Littlefield T. R., Koepnick R. G., Binder P. S., Geggel H. S. New method for reshaping of cornea // J. Biomed. Opt. 1997. V. 2, № 1. P. 106–114.
414. Корниловский И. М., Ражев А. М., Китай С. С., Семчишин В. А. Кератомоделирование низкоинтенсивным ультрафиолетовым излучением эксимерных лазеров // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1990. Т. 54, № 8. С. 1594–1596.
415. Moretti M. A. Status report on lasers in medicine // Laser Focus / Electro-Opt. 1987. V. 23, № 4. P. 88–90, 92, 94–97.
416. Krausse J. M., Puliafito C. A. Lasers in ophthalmology // Lasers Surg. Med. 1995. V. 17. P. 102–159.
417. Антипенко Б. М., Березин Ю. Д., Волков В. В. и др. Лазеры ближнего и среднего ИК-диапазонов в офтальмоонкологии // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1990. Т. 54, № 10. С. 1929–1934.
418. Желтов Г. И., Подольцев А. С., Кирковский А. И. и др. // Изв. РАН. Сер. физическая. 1995. Т. 59, № 6. С. 90–94.
419. Yow L., Nelson J. S., Berns M. W. Ablation of bone and polymethylmethacrylate by XeCl (308 nm) excimer laser // Lasers Surg. Med. 1989. V. 9, № 2. P. 141–147.
420. Минаев В. П., Жилин К. М. Рекомендации по выбору и применению современных лазерных аппаратов для хирургии и силовой терапии. М.: Издатель И. В. Балабанов, 2009. 48 с.
421. Соколов А. Л., Лядов К. В., Стойко Ю. М. Эндовенозная лазерная коагуляция в лечении варикозной болезни. М.: Медпрактика-М, 2007.
422. Rossi F., Matteini P., Ratto F., Menabuoni L., Lenzetti I., Pini R. «All laser» corneal surgery by combination of femtosecond laser ablation and laser tissue welding, Chapter 30 in Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by Tuchin V. V. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 799–810.
423. Ratto F., Matteini P., Rossi F., et al. Photothermal effects in connective tissues mediated by laser-activated gold nanorods // Nanomedicine 2009. V. 5, № 2. P. 143–151.
424. Stevenson D. J., Gunn-Moore F. J., Campbell P., and Dholakia K. Transfection by optical injection, Chapter 3 in Handbook of Photonics for Biomedical Science / Ed. by Tuchin V. V. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 87–117.
425. Knoll T., Trojan L., Langbein S., et al. Impact of holmium:YAG and neodymium:YAG lasers on the efficacy of DNA delivery in transitional cell carcinoma // Lasers Med. Sci. 2004. V. 19, № 1. P. 33–36.
426. Tuchin V. V., Utz S. R., Yaroslavsky I. V. Tissue optics, light distribution, and spectroscopy // Opt. Eng. 1994. V. 33. P. 3178–3188.
427. Graafl R., Koelink M. H., de Mul M. F. F. et al. Condensed Monte Carlo simulations for the description of light transport // Appl. Opt. 1993. V. 32, № 4. P. 426–434.

428. Yaroslavsky I. V., Tuchin V. V. An inverse Monte Carlo method for spectrophotometric data processing // Cell and biotissue optics: applications in laser diagnostics and therapy / Ed. V. V. Tuchin. Bellingham: SPIE, 1994. V. 2100. P. 57–68.
429. Roggan A., Minet O., Schröder C., Müller G. The determination of optical tissue properties with double integrating sphere technique and Monte Carlo simulations // Cell and biotissue optics: applications in laser diagnostics and therapy / Ed. V. V. Tuchin. Bellingham, SPIE, 1994. V. 2100, P. 42–56.
430. Zimnyakov D. A., Tuchin V. V., Mishin A. A. et al. *In vitro* human sclera structure analysis using tissue optical immersion effect // Proc. SPIE, Bellingham, SPIE, 1996. V. 2673–44.
431. Zimnyakov D. A., Tuchin V. V., Mishin A. A. Spatial speckle correlometry in applications to tissue structure monitoring // App. Opt. 1997. V. 36. P. 5594–5607.
432. Schmitt J. M., Yadlowsky M., Bonner R. F. Subsurface imaging of living skin with optical coherence microscopy // Dermatology. 1995. V. 191. P. 93–98.
433. Izatt J. A., Kulkarni M. D., Kobayashi K. et al. Optical coherence tomography for biodiagnostics // Opt. Photon. News. 1997. V. 8, № 5. P. 41–47, 65.
434. Fercher A. F., Drexler W., Hitzenberger C. K. Ocular partial-coherence interferometry // Coherence-domain methods in biomedical optics / Ed. V. V. Tuchin. Bellingham, SPIE, 1996. V. 2732. P. 210–228; Fercher A. F., Drexler W., Hitzenberger C. K. Ocular partial-coherence tomography // Ibid. P. 229–241.
435. Schmitt J. M. Array detection for speckle reduction in optical coherence microscopy // Phys. Med. Biol. 1997. V. 42. P. 1427–1439.
436. Геликонов В. М., Геликонов Г. В., Гладкова Н. Д. и др. Когерентная оптическая томография микронеоднородностей биотканей // Письма ЖЭТФ. 1995. Т. 61. С. 149–153.
437. Tearney G. J., Brezinski M. E., Bouma B. E. et al. *In vivo* endoscopic optical biopsy with optical coherence tomography // Science. 1997. V. 276. P. 2037–2039.
438. Chen Z., Milner T., Srinivas S. et al. Noninvasive imaging of *in-vivo* blood flow velocity using optical Doppler tomography // Opt. Lett. 1997. V. 22. P. 1119–1121.
439. Noninvasive diagnostics techniques in ophthalmology / Ed. B. R. Masters. N. Y.: Springer-Verlag, 1990.
440. Confocal microscopy / Ed. T. Wilson. L.: Academic Press, 1990.
441. Masters B. R., Thaeer A. A. Real time scanning slit confocal microscopy of the *in vivo* human cornea // Appl. Opt. 1994. V. 33. P. 695–701.
442. Rajadhyaksha M., Grossman M., Esterowitz D., Webb R. H., and Anderson R. R. *In vivo* confocal scanning laser microscopy of human skin: Melanin provides strong contrast // J. Invest. Dermatol. 1995. V. 104. P. 946–952.
443. Selected papers on confocal microscopy / Ed. B. Masters. Bellingham, SPIE, 1996. V. MS131.
444. Kimura Y., Wilder-Smith P., Krasieva T. et al. Visualization and quantification of dentin structure using confocal laser scanning microscopy // J. Biomed. Opt. 1997. V. 2, № 3. P. 267–274.
445. New K. C., Petroll W. M., Boyde A. et al. *In vivo* imaging of human teeth and skin using real-time confocal microscopy // Scanning. 1991. V. 13. P. 369–372.
446. Kempe M., Rudolph, Welsch E. Comparative study of confocal and heterodyne microscopy for imaging through scattering media // J. Opt. Soc. Am. A. 1996. V. 13, № 1. P. 46–52.
447. Жевандров Н. Д. Поляризация физиологическая оптика // Успехи физ. наук. 1995. Т. 165. С. 1193–1213.
448. Чандрасекар С. Перенос лучистой энергии. М.: ИЛ, 1953.
449. Гермогенова Т. А. Локальные свойства решений уравнения переноса. М.: Наука, 1986.
450. Ishimaru A. Diffusion of light in turbid material // Appl. Opt. 1989. V. 28. P. 2210–2215.
451. Farrell T. J., Patterson M. S., Wilson B. C. A diffusion theory model of spatially resolved, steady-state diffuse reflectance for the noninvasive determination of tissue optical properties *in vivo* // Med. Phys. 1992. V. 19. P. 881–888.
452. Keijzer M., Star W. M., Storchi P. R. M. Optical diffusion in layered media // Appl. Opt. 1988. V. 27. P. 1820–1824.

453. Yoon G., Prahl S.A., Welch A.J. Accuracies of the diffusion approximation and its similarity relations for laser irradiated biological media // *Appl. Opt.* 1989. V. 28. P. 2250–2255.
454. Yoo K.M., Liu F., Alfano R.R. When does the diffusion approximation fail to describe photon transport in random media? // *Phys. Rev. Lett.* 1990. V. 64, № 22. P. 2647–2650.
455. Dayan I., Halvin S., Weiss G.H. Photon migration in a 2-layer turbid medium — a diffusion analysis // *J. Modern Opt.* 1992. V. 39, № 7. P. 1567–1582.
456. Boas D.A., Meglinsky I.V., Zemaný L. et al. Diffusion of temporal field correlation with selected applications // *Coherence-domain methods in biomedical optics* / Ed. V.V. Tuchin. Bellingham, SPIE, 1996. V. 2732. P. 34–46.
457. Motamedi M., Rastegar S., LeCarpentier G., Welch A.J. Light and temperature distribution in laser irradiated tissue the influence of anisotropic scattering and refractive index // *Appl. Opt.* 1989. V. 28. P. 2230–2237.
458. Arridge S.R., Schweiger M., Hiraoka M., Delpy D.T. A finite element approach for modelling photon transport in tissue // *Med. Phys.* 1993. V. 20. P. 299–309.
459. Ермаков С.М., Михайлов Г.А. Курс статистического моделирования. М.: Наука, 1982.
460. Соболев И.М. Численные методы Монте Карло. М.: Наука, 1973.
461. Wilson B.C., Adam G.A. Monte Carlo model for the absorption and flux distributions of light in tissue // *Med. Phys.* 1983. V. 10. P. 824–830.
462. Keijzer M., Jacques S.L., Prahl S.A., Welch A.J. Monte Carlo simulation for finite-diameter laser beams // *Lasers Surg. Med.* 1989. V. 9. P. 148–154.
463. Keijzer M., Richards-Kortum R.R., Jacques S.L., Feld M.S. Fluorescence Spectroscopy of Turbid Media: Autofluorescence of the Human Aorta // *Appl. Opt.* 1989. V. 28, № 20. P. 4286–4292.
464. Ярославский И.В., Тучин В.В. Распространение света в многослойных рассеивающих средах. Моделирование методом Монте Карло // *Опт. спектр.* 1992. Т. 72. С. 934–939.
465. Jacques S.L., Wang L. Monte Carlo modeling of light transport in tissues // *Optical-thermal response of laser-irradiated tissue* / Eds. A.J. Welch, M.J.C. van Gemert. N.Y.: Plenum Press, 1995. P. 73–100.
466. Wang L., Jacques S.L., Zheng L. MCML — Monte Carlo modeling of light transport in multi-layered tissues // *Comput. Meth. Progr. Biomed.* 1995. V. 47. P. 131–146.
467. Flock S.T., Wilson B.C., Wyman D.R., Patterson M.S. Monte Carlo modeling of light-propagation in highly scattering tissues I: model predictions and comparison with diffusion theory // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 1989. V. 36, № 10. P. 1162–1168.
468. Wang L.H., Jacques S.L. Hybrid model of the Monte Carlo simulation and diffusion theory for light reflectance by turbid media // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1993. V. 10. P. 1746–1752.
469. Кандидов В.П., Милицин В.О., Быков А.В., Приезжев А.В. Использование корпускулярного и волнового методов Монте-Карло в оптике дисперсных сред // *Квантовая электроника* 2006. Т. 36, № 11. С. 1003–1008.
470. Arridge S.R., Hiraoka M., Schweiger M. Statistical basis for the determination of optical pathlength in tissue // *Phys. Med. Biol.* 1995. V. 40. P. 1539–1558.
471. Jacques S.L. The role of skin optics in diagnostic and therapeutic uses of lasers // *Lasers in dermatology*. B., Springer-Verlag, 1991. P. 1–21.
472. Okada E., Firbank M., Schweiger M. et al. Theoretical and experimental investigation of near-infrared light propagation in a model of the adult head // *Appl. Opt.* 1997. V. 36, № 1. P. 21–31.
473. Troy T.L., Page D.L., Sevick-Muraca E.M. Optical properties of normal and diseased breast tissues: prognosis for optical mammography // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 3. P. 342–355.
474. Tuchin V.V., Utz S.R., Yaroslavsky I.V. Skin optics: modeling of light transport and measuring of optical parameters // *Medical optical tomography: functional imaging and monitoring* / Eds. G. Müller, B. Chance, R. Alfano et al. Bellingham: SPIE, 1993. V. IS11. P. 234–258.
475. Schmitt J.M., Zhou G.X., Walker E.C., Wall R.T. Multilayer model of photon diffusion in skin // *J. Opt. Soc. Am.* 1990. V. A7. P. 2141–2153.

476. Graaff R., Dassel A.C.M., Koelink M.H. et al. Optical properties of human dermis *in vitro* and *in vivo* // Appl. Opt. 1993. V. 32. P. 435–447.
477. Everett M.A., Yeagers E., Sayre R.M., Olson R.L. Penetration of epidermis by ultraviolet rays // Photochem. Photobiol. 1966. V. 5. P. 533–542.
478. Keijzer M., Pickering J.M., van Gemert M.J.C. Laser beam diameter for portwine stain treatment // Laser Surg. Med. 1991. V. 11. P. 601–605.
479. van Gemert M.J.C., Smithies D.J., Verkruijse W. et al. Wavelengths for port wine stain laser treatment: influence of vessel radius and skin anatomy // Phys. Med. Biol. 1997. V. 42. P. 41–50.
480. Kienle A., Hibst R. A new optimal wavelength for treatment of port wine stains? // Phys. Med. Biol. 1995. V. 40. P. 1559–1576.
481. Щербаков Ю.Н., Якунин А.Н., Ярославский И.В., Тучин В.В. Моделирование тепловых процессов при взаимодействии некоагулирующего лазерного излучения с многослойной биотканью. 1. Теория и модели расчета // Опт. спектр. 1994. Т. 76, № 5. С. 845–849.
482. Щербаков Ю.Н., Якунин А.Н., Ярославский И.В., Тучин В.В. Моделирование тепловых процессов при взаимодействии некоагулирующего лазерного излучения с многослойной биотканью. 2. Численные модели // Опт. спектр. 1994. Т. 76, № 5. С. 850–857.
483. Tuchin V.V., Scherbakov Yu.N., Yakunin A.N., Yaroslavsky I.V. Numerical technique for modeling of laser-induced hyperthermia // Laser-induced interstitial thermotherapy / Eds. G. Müller, A. Roggan. Bellingham, SPIE Press, 1995. P. 100–113.
484. Dillon J. The photophysics and photobiology of the eye // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1991. V. 10. P. 23–40.
485. van Gemert M.J.C., Welch A.J., Pickering J.W. et al. Wavelengths for laser treatment of port wine stains and telangiectasia // Lasers Surg. Med. 1995. V. 16. P. 147–155.
486. Henderson A.R. A Guide to Laser Safety. London: Chapman & Hall, 1997.
487. Барун В.В., Иванов А.П. Тепловое воздействие короткого импульса света на биологические ткани II. Световые и тепловые поля // Биофизика. 2005. Т. 50, № 1. С. 132–139.
488. Минин И.Н. Теория переноса излучения в атмосфере планет. М.: Наука, 1988.
489. Cai W., Das B.B., Liu F. et al. Time-resolved optical diffusion tomographic image reconstruction in highly scattering media // Proc. Math. Acad. Sci. USA. 1996. V. 93. P. 13561–13564.
490. Arridge S.R., Hebden J.C. Optical imaging in medicine II: modelling and reconstruction // Phys. Med. Biol. 1997. V. 42. P. 841–854.
491. Patterson M.S., Chance B., Wilson B.C. Time resolved reflectance and transmittance for the non-invasive measurement of tissue optical properties // Appl. Opt. 1989. V. 28. P. 2331–2336.
492. Jacques S.L. Time-resolved reflectance spectroscopy in turbid tissues // IEEE Trans. Biomed. Eng. 1989. V. 36. P. 1155–1161.
493. Matcher S.J., Cope M., Delpy D.T. In vivo measurements of the wavelength dependence of tissue-scattering coefficients between 760 and 900 nm measured with time-resolved spectroscopy // Appl. Opt. 1997. V. 36, № 1. P. 386–396.
494. Cui W., Wang N., Chance B. Study of photon migration depths with time-resolved spectroscopy // Opt. Lett. 1991. V. 16. P. 1632–1634.
495. Ferrari M., Wei Q., Carraresi L. et al. Time-resolved spectroscopy of the human forearm // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 1992. V. 16. P. 141–153.
496. Hielscher A.H., Liu H., Chance B. et al. Time-resolved photon emission from layered turbid media // Appl. Opt. 1996. V. 35. P. 719–728.
497. de Haller E.B., Depeursinge C. Simulation of the time-resolved breast transillumination // Med. Biol. Eng. Comp. 1993. V. 31. P. 165–170.
498. Andersson-Engels S., Berg R., Svanberg S., Jarlman O. Time-resolved transillumination for medical diagnostics // Opt. Lett. 1990. V. 15. P. 1179–1181.
499. Wang L., Ho P.P., Liu C. et al. Ballistic 2-D imaging through scattering walls using an ultrafast optical Kerr gate // Science. 1991. V. 253. P. 769–771.

500. Das B. B., Yoo K. M., Alfano R. R. Ultrafast time-gated imaging in thick tissues: a step toward optical mammography // *Opt. Lett.* 1993. V. 18. P. 1092–1094.
501. Любимов В. В. Перенос изображения в плоском слое рассеивающей среды и оценка разрешающей способности при оптической томографии на первопршедших фотонах ультракоротких импульсов // *Опт. спектр.* 1994. Т. 76. С. 814–815.
502. Yao Y. Q., Wang Y., Pei Y. L. et al. Frequency-domain optical imaging of absorption and scattering distributions by Born iterative method // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1997. V. 14, № 1. P. 325–342.
503. Cubeddu R., Pifferi A., Taroni P. et al. Time-resolved imaging on a realistic tissue phantom: μ'_s and μ_a images versus time-integrated images // *Appl. Opt.* 1996. V. 35. P. 4533–4540.
504. Arridge S. R., Cope M., Delpy D. T. Theoretical basis for the determination of optical pathlengths in tissue: temporal and frequency analysis // *Phys. Med. Biol.* 1992. V. 37. P. 1531–1560.
505. de Haller E. B. Time-resolved transillumination and optical tomography // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 1. P. 7–17.
506. Heusmann H., Kolzer J., Mitic G. Characterization of female breast *in vivo* by time resolved and spectroscopic measurements in near infrared spectroscopy // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 4. P. 425–434.
507. Suzuki K., Yamashita Y., Ohta K. et al. Quantitative measurement of optical parameters in normal breast using time-resolved spectroscopy: *In vivo* results of 30 Japanese women // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 3. P. 330–334.
508. Taddeucci A., Martelli F., Barilli M. et al. Optical properties of brain tissue // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 1. P. 117–130.
509. Ярославский И. В., Ярославская А. Н., Родригес Х., Баттарби Г. Распространение импульсов и волн фотонной плотности в мутных средах // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1* / Под ред. Тучина В. В. М.: Физматлит, 2007. С. 197–233; пер. с англ. под ред. Тучина В. В. *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics* / Ed. by Tuchin V. V. Bellingham, WA: SPIE Press, 2002.
510. Родригес Х., Ярославский И. В., Ярославская А. Н., Баттарби Г., Тучин В. В. Визуализация с временным разрешением в рассеивающих средах // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1* / Под ред. Тучина В. В. М.: Физматлит, 2007. С. 312–356; пер. с англ. под ред. Тучина В. В. *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics* / Ed. by Tuchin V. V. Bellingham, WA: SPIE Press, 2002.
511. Delpy D. T., Ferrari M., Piantadosi C. A., and Tamura M. Special section on Pioneers in biomedical optics: F. F. Jöbsis // *J. Biomed. Opt.* 2007. V. 12, no. 6. P. 062101–62113.
512. Ferrante S., Contini D., Spinelli L. et al. Monitoring muscle metabolic indexes by time-domain near-infrared spectroscopy during knee flex-extension induced by functional electrical stimulation // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14, № 4. P. 044011-1–11.
513. Martelli F., Bassani M., Alianelli L., Zangheri L., and Zaccanti G. Accuracy of the diffusion equation to describe photon migration through an infinite medium: numerical and experimental investigation // *Phys. Med. Biol.* 2000. V. 45. P. 1359–1373.
514. Del Bianco S., Martelli F., and Zaccanti G. Penetration depth of light re-emitted by a diffusive medium: theoretical and experimental investigation // *Phys. Med. Biol.* 2002. V. 47. P. 4131–4144.
515. Tualle J.-M., Tinet E., Prat J., and Avriillier S. Light propagation near-turbid — turbid planar interfaces // *Opt. Commun.* 2000. V. 183. P. 337–346.
516. Wilson M. J. and Wang R. K. A path-integral model of light scattered by turbid media // *J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.* 2001. V. 34. P. 1453–1472.
517. Wang R. K. and Wilson M. J. Vertex/propagator model for least-scattered photons traversing a turbid medium // *J. Opt. Soc. Am. A.* 2001. V. 18, № 1. P. 224–231.
518. Tsuchiya Y. Photon path distribution and optical responses of turbid media: theoretical analysis based on the microscopic Beer–Lambert Law // *Phys. Med. Biol.* 2001. V. 46. P. 2067–2084.
519. Zacharakis G., Zolindaki A., Sakkalis V., Filippidis G., Papazoglou T. G., Tsiptsis D. D., and Koumantakis E. *In vitro* optical characterization and discrimination of female breast

- tissue during near infrared femtosecond laser pulses propagation // J. Biomed. Opt. 2001. V. 6, № 4. P. 446–449.
520. Chernomordik V., Gandjbakhche A., Lepore M., Esposito R., and Delfino I. Depth dependence of the analytical expression for the width of the point spread function (spatial resolution) in time-resolved transillumination // J. Biomed. Opt. 2001. V. 6, № 4. P. 441–445.
521. Chernomordik V., Hattery D. W., Gannot I., Zaccanti G., and Gandjbakhche A. Analytical calculation of the mean time spent by photons inside an absorptive inclusion embedded in a highly scattering medium // J. Biomed. Opt. 2002. V. 7, № 3. P. 486–492.
522. Chernomordik V., Hattery D. W., Grosenick D., et al. Quantification of optical properties of a breast tumor using random walk theory // J. Biomed. Opt. 2002. V. 7, № 1. P. 80–87.
523. Elaloufi R., Carminati R., and Greffet J.-J. Time-dependent transport through scattering media: from radiative transfer to diffusion // J. Opt. A: Pure Appl. Opt. 2002. V. 4. S103–S108.
524. Lyubimov V. V., Kalintsev A. G., Konovalov A. B., et al. Application of the photon average trajectories method to real-time reconstruction of tissue inhomogeneities in diffuse optical tomography of strongly scattering media // Phys. Med. Biol. 2002. V. 47. P. 2109–2128.
525. Khan T. and Jiang H. A new diffusion approximation to the radiative transfer equation for scattering media with spatially varying refractive indices // J. Opt. A: Pure Appl. Opt. 2003. V. 5. P. 137–141.
526. Воронов А. В., Третьяков Е. В., Шувалов В. В. Быстрое интегрирование по путям при моделировании распространения света через сильно рассеивающие объекты // Квантовая электроника 2004. Т. 34, № 6. С. 547–553.
527. Петникова В. М., Третьяков Е. В., Шувалов В. В. Устойчивость фазовой функции Хензи–Гринштейна и быстрое интегрирование по путям в условиях многократного рассеяния света // Квантовая электроника 2006. Т. 36, № 11. С. 1039–1042.
528. Сергеева Е. А., Кириллин М. Ю., Приезжев А. В. Распространение фемтосекундного импульса в рассеивающей среде: теоретический анализ и численное моделирование // Квантовая электроника 2006. Т. 36, № 11. С. 1023–1031.
529. Иванов А. П., Лойко В. А., Дик В. П. Распространение света в плотноупакованных дисперсных средах. Минск: Наука и техника, 1988.
530. Тучин В. В. Основы взаимодействия низкоинтенсивного лазерного излучения с биотканями: дозиметрический и диагностический аспекты // Изв. РАН. Сер. физическая. 1995. Т. 59, № 6. С. 120–143.
531. Фантини С., Францезини М. А. Фазово-модуляционные методы спектроскопии тканей и формирования изображений // Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1 / Под ред. Тучина В. В. М.: Физматлит, 2007. С. 357–397; пер. с англ. под ред. Тучина В. В. Handbook of Optical Biomedical Diagnostics / Ed. by Tuchin V. V. Bellingham, WA: SPIE Press, 2002.
532. Матчер С. Дж. Количественное определение и локализация сигнала в спектроскопии ближнего инфракрасного диапазона // Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1 / Под ред. Тучина В. В. М.: Физматлит, 2007. С. 427–505; пер. с англ. под ред. Тучина В. В. Handbook of Optical Biomedical Diagnostics / Ed. by Tuchin V. V. Bellingham, WA: SPIE Press, 2002.
533. Papaioannou D. G., Hooft G. W., Colak S. B., Oostveen J. T. Detection limit in localizing objects hidden in a turbid medium using an optically scanned phased array // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1, № 3. P. 305–310.
534. Pogue B. W., Patterson M. S. Error assessment of a wavelength tunable frequency domain system for noninvasive tissue spectroscopy // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1, № 3. P. 311–323.
535. Yaroslavsky I. V., Tuchin V. V. Determination of optical parameters of biotissues by measuring modulation characteristics of scattered laser radiation // BRAS Physics / Suppl. Phys. Vibrations. 1994. V. 58, № 4.
536. Haskell R. C., Svaasand L. O., Tsay T.-T. et al. Boundary conditions for the diffusion equation in radiative transfer // J. Opt. Soc. Am. A. 1994. V. 11, № 10. P. 2727–2741.

537. Tromberg B.J., Svaasand L.O., Tsay T.-T., Haskell R.C. Properties of photon density waves in multiple-scattering media // *Appl. Opt.* 1993. V. 32. P. 607–616.
538. O'Leary M.A., Boas D.A., Chance B., Yodh A. Refraction of diffuse photon waves // *Phys. Rev. Lett.* 1992. V. 69. P. 2658–2661.
539. Boas D.A., O'Leary M.A., Chance B., Yodh A.G. Scattering and wavelength transduction of diffuse photon density waves // *Phys. Rev. E.* 1993. V. 47. P. R2999–R3002.
540. Boas D.A., O'Leary M.A., Chance B., Yodh A.G. Scattering of diffuse photon density waves by spherical inhomogeneities within turbid media: analytic solution and applications // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 4887–4891.
541. Lakowicz J.R., Berndt K. Frequency-domain measurements of photon migration in tissues // *Chem. Phys. Lett.* 1990. V. 166. P. 246–252.
542. Patterson M.S., Moulton J.D., Wilson B.C. *et al.* Frequency-domain reflectance for the determination of the scattering and absorption properties of tissue // *Appl. Opt.* 1991. V. 30. P. 4474–4476.
543. Schmitt J.M., Knüttel A., Knutson J.R. Interference of diffusive light waves // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1992. V. 9. P. 1832–1843.
544. Fishkin J.B., Gratton E. Propagation of photon-density waves in strongly scattering media containing an absorbing semi-infinite plane bounded by a straight edge // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1993. V. 10. P. 127–140.
545. Svaasand L.O., Tromberg B.J., Haskell R.C. *et al.* Tissue characterization and imaging using photon density waves // *Opt. Eng.* 1993. V. 32. P. 258–266.
546. Мазуренко Ю.Т. Спектрально-корреляционный метод получения изображений сильно-рассеивающих объектов // *Опт. спектр.* 1994. Т. 76. С. 816–821.
547. Jiang H.B., Paulsen K.D., Osterberg U.L., Patterson M.S. Frequency-domain optical-image reconstruction in turbid media — an experimental study of single-target detectability // *Appl. Opt.* 1997. V. 36. P. 52–63.
548. Madsen S.J., Wyst P., Svaasand L.O. *et al.* Determination of the optical properties of the human uterus using frequency-domain photon migration and steady-state techniques // *Phys. Med. Biol.* 1994. V. 39, № 8. P. 1191–1202.
549. Li X.D., Durduran T., Yodh A.G. *et al.* Diffraction tomography for biochemical imaging with diffuse photon-density waves // *Opt. Lett.* 1997. V. 22. P. 573–575.
550. Matson C.L., Clark N., McMackin L., Fender J.S. Three-dimensional tumor localization in thick tissue with the use of diffuse photon-density waves // *Appl. Opt.* 1997. V. 36. P. 214–220.
551. Chance B. Optical method // *Annual Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1991. V. 20. P. 1–28.
552. Pogue B.W., Patterson M.S. Frequency-domain optical absorption spectroscopy of finite tissue volumes using diffusion theory // *Phys. Med. Biol.* 1994. V. 39. P. 1157–1180.
553. Pogue B.W., Patterson M.S., Jiang H., Paulsen K.D. Initial assessment of a simple system for frequency domain diffuse optical tomography // *Phys. Med. Biol.* 1995. V. 40. P. 1709–1729.
554. Wu X., Stinger L., Faris G.W. Determination of tissue properties by immersion in a matched scattering fluid // *Proc. SPIE, Bellingham: SPIE,* 1997. V. 2979. P. 300–306.
555. Fantini S., Franceschini M.A., Fishkin J.B. *et al.* Quantitative determination of the absorption and spectra of chromophores in strongly scattering media: a light-emitting-diode based technique // *Appl. Opt.* 1994. V. 32. P. 5204–5212.
556. Franceschini M.A., Moesta K.T., Fantini S. Frequency-domain techniques enhance optical mammography: initial clinical results // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. P. 6468–6473.
557. Yaroslavsky I.V., Yaroslavskaya A.N., Tuchin V.V., Schwarzmaier H.-J. Effect of the scattering delay on time-dependent photon migration in turbid media // *Appl. Opt.* 1997. V. 36, № 22. P. 6529–6538.
558. Тучин В.В. Методы измерения параметров волоконных световодов. М.: ЦНИИ «Электроника», 1987.
559. Wabnitz H., Rinneberg H. Imaging in turbid media by photon density waves: spatial resolution and scaling relations // *Appl. Opt.* 1997. V. 36, № 1. P. 67–73.

560. Boas D.A., O'Leary M.A., Chance B., Yodh A. Detection and characterization of optical inhomogeneities with diffuse photon density waves: a signal-to-noise analysis // *Appl. Opt.* 1997. V. 36. P. 75–92.
561. Knüttel A., Schmitt J.M., Knutson J.R. Spatial localization of absorbing bodies by interfering diffusive photon-density waves // *Appl. Opt.* 1993. V. 32. P. 381–389.
562. Fantini S., Franceschini M.A., Gratton E. Semi-infinite-geometry boundary problem for light migration in highly scattering media: a frequency-domain study in the diffusion approximation // *J. Opt. Soc. Am. B.* 1994. V. 11. P. 2128–2138.
563. Moon J.A., Reintjes J. Image resolution by use of multiply scattered light // *Opt. Lett.* 1994. V. 19. P. 521–523.
564. Maier J.S., Walker S.A., Fantini S. et al. Possible correlation between blood glucose concentration and the reduced scattering coefficient of tissues in the near infrared // *Opt. Lett.* 1994. V. 19. P. 2062–2064.
565. Kohl M., Cope M., Essenpreis M., Böcker D. Influence of glucose concentration on light scattering in tissue-simulating phantoms // *Opt. Lett.* 1994. V. 19. P. 2170–2172.
566. Bruulsema J.T., Hayward J.E., Farrell T.J. et al. Correlation between blood glucose concentration in diabetics and noninvasively measured tissue optical scattering coefficient // *Opt. Lett.* 1997. V. 22, № 3. P. 190–192.
567. Синичкин Ю.П., Утц С.П., Пилипенко Е.А. Спектроскопия кожи человека in vivo. 1. Спектры отражения // *Опт. спектр.* 1996. Т. 80, № 2. С. 260–267.
568. Синичкин Ю.П., Утц С.П., Меглинский И.В., Пилипенко Е.А. Спектроскопия кожи человека in vivo. 2. Спектры флуоресценции // *Опт. спектр.* 1996. Т. 80, № 3. С. 431–438.
569. Gopinath S.P., Robertson C.S., Grossman R.G., Chance B. Near-infrared spectroscopic localization of intracranial hematomas // *J. Neurosurg.* 1993. V. 79. P. 43–47.
570. Рвачев В.П. Методы оптики светорассеивающих сред в физике и биологии. Минск: Изд-во Белорус. ун-та, 1978.
571. Лойко В.А., Молочко В.И. Когерентное пропускание и отражение монослоя дискретных рассеивателей при наклонном падении световой волны // *Опт. спектр.* 1995. Т. 79. С. 329–336.
572. Королевич А.Н., Хайруллина А.Я., Шубочкин Л.П. Влияние агрегированности крупных биологических частиц на элементы матрицы рассеяния света // *Опт. спектр.* 1994. Т. 77. С. 278–282.
573. Буланов В.М., Максимова И.Л., Татаринцев С.Н., Шубочкин Л.П. Спектральные характеристики дисперсных систем с учетом многократного рассеяния в приближении малых углов // *Опт. спектр.* 1993. Т. 74. С. 710–716.
574. Приезжев А.В., Фирсов Н.Н., Ладеманн Ю. Диагностика агрегации эритроцитов в пробах цельной крови методом обратного светорассеяния // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 2* / Под ред. Тучина В.В. М.: Физматлит, 2007. С. 17–35; пер. с англ. под ред. Тучина В.В. *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics* / Ed. by Tuchin V.V. Bellingham, WA: SPIE Press, 2002.
575. Sevick E.M., Chance B., Leigh J. et al. Quantitation of time- and frequency-resolved optical spectra for the determination of tissue oxygenation // *Anal. Biochem.* 1991. V. 195. P. 330–351.
576. Curcio G., Ferrara M., Limongi T. et al. Acute mobile phones exposure affects frontal cortex hemodynamics as evidenced by functional near-infrared spectroscopy // *J. Cerebral Blood Flow & Metabolism* 2009. V. 29. P. 903–910.
577. Fedosov I.V., Ulyanov S.S., Galanzha E.I., Galanzha V.A., and Tuchin V.V. Laser Doppler and speckle techniques for bioflow measurements. Chapter 10 // *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by Tuchin V.V. Boston, Dordrecht, London: Kluwer Academic Publishers. V. 1, 2004. P. 397–435.
578. Ло Ш., Ценг Ш., Чанс Б., Ниока Ш. Исследование активности головного мозга методом инфракрасной спектроскопии // *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1* / Под ред. Тучина В.В. М.: Физматлит, 2007. С. 398–425; пер. с англ. под ред. Тучина В.В.

- Handbook of Optical Biomedical Diagnostics / Ed. by Tuchin V. V. Bellingham, WA: SPIE Press, 2002.
579. Воробьев Н. С., Подгаецкий В. М., Смирнов А. В., Терещенко С. А. Ослабление и рассеяние вперед лазерного излучения малой длительности в сильнорассеивающей среде // Квант. электроника. 1997. Т. 24, № 7. С. 667–670.
580. Терещенко С. А., Подгаецкий В. М., Воробьев Н. С., Смирнов А. В. Раздельное наблюдение баллистических и рассеянных фотонов при распространении коротких лазерных импульсов в сильно рассеивающей среде // Квант. электроника. 1998. Т. 25, № 7. С. 853–856.
581. Воробьев Н. С., Подгаецкий В. М., Смирнов А. В., Терещенко С. А. Наблюдение временного разделения фотонов в лазерном УКИ, прошедшем через рассеивающую среду // Квант. электроника. 1999. Т. 28, № 8. С. 181–182.
582. Hyde S. C. W., Barry N. P., Jones R., Dainty J. C., and French P. M. W. High resolution depth resolved imaging through scattering media using time resolved holography // Opt. Commun. 1996. V. 122. P. 111–116.
583. Hauger C., Baigar E., Wilhelm T., and Zinth W. Time-resolved backscattering of femtosecond pulses from scattering media — an experimental and numerical investigation // Opt. Commun. 1996. V. 131. P. 351–358.
584. Demos S. G. and Alfano R. R. Optical polarization imaging // Appl. Opt. 1997. V. 36. P. 150–155.
585. Duncan M. D., Mahon R., Tankersley L. L., and Reintjes J. Time-gated imaging through scattering media using stimulated Raman amplification // Opt. Letts. 1991. V. 16, № 23. P. 1868–1870.
586. Mahon R., Duncan M. D., Tankersley L. L., and Reintjes J. Time-gated imaging through dense scatterers with a Raman amplifier // Appl. Opt. 1993. V. 32, № 36. P. 7425–7433.
587. Le Tolguenec G., Devaux F., and Lantz E. Two-dimensional time-resolved direct imaging through thick biological tissues: a new step toward noninvasive medical imaging // Opt. Letts. 1999. V. 24, № 15. P. 1047–1049.
588. Benaron D. A., Stevenson D. K. Optical time-of-flight and absorbance imaging of biologic media // Science. 1993. V. 259. C. 1463–1466.
589. Eda H., Oda I., Ito Y., et al. Multichannel time-resolved optical tomographic imaging system // Rev. Sci. Instrum. 1999. V. 70. P. 3595–3602.
590. Schmidt F. E. W., Fry M. E., Hillman E. M. C., Hebden J. C., and Delpy D. T. A 32-channel time-resolved instrument for medical optical tomography // Rev. Sci. Instrum. 2000. V. 71. P. 256–265.
591. Schweiger M. and Arridge S. University College London // <http://web4.cs.ucl.ac.uk/research/vis/toast/>
592. Yates T., Hebden J. C., Gibson A. P. et al. Optical tomography of the breast using a multi-channel time-resolved imager. Phys. Med. Biol. 2005. V. 50. P. 2503–2517.
593. Grosenick D., Wabnitz H., Rinneberg H. H., et al. Optical mammograph and first *in vivo* applications // Appl. Opt. 1999. V. 38. P. 2927–2943.
594. Grosenick D., Moesta K. T., Moller M. et al. Time-domain scanning optical mammography: I. Recording and assessment of mammograms of 154 patients // Phys. Med. Biol. 2005. V. 50. P. 2429–2449.
595. Grosenick D., Wabnitz H., Moesta K. T. et al. Time-domain scanning optical mammography: II. Optical properties and tissue parameters of 87 carcinomas // Phys. Med. Biol. 2005. V. 50. P. 2451–2468.
596. Fantini S. and Taroni P. Optical mammography // Cancer Imaging: Lung and Breast Carcinomas / Ed. By Hayat M. A. N. Y.: Elsevier, 2007. P. 449–458.
597. Xu R. X. and Povoski S. P. Diffuse optical imaging and spectroscopy for cancer // Expert Rev. Med. Devices 2007. V. 4, № 1. P. 83–95.
598. Leff D. R., Warren O. J., Enfield L. C. et al. Diffuse optical imaging of the healthy and diseased breast: A systematic review // Breast Cancer Res. Treat. 2008. V. 108, № 1. P. 9–22.

599. Hintz S.R., Cheong W.F., van Houten J.P., et al. Bedside imaging of intracranial hemorrhage in the neonate using light: Comparison with ultrasound, computed tomography, and magnetic resonance imaging // *Pediatr. Res.* 1999. V. 45. P. 54–59.
600. Wolf M., Ferrari M., and Quaresima V. Progress of near-infrared spectroscopy and tomography for brain and muscle clinical applications // *J. Biomed. Opt.* 2007. V. 12, № 6. P. 062104-1–14.
601. Воробьев Н.С., Подгаецкий В.М., Смирнов А.В., Терещенко С.А., Томилова Л.Г. Улучшение оптического изображения объектов в сильно рассеивающей среде с помощью контрастирующих красителей. *Квантовая электроника.* 1999. Т. 29, № 12. С. 261–264.
602. Yuan Z., Zhang Q., Sobel E., and Jiang H. Comparison of diffusion approximation and higher order diffusion equations for optical tomography of osteoarthritis // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14, № 5. P. 054013-1–8.
603. Gotz L., Heywang-Köbrunner S.H., Schütz O., and Siebold H. Optische mammographie an präoperativen patientinnen // *Akt. Radiol.*, 1998. V. 8. P. 31–33.
604. Chance B., Anday E., Nioka S. et al. A novel method for fast imaging of brain function, non-invasively, with light // *Optics Express* 1998. 2, 411–423.
605. Arridge S.R. Optical tomography in medical imaging // *Inverse Problems* 1999. V. 15. P. R41–R93.
606. Markel V.A., Schotland J.C. Inverse problem in optical diffusion tomography. 1 Fourier–Laplace inversion formulas // *J. Opt. Soc. Am. A.* 2001. V. 18. P. 1336–1347.
607. Ye J.C., Webb K.J., Bouman C.A., and Millane R.P. Optical diffusion tomography by iterative-coordinate-descent optimization in a Bayesian framework // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1999. V. 16. P. 2400–2412.
608. Волконский В.Б., Кравченко О.В., Любимов В.В. и др. Использование статистических характеристик траекторий фотонов для томографического исследования оптических макронеоднородностей в сильно рассеивающих объектах // *Опт. спектр.* 1999. Т. 86. С. 299–306.
609. Волконский В.Б., Кравченко О.В., Любимов В.В., Скотников В.А. Траектории фотонов в сильнорассеивающей среде, облучаемой синусоидально-модулированным лазерным излучением // *Опт. спектр.* 1999. Т. 87. С. 457–460.
610. Кравченко О.В., Любимов В.В. Применение метода плавных возмущений к решению задач оптической томографии сильнорассеивающих объектов, содержащих поглощающие макронеоднородности // *Опт. спектр.* 2000. Т. 89. С. 119–124.
611. Третьяков Е.В., Шувалов В.В., Шутков И.В. Визуализация деталей сложной внутренней структуры модельных объектов методом диффузионной оптической томографии // *Квантовая электроника* 2002. Т. 32, № 11. С. 941–944.
612. Shuvalov V.V., Chursin D.A., and Shutov I.V. Spatial resolution, measuring time, and fast visualization of hidden deep phantoms in diffusion optical tomography of extended scattering objects // *Laser Phys.* 2001. V. 11. P. 636–649.
613. Orlova A.G., Turchin I.V., Plehanov V.I., Shakhova N.M., Fiks I.I., Kleshnin M.I., Konuchenko N.Yu., and Kamensky V.A. Frequency-domain diffuse optical tomography with single source-detector pair for breast cancer detection // *Laser Phys. Lett.* 2008. V. 5, № 4. P. 321–327.
614. Lee J., Saltzman D.J., Cerussi A.E., et al. Broadband diffuse optical spectroscopy measurement of hemoglobin concentration during hypovolemia in rabbits // *Physiol. Meas.* 2006. V. 27, № 8. P. 757–767.
615. Alford K. and Wickramasinghe Y. Intensity modulated near infrared spectroscopy: instrument design issues // *Proc. SPIE* 2000. V. 3911. P. 330–337.
616. Geraskin D., Platen B., Franke J., and Kohl-Bareis M. Algorithms for muscle oxygenation monitoring corrected for adipose tissue thickness // *Opt. Meth. Med. Diagn. Conf.*, October 13–16, 2005. Warsaw, Poland. P. 33–39.
617. Nissila I., Kotilahti K., Fallström K., and Katila T. Instrumentation for the accurate measurement of phase and amplitude in optical tomography // *Rev. Sci. Instrum.* 2002. V. 73. P. 3306–3331.

618. *Nelson L.A., McCann J.C., Loepke A.W., et al.* Development and validation of a multiwavelength spatial domain near-infrared oximeter to detect cerebral hypoxia-ischemia // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11, № 6. P. 064022.
619. *Giardini M.E. and Trevisan S.* Portable high-end instrument for in-vivo infrared spectroscopy using spread spectrum modulation // 21st IEEE Instrument. Meas. Techn. Conf. IMTC 04, May 18–20, 2004. Como, Italy. P. 860–863.
620. *Teng Y., Ding H., Gong Q., Jia Z., and Huang L.* Monitoring cerebral oxygen saturation during cardiopulmonary bypass using near-infrared spectroscopy: the relationships with body temperature and perfusion rate // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11, № 2. P. 024016.
621. *Brown D., Hornung R., Haensse D. et al.* Frequency-domain near-infrared spectroscopy measures tissue concentration of hemoglobin, lipids and water // The Day of Clinical Research, Univ. Hospital Zurich. March 26–27, 2004.
622. *Kashyap D.R., Chu N., Apte A., Wang B.P., and Liu H.* Development of broadband multichannel NIRS (near-infrared spectroscopy) imaging system for quantification of spatial distribution of hemoglobin derivatives // *Proc. SPIE* 2007. V. 6434. P. 64341X.
623. *Boden S., Obrig H., Kühncke C., et al.* The oxygenation response to functional stimulation: Is there a physiological meaning to the lag between parameters? // *Neuroimage* 2007. V. 36, № 1. P. 100–107.
624. *Everdell N.L., Gibson A.P., Tullis I.D.C. et al.* A frequency multiplexed near-infrared topography system for imaging functional activation in the brain // *Rev. Sci. Instrum.* 2005. V. 76. P. 093705.
625. *Akin A. and Bilensoy D.* Cerebrovascular reactivity to hypercapnia in migraine patients measured with near-infrared spectroscopy // *Brain. Res.* 2006. V. 1107, № 1. P. 206–214.
626. *Li C.J., Gong H., Gan Z., Zeng S.Q., and Luo Q.M.* Verbal working memory load affects prefrontal cortices activation: evidence from a functional NIRS study in humans // *Proc. SPIE* 2005. V. 5696. P. 33–40.
627. *Schmitz C.H., Locker M., Lasker J.M., Hielscher A.H., and Barbour R.L.* Instrumentation for fast functional optical tomography // *Rev. Sci. Instrum.* 2002. V. 73, № 2. P. 429–439.
628. *Leon-Carrion J., Damas J., Izzetoglu K. et al.* Differential time course and intensity of PFC activation for men and women in response to emotional stimuli: a functional near-infrared spectroscopy (fNIRS) study // *Neurosci. Lett.* 2006. V. 403, № 1/2. P. 90–95.
629. *Culver J.P., Schlaggar B.L., Dehghani H., and Zeff B.W.* Diffuse optical tomography for mapping human brain function // *Human Brain Mapping Meeting*. Florence, Italy, June 11–15, 2006. P. 684 T-PM.
630. *Mühlemann T., Haensse D., and Wolf M.* Ein drahtloser sensor für die bildgebende in-vivo nahinfrarotspektroskopie // 3-Ländertreffen der Deutschen, Österreichischen und Schweizerischen Gesellschaft für Biomedizinische Technik, Swiss Society of Biomedical Engineering, Sept. 6–9, 2006. Zurich. P. 60.
631. *Liebert A., Wabnitz H., Steinbrink J., et al.* Time-resolved multidistance near-infrared spectroscopy of the adult head: intracerebral and extracerebral absorption changes from moments of distribution of times of flight of photons // *Appl. Opt.* 2004. V. 43, № 15. P. 3037–3047.
632. *Selb J., Joseph D.K., and Boas D.A.* Time-gated optical system for depth-resolved functional brain imaging // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11, № 4. P. 044008.
633. *Ueda Y., Yamanaka T., Yamashita D., et al.* Reflectance diffuse optical tomography: its application to human brain mapping // *Jap. J. Appl. Phys.* 2005. V. 44, № 38. P. L1203–L1206.
634. *Contini D., Torricelli A., Pifferi A., et al.* Multichannel time-resolved tissue oximeter for functional imaging of the brain // *IEEE Trans. Instrum. Meas.* 2006. V. 55. P. 85–90.
635. *Montcel B., Chabrier R., and Poulet P.* Detection of cortical activation with time-resolved diffuse optical methods // *Appl. Opt.* 2005. V. 44, № 10. P. 1942–1947.
636. *Liebert A., Kacprzak M., and Maniewski R.* Time-resolved reflectometry and spectroscopy for assessment of brain perfusion and oxygenation // *Opt. Meth. Med. Diagn. Conf.*, October 13–16, 2005. Warsaw, Poland. P. 113–121.

637. *Nissila I., Noponen T., Kotilahti K., et al.* Instrumentation and calibration methods for the multichannel measurement of phase and amplitude in optical tomography // *Rev. Sci. Instrum.* 2005. V. 76. P. 044302.
638. *Ho D., Eom G., Lee S., and Kim B.* Study on the property measurement for tissue phantom and human tissue used of F-D DOT system // *Proc. SPIE* 2007. V. 6434. P. 643428.
639. *Kek K.J., Samizo M., Miyakawa T., Kudo N., and Yamamoto K.* Imaging of regional differences of muscle oxygenation during exercise using spatially resolved NIRS // *IEEE Eng. Med. Biol.* 27th Annu. Intern. Conf. Shanghai, China. Sept. 1–4, 2005. P. 2622–2625.
640. *Succia D.J., Bevilacqua F., Durkin A.J., and Tromberg B.J.* Modulated imaging: quantitative analysis and tomography of turbid media in the spatial-frequency domain // *Opt. Lett.* 2005. V. 30, № 11. P. 1354–1356.
641. *Акчурин Г.Г., Зимняков Д.А., Тучин В.В.* Оптоэлектронный модуль для лазерной СВЧ модуляционной спектроскопии и томографии // *Биомед. радиоэлектрон.* 2000. № 1. С. 46–53.
642. *Чурсин Д.А., Шувалов В.В., Шутов И.В.* Оптический томограф со счетом фотонов и проекционное восстановление параметров поглощающих «фантомов» в протяженных рассеивающих средах // *Квантовая электроника* 1999. Т. 29. С. 83–88.
643. *Маликов Е.В., Петникова В.М., Чурсин Д.А. и др.* Пространственное разрешение и время сканирования в оптической томографии поглощающих «фантомов» в условиях многократного рассеяния // *Квантовая электроника* 2000. Т. 30. С. 78–80.
644. *Любимов В.В., Коновалов А.Б., Кутузов И.И. и др.* Возможность увеличения пространственного разрешения в диффузионной оптической томографии // *Оптич. журн.* 2003. Т. 70, № 10. С. 37–43.
645. *Коновалов А.Б., Власов В.В., Калинин А.Г., Кравченко О.В., Любимов В.В.* Импульсная диффузионная оптическая томография на основе использования аналитических характеристик траекторий фотонов // *Квантовая электроника* 2006. Т. 36, № 11. С. 1048–1055.
646. *Коновалов А.Б., Власов В.В., Могиленских Д.В., Кравченко О.В., Любимов В.В.* Алгебраическая реконструкция и постобработка в одношаговой диффузионной оптической томографии // *Квантовая электроника* 2008. Т. 38, № 6. С. 588–596.
647. *Кравченко О.В., Любимов В.В., Калинин Н.А.* Траекторный метод восстановления изображения для флуоресцентной оптической томографии // *Квантовая электроника* 2006. Т. 36, № 11. С. 1043–1047.
648. *Котова С.П., Майоров И.В., Майорова А.М.* Применение нейронных сетей для определения оптических параметров сильно рассеивающих сред по профилю интенсивности рассеянного назад излучения // *Квантовая электроника* 2007. Т. 37, № 1. С. 22–26.
649. *Векслер Б.А., Меглинский И.В.* Использование искусственной нейронной сети для восстановления изображения внутренней структуры случайно-неоднородной среды по пространственным характеристикам рассеянного назад оптического излучения // *Квантовая электроника* 2008. Т. 38, № 6. С. 576–579.
650. *Терещенко С.А., Потапов Д.А., Подгаецкий В.М., Смирнов А.В.* Влияние преломления света на восстановление изображения в трансмиссионной оптической томографии рассеивающих сред // *Квантовая электроника* 2002. Т. 32, № 10. С. 888–890.
651. *Дьяченко А.И.* Применение методов биомеханики для обнаружения опухолей мягких тканей // *Проблемы биомеханики* 2006. Вып. 11. С. 152–166 / М.: Изд-во Моск. ун-та.
652. *de Boer J.F. and Milner T.E.* Review of polarization sensitive optical coherence tomography and Stokes vector determination // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 3. P. 359–371.
653. *Hemenger R.P.* Birefringence of a medium of tenuous parallel cylinders // *Appl. Opt.* 1989. V. 28, № 18. P. 4030–4034.
654. *Hemenger R.P.* Refractive index changes in the ocular lens result from increased light scatter // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1. P. 268–272.
655. *Maitland D.J. and Walsh J.T.* Quantitative measurements of linear birefringence during heating of native collagen // *Laser Surg. Med.* 1997. V. 20. P. 310–318.

656. Симоненко Г.В., Тучин В.В., Лакодина Н.А. Измерение оптической анизотропии тканей с использованием нематической жидко-кристаллической ячейки // *Опт. журн.* 2000. №6. С. 70–73.
657. Ангельский О.В., Ушенко А.Г., Архелюк А.Д., Ермоленко С.Б., Бурковец Д.Н. Рассеяние лазерного излучения мультифрактальными биоструктурами // *Опт. спектр.* 2000. Т. 88, №3. С. 495–498.
658. Hee M.R., Huang D., Swanson E.A., Fujimoto J.G. Polarization-sensitive low-coherence reflectometer for birefringence characterization and ranging // *J. Opt. Soc. Am. B.* 1992. Vol. 9. P. 903–908.
659. de Boer J.R., Milner T.E., van Gemert M.J.C., Nelson J.S. Two-dimensional birefringence imaging in biological tissue by polarization-sensitive optical coherence tomography // *Opt. Lett.* 1997. V. 22. P. 934–936.
660. Everett M.J., Schoenerberger K., Colston B.W., Jr., and Da Silva L.B. Birefringence characterization of biological tissue by use of optical coherence tomography // *Opt. Lett.* 1998. V. 23, №3. P. 228–230.
661. de Boer J.F. and Milner T.E. Review of polarization sensitive optical coherence tomography and Stokes vector determination // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, №3. P. 359–371.
662. Baba J.S., Cameron B.D., Theru S., and Coté G.L. Effect of temperature, pH, and corneal birefringence on polarimetric glucose monitoring in the eye // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, №3. P. 321–328.
663. Jiao S. and Wang L.V. Jones-matrix imaging of biological tissues with quadruple-channel optical coherence tomography // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, №3. P. 350–358.
664. Studinski R.C.N. and Vitkin I.A. Methodology for examining polarized light interactions with tissues and tissue-like media in the exact backscattering direction // *J. Biomed. Opt.* 2000. V. 5, №3. P. 330–337.
665. Hadley K.C. and Vitkin I.A. Optical rotation and linear and circular depolarization rates in diffusively scattered light from chiral, racemic, and achiral turbid media // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, №3. P. 291–299.
666. Morgan S.P., Khong M.P., Somekh M.G. Effects of polarization state and scatterer concentration optical imaging through scattering media // *Appl. Opt.* 1997. V. 36. P. 1560–1565.
667. Svaasand L.O., Gomer Ch.J. Optics of tissue // *Dosimetry of laser radiation in medicine and biology* / Eds. G. J. Müller, D. H. Sliney. Bellingham; Washington: SPIE Inst. Advanced Opt. Techn., 1989. V. IS5. P. 114–132.
668. Horinaka H., Hashimoto K., Wada K., Cho Y. Extraction of quasi-straightforward-propagating photons from diffused light transmitting through a scattering medium by polarization modulation // *Opt. Lett.* 1995. V. 20. P. 1501–1503.
669. Ostermeyer M.R., Stephens D.V., Wang L., Jacques S.L. Nearfield polarization effects on light propagation in random media // *OSA TOPS on Biomedical optics spectroscopy and diagnostics*. OSA, Washington, 1996. V. 3. P. 20–25.
670. Hielscher A.H., Mourant J.R., Bigio I.J. Influence of particle size and concentration on the diffuse backscattering of polarized light // *OSA TOPS on Biomedical optics spectroscopy and diagnostics*. OSA, Washington, 1996. V. 3. P. 26–31.
671. Bicout D., Brosseau C., Martinez A.S., Schmitt J.M. Depolarization of multiply scattering waves by spherical diffusers: influence of the size parameter // *Phys. Rev. E.* 1994. V. 49. P. 1767–1770.
672. Tuchin V.V. Coherent and polarimetric optical technologies for the analysis of tissue structure (overview) // *Coherence-domain methods in biomedical science and clinical applications* / Eds V. V. Tuchin, H. Podbielska, B. Ovrnyn. Bellingham: SPIE, 1997. V. 2981. P. 120–159.
673. Zimnyakov D.A., Tuchin V.V., Larin K.V. Speckle patterns polarization analysis as an approach to turbid tissues structure monitoring // *Coherence-domain methods in biomedical science and clinical applications* / Eds V. V. Tuchin, H. Podbielska, B. Ovrnyn. Bellingham: SPIE, 1997. V. 2981. P. 172–180.
674. Максимова И.Л., Татаринцев С.Н., Шубочкин Л.П. Эффекты многократного рассеяния в биообъектах при лазерной диагностике // *Опт. спектр.* 1992. Т. 72. С. 1171–1177.

675. *Bruscaglioni P., Zaccanti G., Wei Q.* Transmission of a pulsed polarized light beam through thick turbid media: numerical results // *Appl. Opt.* 1993. V. 32. P. 6142–6150.
676. *Долгинов А.З., Гнедин Ю.М., Силантьев Н.А.* Распространение и поляризация излучения в космической среде. М.: Наука, 1979.
677. *Eliyahu D., Rosenbluh M., Freund I.* Angular intensity and polarization dependence of diffuse transmission through random media // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1993. V. 10, № 3. P. 477–491.
678. *Зега Э.П., Чайковская Л.И.* Особенности распространения поляризованного света в средах с сильно анизотропным рассеянием // *ЖПС.* 1986. Т. 44, № 6. С. 996–1005.
679. *Elies P., Le Jeune B., Marie J.-P. et al.* Surface rugosity and polarimetric analysis // *Proc. SPIE, Bellingham, SPIE,* 1996. V. 2782. P. 719–729.
680. *Freund I., Kaveh M., Berkovits R., Rosenbluh M.* Universal polarization correlations and microstatistics of optical waves in random media // *Phys. Rev. B.* 1990. V. 42, № 4. P. 2613–2616.
681. *Praodin A.B., Chernova S.P., Tuchin V.V.* Polarized collimated tomography for biomedical diagnostics // *Coherence-domain methods in biomedical science and clinical applications* / Ed. by Tuchin V.V., Podbielska H., Ovrin B. Bellingham, SPIE, 1997. V. 2981. P. 230–234.
682. *Yaroslavsky A.N., Yaroslavsky I.V., Goldbach T., Schwarzmaier H.-J.* Inverse hybrid technique for determining the optical properties of turbid media from integrating-sphere measurements // *Appl. Opt.* 1997. V. 35, № 34. P. 6797–6809.
683. *Anderson R.R.* Polarized light examination and photography of the skin // *Arch. Dermatol.* 1991. V. 127. P. 1000–1005.
684. *Kollias N.* Polarized light photography of human skin. In *Bioengineering of the Skin: Skin Surface Imaging and Analysis* / Ed. by Wilhelm K.-P., Elsner P., Berardesca E., Maibach H.I. Boca Raton et al., CRC Press, 1997. P. 95–106.
685. *Bettelheim F.A.* *The Ocular Lens. Structure, Function and Pathology.* N.Y.: Marcel Dekker, 1985.
686. *Freund D.E., McCally R.L., Farrell R.A.* Effects of fibril orientations on light scattering in the cornea // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1986. V. 3. P. 1970–1982.
687. *Farrell R.A., Freund D.E., McCally R.L.* Hierarchical structure and light scattering in the cornea // *Mat. Res. Soc. Symp. Proc.,* 1992. V. 255. P. 233–246.
688. *Farrell R.A., Freund D.E., McCally R.L.* Research on corneal structure // *Johns Hopkins APL Techn. Digest.* 1990. V. 11. P. 191–199.
689. *Tuchin V.V., Maksimova I.L., Kochubey V.I. et al.* Fundamentals of ophthalmic diagnostic methods based on laser light scattering // *Proc. SPIE, Bellingham: SPIE,* 1995. V. 2393. P. 237–253.
690. *Tuchin V.V., Maksimova I.L., Yaroslavskaya A.N. et al.* Human eye lens spectroscopy and modeling of its transmittance // *Proc. SPIE, Bellingham: SPIE,* 1994. V. 2126. P. 393–406.
691. *Zigman S., Sutliff G., Rounds M.* Relationships between human cataracts and environmental radiant energy. Cataract formation, light scattering and fluorescence // *Lens Eye Toxicity Res.* 1991. V. 8. P. 259–280.
692. *Xu J., Pokorny J., Smith V.C.* Optical density of the human lens // *J. Opt. Soc. Am. A.* 1997. V. 14, № 5. P. 953–960.
693. *Pierscionek B.K., Weale R.A.* Polarising light biomicroscopy and the relation between visual acuity and cataract // *Eye.* 1995. V. 9. P. 304–308.
694. *Hulst H.C.* *Multiple light scattering.* N.Y.: Academic, 1980. V. 1.
695. *Ван-де-Хюльст Г.* Рассеяние света малыми частицами. М.: ИЛ, 1961.
696. *Шубочкин Л.П.* Особенности рассеяния света биологическими структурами в приложении к лазерной диагностике в офтальмологии: Дис. канд. физ.-мат. наук. Саратов, 1987.
697. *Максимова И.Л.* Кооперативные эффекты при рассеянии света системами биочастиц: Дис. канд. физ.-мат. наук. Саратов, 1991.
698. *Изотова В.Ф., Максимова И.Л., Романов С.В.* Анализ ошибок лазерного поляризационного нефелометра // *Опт. спектр.* 1996. Т. 80, № 6. С. 1001–1007.

699. Изотова В. Ф., Максимова И. Л., Романов С. В. Использование соотношений между элементами матрицы Мюллера для оценки свойств реальных объектов и достоверности эксперимента // *Опт. спектр.* 1996. Т. 80, № 5. С. 838–844.
700. Dreher A. W., Reiter K. Polarization technique measures retinal nerve fibers // *Clin. Vis. Sci.* 1992. V. 7. P. 481–485.
701. van de Merwe W. P., Huffman D. R., Bronk B. V. Reproducibility and sensitivity of polarized light scattering for identifying bacterial suspension // *Appl. Opt.* 1989. V. 28. P. 5052–5057.
702. Bronk B. V., Druger S. D., Czege J., van de Merwe W. Measuring diameters of rod-shaped bacteria in vivo with polarized light scattering // *Biophys. J.* 1995. V. 69. P. 1170–1177.
703. Максимова И. Л., Миронычев А. П., Романов С. В. и др. Методы и аппаратура для лазерной диагностики в офтальмологии // *Изв. АН СССР. Сер. физическая.* 1990. Т. 54, № 10. С. 1918–1923.
704. Бердник В. В., Лойко В. А. Угловая структура излучения, рассеянного дисперсным слоем с высокой концентрацией оптически мягких частиц // *Квантовая электроника* 2006. Т. 36, № 11. С. 1016–1022.
705. Schnorrenberg H.-J., Hengstebeck M., Schlinkmeier K., Zinth W. Polarization modulated diaphanography // *Proc. SPIE, Bellingham: SPIE, 1995. V. 2326–25.*
706. Schnorrenberg H.-J., Häbner R., Hengstebeck M. et al. Polarization modulation can improve resolution in diaphanography // *Proc. SPIE, Bellingham: SPIE, 1995. V. 2326–68.*
707. Masters B. *Confocal Microscopy and Multiphoton Excitation Microscopy the Genesis of Live Cell Imaging*, PM161, Bellingham, WA: SPIE Press, 2006.
708. Kemper B., Carl D., et al. Investigation of living pancreas tumor cells by digital holographic microscopy // *J. Biomed. Opt.* 2006. V. 11, № 3. P. 034005-1–8.
709. Kreis T. *Holographic Interferometry: Principles and Methods.* Berlin: Akademie-Verlag, 1996.
710. Charrière F., Pavillon N., et al. Living specimen tomography by digital holographic microscopy: morphometry of testate amoeba // *Opt. Express* 2006. V. 14. P. 7005–7013.
711. Kemper B. and von Bally G. Digital holographic microscopy for live cell applications and technical inspection // *Appl. Opt.* 2008. V. 47. P. A52–A61.
712. *Advanced Optical Cytometry: Methods and Disease Diagnoses* / Ed. by Tuchin V. V. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010.
713. Kemper B. and Schnekenburger J. Digital holographic microscopy for quantitative live cell imaging and cytometry, Chapter 8, in *Advanced Optical Cytometry: Methods and Disease Diagnoses* / Ed. by Tuchin V. V. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010.
714. Choi W., Fang-Yen C., et al. Tomographic phase microscopy // *Nature Methods* 2007. V. 4. P. 717–719.
715. Тычинский В. П. Когерентная фазовая микроскопия внутриклеточных процессов // *УФН* 2001. Т. 171. С. 649–661.
716. Тычинский В. П. Динамическая фазовая микроскопия: возможен ли «диалог» с клеткой? // *УФН* 2007. Т. 177, № 5. С. 535–552.
717. Tychinsky V. The metabolic component of cellular refractivity and its importance for optical cytometry // *J. Biophotonics* 2009. V. 2, № 8–9. P. 494–504.
718. Popescu G. Quantitative phase imaging of nanoscale cell structure and dynamics, Chapter 5 in *Methods in Cell Biology* / Ed. by Jena B. V. 90. Elsevier Inc., 2008. P. 87–115.
719. Sheppard C. J. R., Kompfner R., Gennaway J., and Walsh D. Scanning harmonic optical microscope // *IEEE J. Quantum Electron.* 1977. V. 13. P. 912–912.
720. Roth S. and Freund I. Second harmonic generation in collagen // *J. Chem. Phys.* 1979. V. 70. P. 1637–1643.
721. Freund I., Deutsch M., and Sprecher A. Connective tissue polarity // *Biophys. J.* 1986. V. 50. P. 693–712.
722. Denk W., Strickler J. H., and Webb W. W. Two-photon laser scanning microscope // *Science* 1990. V. 248. P. 73–76.
723. Campagnola P. J., Clark H. A., Mohler W. A., Lewis A., and Loew L. M. Second-harmonic imaging microscopy of living cells // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6, № 3. P. 277–286.

724. *Campagnola P.J., Millard A.C., Terasaki M., Hoppe P.E., Malone S.J., and Mohler W.A.* Three-dimensional high-resolution second-harmonic generation imaging of endogenous structural proteins in biological tissues // *Biophys. J.* 2002. V. 82, № 2. P. 493–508.
725. *Campagnola P.J. and Loew L.M.* Second-harmonic imaging microscopy for visualizing biomolecular arrays in cells, tissues and organisms // *Nat. Biotechnol.* 2003. V. 21. P. 1356–1360.
726. *Stoller P., Kim B.-M., and Rubenchik A.M.* Polarization-dependent optical second-harmonic imaging of a rat-tail tendon // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7, № 2. P. 205–214.
727. *Stoller P., Reiser K.M., Celliers P.M., and Rubenchik A.M.* Polarization-modulated second-harmonic generation in collagen // *Biophys. J.* 2002. V. 82, № 2. P. 3330–3342.
728. *Zoumi A., Yeh A.T., and Tromberg B.J.* Imaging cells and extracellular matrix in vivo by using second-harmonic generation and two-photon excited fluorescence // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002. V. 99, 11014–11019.
729. *Yeh A.T., Choi B., Nelson J.S., and Tromberg B.J.* Reversible dissociation of collagen in tissues // *J. Invest. Dermatol.* 2003. V. 121. P. 1332–1335.
730. *Yasui T., Tohno Y., and Araki T.* Characterization of collagen orientation in human dermis by two-dimensional second-harmonic-generation polarimetry // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9, № 2. P. 259–264.
731. *Han M., Zickler L., Giese G., Walter M., Loesel F.H., and Bille J.F.* Second-harmonic imaging of cornea after intrastromal femtosecond laser ablation // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9, № 4. P. 760–766.
732. *Cicchi R., Sestini S., De Giorgi V., Massi D., Lotti T., and Pavone F.S.* Nonlinear laser imaging of skin lesions // *J. Biophoton.* 2008. V. 1, № 1. P. 62–73.
733. *Cicchi R., Kapsokalyvas D., De Giorgi V., Maio V., Van Wiechen A., Massi D., Lotti T., and Pavone F.S.* Scoring of collagen organization in healthy and diseased human dermis by multiphoton microscopy // *J. Biophoton.* 2010. V. 3, № 1–2. P. 34–43.
734. *Cicchi R., Sacconi L., and Pavone F.* Nonlinear imaging of tissues, Chapter 20 in *Handbook of Photonics for Biomedical Science* / Ed. by Tuchin V.V. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 509–545.
735. *Wu Y. and Li X.* Endomicroscopy technologies for high-resolution nonlinear optical imaging and optical coherence tomography, Chapter 21 in *Handbook of Photonics for Biomedical Science* / Ed. by Tuchin V.V. London: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2010. P. 547–573.
736. *Laser Imaging and Manipulation in Cell Biology* / Ed. by Pavone F.S. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010.
737. *Sacconi L. and Pavone F.S.* *In vivo* nanosurgery, Chapter 1 in *Laser Imaging and Manipulation in Cell Biology* / Ed. by Pavone F.S. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010.
738. *König K.* Clinical multiphoton tomography // *J. Biophoton.* 2008. V. 1. P. 13–23.
739. *König K. and Uchugonova A.* Multiphoton imaging and nanoprocessing of human stem cells, Chapter 1 in *Laser Imaging and Manipulation in Cell Biology* / Ed. by Pavone F.S. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010.
740. *Dainty J.C.* The statistics of speckle patterns, in *Progress in Optics XIV* / Ed. by Wolf E. V. 14, North Holland, 1976. P. 3–48.
741. *Bonner R. and Nossal R.* Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue // *Appl. Opt.* 1981. V. 20. P. 2097–2107.
742. *Serov A., Steenbergen W., and de Mul F.* Prediction of the photodetector signal generated by Doppler-induced speckle fluctuations: Theory and some validations // *J. Opt. Soc. Am. A* 2001. V. 18. P. 622–639.
743. *Serov A., Steinacher B., and Lasser T.* Full-field laser Doppler perfusion imaging and monitoring with an intelligent CMOS camera // *Optics Express* 2005. V. 13. P. 3681–3689.
744. *Serov A. and Lasser T.* High-speed laser Doppler perfusion imaging using an integrating CMOS image sensor // *Optics Express* 2005. V. 13, № 17. P. 6416–6428.
745. *Serov A. and Lasser T.* High-speed laser Doppler imaging of blood flow in biological tissue // *Proc. SPIE* 2006. V. 6163. P. 613301-12.

746. *Dunn A.K., Bolay H., Moskowitz M.A., and Boas D.A.* Dynamic imaging of cerebral blood flow using laser speckle // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2001. V. 21. P. 195–201.
747. *Bolay H., Reuter U., Dunn A.K., Huang Z., Boas D.A., and Moskowitz A.M.* Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model // *Nat. Med.* 2002. V. 8. P. 136–142.
748. *Yuan S., Devor A., Boas D.A., and Dunn A.K.* Determination of optimal exposure time for imaging of blood flow changes with laser speckle contrast imaging // *Appl. Opt.* 2005. V. 44. P. 823–1830.
749. *Forrester K.R., Stewart C., Tulip J., Leonard C., and Bray R.C.* Comparison of laser speckle and laser Doppler perfusion imaging: Measurement in human skin and rabbit articular tissue // *Med. Biol. Eng. Comput.* 2002. V. 40. P. 687–697.
750. *Forrester K.R., Tulip J., Leonard C., Stewart C., and Bray R.C.* A laser speckle imaging technique for measuring tissue perfusion // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 2004. V. 51. P. 2074–2084.
751. *Wang Z., Luo Q.M., Cheng H.Y., Luo W.H., Gong H., and Lu Q.* Blood flow activation in rat somatosensory cortex under sciatic nerve stimulation revealed by laser speckle imaging // *Prog. Nat. Sci.* 2003. V. 13. P. 522–527.
752. *Cheng H.Y., Luo Q.M., Zeng S.Q., Chen S.B., Cen J., and Gong H.* Modified laser speckle imaging method with improved spatial resolution // *J. Biomed. Opt.* 2003. V. 8, № 3. P. 559–564.
753. *Liu Q., Wang Z., and Luo Q.* Temporal clustering analysis of cerebral blood flow activation maps measured by laser speckle contrast imaging // *J. Biomed. Opt.* 2005. V. 10, № 2. P. 024019-1–7.
754. *Weber B., Burger C., Wyss M.T., von Schulthess G.K., Scheffold F., and Buck A.* Optical imaging of the spatiotemporal dynamics of cerebral blood flow and oxidative metabolism in the rat barrel cortex // *Europ. J. Neurosci.* 2004. V. 20, 2004. P. 2664–2671.
755. *Völker A.C., Zakharov P., Weber B., Buck F., and Scheffold F.* Laser speckle imaging with an active noise reduction scheme // *Optics Express* 2005. V. 13, № 24. P. 9782–9787.
756. *Zakharov P., Bhat S., Schurtenberger P., and Scheffold F.* Multiple scattering suppression in dynamic light scattering based on a digital camera detection scheme // *Appl. Opt.* 2006. V. 45. P. 1756–1764.
757. *Mobley J., Vo-Dinh T., and Tuchin V.* Optical properties of tissue, Chapter 2 in *Biomedical Photonics Handbook* / Ed. by Vo-Dinh T. Second edition, Boca Raton: CRC Press, 2010.
758. *Гудмен Дж.* Статистическая оптика, М. Мир, 1988 / Пер. с англ. под ред. Скромко-го Г. В. // Goodman J. W. *Statistical Optics*. NY: et al., Wiley-Interscience, 1985.
759. *Ryabukho V.P., Khomutov V.L., Tuchin V.V., Lyakin D.V., and Konstantinov K.V.* Laser interferometer with an object sharply focused beam as a tool for optical tomography // *Proc. SPIE* 1998. V. 3251. P. 247–252.
760. *Рябухо В.П., Аветисян Ю.А., Гриневич А.Е., Зимняков Д.А., Голубенцева Л.И.* Эффекты корреляции спекл-полей при дифракции пространственно-модулированного лазерного пучка на случайном фазовом экране // *Письма в ЖТФ*. 1994. Т. 20, № 11. С. 74–78.
761. *Ryabukho V.P.* Diffraction of interference fields on random phase objects // Chapter 7 in *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by V. V. Tuchin. Boston, Kluwer Academic Publishers. 2004. V. 1. P. 235–318.
762. *Ryabukho V.P., Chausky A.A., Khomutov V.L., and Tuchin V.V.* Interferometric testing of the random phase objects (biological tissue models) by a spatially-modulated laser beam // *Proc. SPIE* 1996. V. 2732. P. 100–117.
763. *Radchenko E. Yu., Akchurin G.G., Bakutkin V.V., Tuchin V.V., and Akchurin A.G.* Measurement of retinal visual acuity in human eyes // *Proc. SPIE* 1999. V. 4001. P. 228–237.
764. *Ansari R.R.* Quasi-elastic light scattering in ophthalmology // Chapter 11 in *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by Tuchin V. V. Boston: Kluwer Academic Publishers. 2004. V. 1. P. 437–464.
765. *Yoshimura T.* Statistical properties of dynamic speckles. *J. Opt. Soc. Am. A* 1986. V. 3, № 7. P. 1032–1054.

766. Francon M. Laser Speckle and Applications in Optics / NY: Academic Press, 1979.
767. Jones R. and Wykes C. Holographic and Speckle Interferometry / Cambridge: Cambridge Univ. Press, 1983.
768. Stern M.D. *In vivo* evaluation of microcirculation by coherent light scattering // Nature 1975. V. 254. P. 56–58.
769. Essex T.J.H. and Byrne P.O. A laser Doppler scanner for imaging blood flow in skin // J. Biomed. Eng. 1991. V. 13. P. 189–194.
770. Wårdell K., Braverman I.M., Silverman D.G., and Nilsson G.E. Spatial heterogeneity in normal skin perfusion recorded with laser Doppler imaging and flowmetry // Microvascular Res. 1994. V. 48. P. 26–38.
771. Зимняков Д.А., Брайерс Дж.Д., Тучин В.В. Спекл-корреляционные методы анализа структуры биологических тканей и модельных сред // Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 2 / Под ред. Тучина В.В. М.: Физматлит, 2007. С. 284–323; Пер. с англ. под ред. Тучина В.В. Handbook of Optical Biomedical Diagnostics / Ed. by Tuchin V.V. Bellingham, WA: SPIE Press, 2002.
772. Luo Q., Cheng H., Wang Z., and Tuchin V.V. Laser speckle imaging of cerebral blood flow // Chapter 5 in Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science / Ed. by Tuchin V.V. Boston: Kluwer, Academic Publishers, 2004. V. 1. P. 165–195.
773. Kalchenko V., Brill A., Bayewitch M., Fine I., Zharov V., Galanzha E., Tuchin V. and Harmelin A. *In vivo* dynamic light scattering imaging of blood coagulation // J. Biomed. Opt. 2007. V. 12, No 5. P. 052002-1–4.
774. Cheng H., Luo Q., Liu Q., Lu Q., Gong H., and Zeng S. Laser speckle imaging of blood flow in microcirculation // Phys. Med. Biol. 2004. V. 49. P. 1347–1357.
775. Cheng H., Luo Q., Wang Z., Gong H., Chen S., Liang W., and Zeng S. Efficient characterization of regional mesentric blood flow by use of laser speckle imaging // Appl. Opt. 2004. V. 42, № 28. P. 5759–5764.
776. Choi B., Kang N.M., and Nelson J.S. Laser speckle imaging for monitoring blood flow dynamics in the *in vivo* rodent dorsal skin fold model // Microvasc. Res. 2004. V. 68. P. 143–146.
777. Kalchenko V., Harmelin A., Fine I., Zharov V., Galanzha E., and Tuchin V. Advances in intravital microscopy for monitoring cell flow dynamics *in vivo* // Proc. SPIE 2007. V. 6436. P. 64360D-1–15.
778. Зимняков Д.А. Статистические свойства многократно рассеянного когерентного света, в кн. Оптическая биомедицинская диагностика / Под ред. Тучина В.В. М.: Физматлит, 2007. Т. 1. С. 234–272 / Пер. с англ. под ред. Тучина В.В.; Handbook of Optical Biomedical Diagnostics / Ed. by Tuchin V.V. Bellingham, WA: SPIE Press, 2002.
779. Zimnyakov D.A. Light correlation and polarization in multiply scattering media: Industrial and biomedical applications // Chapter 1 in Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science / Ed. by Tuchin V.V. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. V. 1. P. 3–41.
780. Weitz D.A. and Pine D.J. Diffusing-wave spectroscopy / Chapter 16 in Dynamic Light Scattering. The Method and Some Applications / Ed. by Brown W. NY: Oxford University Press, 1993. P. 652–720.
781. Меглинский И.В., Королевич А.Н., Тучин В.В. Исследование микроциркуляции кровотока методом диффузионно-волновой спектроскопии // Биомедицинская радиоэлектроника 2000. № 10. С. 37–45.
782. Meglinskii I. V. and Tuchin V. V. Diffusing wave spectroscopy: Application for skin blood monitoring // Chapter 4 in Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science / Ed. by Tuchin V.V. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. V. 1. P. 139–164.
783. Кузьмин В.Л., Меглинский И.В. Численное моделирование когерентного обратного рассеяния и временных корреляций интенсивности в случайно-неоднородных средах // Квантовая электроника 2006. Т. 36, № 11. С. 990–1002.

784. Хайруллина А. Я. Информативность автокорреляционной функции временных флуктуаций радиации, рассеянной «назад» суспензией эритроцитов // *Опт. спектр.* 1996. Т. 80, № 2. С. 268–273.
785. Masters B.R. Confocal laser scanning microscopy, Chapter 21 in *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by Tuchin V.V. Boston: Kluwer Academic Publishers. 2004. V. 2. P. 364–415.
786. *Handbook of Biological Confocal Microscopy* / Ed. by Pawley J.B. NY: Plenum Press, 1990.
787. Rajadhyaksha M. and Zavislan J.M. Confocal reflectance microscopy of unstained tissue *in vivo* // *Retinoids* 1998. V. 14, № 1. P. 26–30.
788. Rajadhyaksha M., Anderson R.R., and Webb R.H. Video-rate confocal scanning laser microscope for imaging human tissues *in vivo* // *Appl. Opt.* 1999. V. 38. P. 2105–2115.
789. Bohnke M. and Masters B.R. Confocal microscopy of the cornea // *Prog. Retinal Eye Res.* 1999. V. 18, № 5. P. 553–628.
790. Wilson T. Confocal microscopy, in *Biomedical Photonics Handbook* / Ed. by T. Vo-Dinh, Boca Rotan, Florida, CRC Press, 2003. P. 10-1–18.
791. Меглинский И. В., Башкатов А. Н., Генина Э. А., Чурмаков Д. Ю., Тучин В. В. Исследование возможности увеличения глубины зондирования методом отражательной конфокальной микроскопии при иммерсионном просветлении приповерхностных слоев кожи человека // *Квантовая электроника.* 2002. Т. 32. № 10. С. 875–882.
792. Meglinsky I. V., Bashkatov A. N., Genina E. A., Churmakov D. Yu., and Tuchin V. V. Study of the possibility of increasing the probing depth by the method of reflection confocal microscopy upon immersion clearing of near-surface human skin layers // *Laser Physics.* 2003. V. 13, № 1. P. 65–69.
793. Fujimoto J. G. and Brezinski M. E. Optical coherence tomography imaging, in *Biomedical Photonics Handbook* / Ed. by T. Vo-Dinh. Boca Rotan, Florida: CRC Press, 2003. P. 13-1–29.
794. *Selected Papers on Optical Low-Coherence Reflectometry and Tomography* / Ed. by Masters B. Bellingham, WA: SPIE Press, 2002. V. MS165.
795. Hitzenberger C. K., Gotzinger E., Sticker M., Pircher M., and Fercher A. F. Measurement and imaging of birefringence and optic axis orientation by phase resolved polarization sensitive optical coherence tomography // *Opt. Express* 2001. V. 9. P. 780–790.
796. Park B. H., Saxer C. E., Srinivas S. M., Nelson J. S., and de Boer J. F. *In vivo* burn depth determination by high-speed fiber-based polarization sensitive optical coherence tomography // *J. Biomed. Opt.* 2001. V. 6. P. 474–479.
797. Baumgartner A., Dichtl S., Hitzenberger C. K., Sattmann H., Robl B., Moritz A., Fercher A. F., and Sperr W. Polarization-sensitive optical coherence tomography of dental structures // *Caries Res.* 2000. V. 34, № 1. P. 59–69.
798. Levitz D., Thrane L., Frosz M. H., Andersen P. E., Andersen C. B., Andersson-Engels S., Valanciunaite J., Swartling J., and Hansen P. R. Determination of optical scattering properties of highly-scattering media in optical coherence tomography images // *Optics Express* 2004. V. 12. P. 249–259.
799. Knüttel A. and Boehlau-Godau M. Spatially confined and temporally resolved refractive index and scattering evaluation in human skin performed with optical coherence tomography // *J. Biomed. Opt.* 2000. V. 5. P. 83–92.
800. Knüttel A., Bonev S., and Knaak W. New method for evaluation of *in vivo* scattering and refractive index properties obtained with optical coherence tomography // *J. Biomed. Opt.* 2004. V. 9. P. 265–273.
801. Turchin I. V., Sergeeva E. A., Dolin L. S., and Kamensky V. A. Estimation of biotissue scattering properties from oct images using a small-angle approximation of transport theory // *Laser Physics* 2003. V. 13. P. 1524–1529.
802. Dolin L. S., Feldchtein F. I., Gelikonov G. V., Gelikonov V. M., Gladkova N. D., Iksanov R. R., Kamensky V. A., Kuranov R. V., Sergeev A. M., Shakhova N. M., and Turchin I. V. Fundamentals of OCT and clinical applications of endoscopic OCT, Chapter 17,

- in Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science / Ed. by Tuchin V. V. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. V. 2. P. 211–270.
803. *Tuchin V. V., Xu X., and Wang R. K.* Dynamic optical coherence tomography in optical clearing, sedimentation and aggregation study of immersed blood // *Appl. Opt.* — OT 2002. V. 41, № 1. P. 258–271.
804. *Tuchin V. V., Wang R. K., Galanzha E. I., Elder J. B., and Zhestkov D. M.* Monitoring of glycated hemoglobin by OCT measurement of refractive index // *Proc. SPIE* 2004. V. 5316. P. 66–77.
805. *Wang X., Milner T. E., Chang M. C., and Nelson J. S.* Group refractive index measurement of dry and hydrated type I collagen films using optical low-coherence reflectometry // *J. Biomed. Opt.* 1996. № 2. P. 212–216.
806. *Sorin W. V. and Gray D. F.* Simultaneous thickness and group index measurements using optical low-coherence refractometry // *IEEE Photon. Technol. Lett.* 1992. V. 4. P. 105–107.
807. *Wang X. J., Milner T. E., Dhond R. P., Sorin W. V., Newton S. A., and Nelson J. S.* Characterization of human scalp hairs by optical low-coherence reflectometry // *Opt. Lett.* 1995. V. 20. P. 524–526.
808. *Tearney G. J., Brezinski M. E., Southern J. F., Bouma B. E., Hee M. R., and Fujimoto J. G.* Determination of the refractive index of highly scattering human tissue by optical coherence tomography // *Opt. Lett.* 1995. V. 20. P. 2258–2260.
809. *Wang X., Zhang C., Zhang L., Xue L., and Tian J.* Simultaneous refractive index and thickness measurement of biotissue by optical coherence tomography // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7. P. 628–632.
810. *Alexandrov S. A., Zvyagin A. V., Silva K. K. M. B. D., and Sampson D. D.* Bifocal optical coherence refractometry of turbid media // *Opt. Lett.* 2003. V. 28. P. 117–119.
811. *Zvyagin A. V., Silva K. K. M. B. D., Alexandrov S. A., Hillman T. R., Armstrong J. J., Tsuzuki T., and Sampson D. D.* Refractive index tomography of turbid media by bifocal optical coherence refractometry // *Optics Express* 2003. V. 11. P. 3503–3517.
812. *Kim Y. L., Walsh Jr. J. T., Goldstick T. K., and Glucksberg M. R.* Variation of corneal refractive index with hydration // *Phys. Med. Biol.* 2004. V. 49. P. 859–868.
813. *Drexler W., Hitzenberger C. K., Baumgartner A., Findl O., Sattmann H., and Fercher A. F.* Investigation of dispersion effects in ocular media by multiple wavelength partial coherence interferometry // *Exp. Eye Res.* 1998. V. 66. P. 25–33.
814. *Lin R. C., Shure M. A., Rollins A. M., Izatt J. A., and Huang D.* Group index of the human cornea at 1,3- μm wavelength obtained in vitro by optical coherence domain reflectometry // *Opt. Lett.* 2004. V. 29. P. 83–85.
815. *Gelikonov G. V., Gelikonov V. M., Ksenofontov S. U., Morosov A. N., Myakov A. V., Potapov Yu. P., Saposhnikova V. V., Sergeeva E. A., Shabanov D. V., Shakhova N. M., and Zagainova E. V.* Compact optical coherence microscope, Chapter 20 in *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by Tuchin V. V. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. V. 2. P. 345–362.
816. *Huang D., Swanson E. A., Lin C. P., Schuman J. S., Stinson W. G., Chang W., Hee T., Flotte M. R., Gregory K., Puliafito C. A., and Fujimoto J. G.* Optical coherence tomography // *Science* 1991. V. 254. P. 1178–1181.
817. *Schmitt J. M. and Knüttel A.* Model of optical coherence tomography of heterogeneous tissue // *J. Opt. Soc. Am. A* 1997. V. 14. P. 1231–1242.
818. *Häusler G., Herrmann J. M., Kummer R., and Linder M. W.* Observation of light propagation in volume scatterers with 10^{11} -fold slow motion // *Opt. Lett.* 1996. V. 21. P. 1087–1089.
819. *Fujimoto J. G., Pitris C., Boppart S. A., and Brezinski M. E.* Optical coherence tomography: an emerging technology for biomedical imaging and optical biopsy // *Neoplasia* 2000. V. 2. P. 9–25.
820. *Schmitt J. M.* Restoration of optical coherence images of living tissue using the CLEAN algorithm // *J. Biomed. Opt.* 1998. V. 3, № 1. P. 66–75.
821. *Colston B. W., Jr., Everett M. J., DaSilva L. B., Otis L. L., Stroeve P., and Nathel H.* Imaging of hard- and soft-tissue structure in the oral cavity by optical coherence tomography // *Appl. Opt.* 1998, V. 37, № 16. P. 3582–3585.

822. Schmitt J.M., Lee S.L., and Yung K.M. An optical coherence microscope with enhanced resolving power in thick tissue // *Opt. Communs* 1997. V. 142. P. 203–207.
823. Schmitt J.M. and Xiang S.H. Cross-polarized backscatter in optical coherence tomography of biological tissue // *Opt. Lett.* 1998. V. 23, № 13. P. 1060–1062.
824. Barton J.K., Milner T.E., Pfeifer T.J., et al. Optical low-coherence reflectometry to enhance Monte Carlo modeling of skin // *J. Biomed. Opt.* 1997. V. 2, № 2. P. 226–234.
825. Lankenau E., Welzel J., Birngruber R., and Engelhardt R. *In vivo* tissue measurements with optical low coherence tomography // *Proc. SPIE* 1995. V. 2981. P. 78–84.
826. Podoleanu A.G., Seeger M., Dobre G.M., et al. Transversal and longitudinal images from the retina of the living eye using low coherence reflectometry // *J. Biomed. Opt.* 1998. V. 3, № 1. P. 12–20.
827. Häusler G. and Lindner M.W. «Coherence Radar» and «Spectral Radar» — new tools for dermatological diagnosis // *J. Biomed. Opt.* 1998. V. 3, № 1. P. 21–31.
828. Bouma B., Nelson L.E., Tearney G.J., et al. Optical coherence tomographic imaging of human tissue at 1,55 μm and 1,81 μm using er- and tm-doped fiber sources // *J. Biomed. Opt.* 1998. V. 3, № 1. P. 76–79.
829. Walti R., Bohnke M., Gianotti R., et al. Rapid and precise *in vivo* measurement of human corneal thickness with optical low-coherence reflectometry in normal human eyes // *J. Biomed. Opt.* 1998. V. 3, № 3. P. 253–258.
830. Feldchtein F.I., Gelikonov G.V., Gelikonov V.M., et al. *In vivo* OCT imaging of hard and soft tissue of the oral cavity // *Optics Express* 1998. V. 3, № 6. P. 239–250.
831. Schmitt J.M. OCT elastography: imaging microscopic deformation and strain in tissue // *Optics Express* 1998. V. 3. P. 199–211.
832. Wang X., Milner T., Chen Z., and Nelson J.S. Measurement of fluid-flow-velocity profile in turbid media by the use of optical Doppler tomography // *Appl. Opt.* 1997. V. 36, № 1. P. 144–149.
833. Chen Z., Milner T., Wang X., et al. Optical Doppler tomography: imaging *in vivo* blood flow dynamics following pharmacological intervention and photodynamic therapy // *Photochem. Photobiol.* 1998. V. 67, № 1. P. 56–60.
834. Izatt J.A., Kulkarni M.D., and Yazdanfar S. *In vivo* bidirectional color Doppler flow imaging of picoliter blood volumes using optical coherence tomography // *Opt. Lett.* 1997. V. 22, № 18. P. 1439–1441.
835. Boas D.A., Bizheva K.K., and Siegel A.M. Using dynamic low-coherence interferometry to image Brownian motion within highly scattering media // *Opt. Lett.* 1998. V. 23, № 5. P. 319–321.
836. Kolinko V.G., de Mul F.F.M., Greve J., and Priezzhev A.V. Feasibility of picosecond laser-Doppler flowmetry provides basis for time-resolved Doppler tomography of biological tissue // *J. Biomed. Opt.* 1998. V. 3, № 2. P. 187–190.
837. Masters B. Early development of optical low-coherence reflectometry and some recent biomedical applications // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4, № 2. P. 236–247.
838. Wang R.K. and Tuchin V.V. Optical coherence tomography: light scattering and imaging enhancement, Chapter 13 in *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by Tuchin V.V. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. V. 2. P. 3–60.
839. Andersen P.E., Thrane L., Yura H.T., Tycho A., and Jørgensen T.M. Optical coherence tomography: advanced modeling, Chapter 14 in *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by Tuchin V.V. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. V. 2. P. 61–118.
840. Hitzenberger C.K. Absorption and dispersion in OCT, Chapter 15 in *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by Tuchin V.V. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. V. 2. P. 119–161.
841. Podoleanu A. En-face OCT imaging, Chapter 16 in *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by Tuchin V.V. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. V. 2. P. 163–209.

842. *de Boer J.F.* Polarization sensitive optical coherence tomography: phase sensitive interferometry for multi-functional imaging, Chapter 18 in *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by *Tuchin V.V.* Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. V. 2. P. 271–314.
843. *Chen Z.* Optical Doppler tomography Chapter 19 in *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by *Tuchin V.V.* Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. V. 2. P. 315–342.
844. *Neerken S., Lucassen G.W., Nuijs T.(A.M.), Lenderink E., and Hendriks R.F.M.* Comparison of confocal laser scanning microscopy and optical coherence tomography, Chapter 19 in *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by *Tuchin V.V.* Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. V. 2. P. 417–439.
845. *Reil F. and Thomas J.E.* Heterodyne techniques for characterizing light fields, Chapter 8 in *Coherent-Domain Optical Methods: Biomedical Diagnostics, Environmental and Material Science* / Ed. by *Tuchin V.V.* Boston: Kluwer Academic Publishers, 2004. V. 2. P. 319–351.
846. *Ghosn M.G., Tuchin V.V., and Larin K.V.* Depth-resolved monitoring of drug diffusion in tissues using optical coherence tomography // *Opt. Lett.* 2006. V. 31, № 15. P. 2314–2316.
847. *Ghosn M.G., Tuchin V.V., and Larin K.V.* Non-destructive quantification of analytes diffusion in cornea and sclera by using optical coherence tomography // *Invest. Ophthalm. Visual Sci. (IOVS)* 2007. V. 48, № 6. P. 2727–2733.
848. *Ghosn M.G., Carbajal E.F., Befruj N., Tuchin V.V., and Larin K.V.* Differential permeability rate and percent clearing of glucose in different regions in rabbit sclera // *J. Biomed. Opt.* 2008. V. 13. P. 021110-1–6.
849. *Larina I.V., Carbajal E.F., Tuchin V.V., Dickinson M.E., and Larin K.V.* Enhanced OCT imaging of embryonic tissue with optical clearing // *Laser Phys. Lett.* 2008. V. 5, № 6. P. 476–479.
850. *Ларин К.В., Тучин В.В.* Функциональная визуализация и оценка скорости диффузии глюкозы в эпителиальных тканях с помощью оптической когерентной томографии // *Квантовая электроника* 2008. Т. 38, № 6. С. 551–556.
851. *Larin K.V. and Tuchin V.V.* Monitoring of glucose diffusion in epithelial tissues with optical coherence tomography, Chapter 20 in *Handbook of Optical Sensing of Glucose in Biological Fluids and Tissues* / Ed. by *Tuchin V.V.* London, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009. P. 623–656.
852. *Larin K.V., Ghosn M.G., and Tuchin V.V.* Noninvasive assessment of molecular permeability with OCT, Chapter 17 in *Handbook of Photonics for Biomedical Science* / Ed. by *Tuchin V.V.* CRC Press, London: Taylor & Francis Group, 2010. P. 410–428.
853. *Ghosn M.G., Sudheendran N., Wendt M., Glasser A., Tuchin V.V., and Larin K.V.* Monitoring of glucose permeability in monkey skin *in vivo* using optical coherence tomography // *J. Biophoton.* 2010. V. 3, № 1–2. P. 25–33.
854. *Genina E.A., Bashkatov A.N., Larin K.V., and Tuchin V.V.* Light-tissue interaction at optical clearing, Chapter 7 in *Laser Imaging and Manipulation in Cell Biology* / Ed. by *Pavone F.S.*, 2010, Weinheim, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. ISBN: 978-3-527-40929-7.
855. *Roper S.N., Moores M.D., Gelikonov G.V., Feldchtein F.I., Beach N.M., King M.A., Gelikonov V.M., Sergeev A.M., and Reitze D.H.* *In vivo* detection of experimentally induced cortical dysgenesis in the adult rat neocortex using optical coherence tomography // *J. Neurosci. Meth.* 1998. V. 80. P. 91–98.
856. *Drexler W., Morgner U., Kartner F.X., Pitris C., Boppart S.A., Li X.D., Ippen E.P., and Fujimoto J.G.* *In vivo* ultrahigh resolution optical coherence tomography // *Opt. Lett.* 1999. V. 24. P. 1221–1223.
857. *Wojtkowski M., Leitgeb R., Kowalczyk A., Bajraszewski T., and Fercher A.F.* *In vivo* human retinal imaging by Fourier domain optical coherence tomography // *J. Biomed. Opt.* 2002. V. 7. P. 457–463.
858. *Leitgeb R., Hitzenberger C.K., and Fercher A.F.* Performance of Fourier domain vs. time domain optical coherence tomography // *Opt. Express* 2003. V. 8. P. 889–894.

859. Choma M.A., Sarunic M.V., Yang C., and Izatt J.A. Sensitivity advantage of swept source and Fourier domain optical coherence tomography // *Optics Express*, 2003. V. 11, № 18. P. 2183–2189.
860. Maheshwari A., Choma M.A., and Izatt J.A. Heterodyne swept-source optical coherence tomography for complete complex conjugate ambiguity removal // *Proc. SPIE* 2005. V. 5690. P. 91–95.
861. Kuranov R.V., Sapozhnikova V.V., Turchin I.V., Zagainova E.V., Gelikonov V.M., Kamensky V.A., Snopova L.B., and Prodanetz N.N. Complementary use of cross-polarization and standard OCT for differential diagnosis of pathological tissues // *Opt. Express* 2002. V. 10. P. 707–713.
862. Matcher S.J., Winlove C.P., and Gangnus S.V. Collagen structure of bovine intervertebral disc studied using polarization sensitive optical coherence tomography // *Phys. Med. Biol.* 2004. V. 49. P. 1295–1306.
863. Ugrumova N., Attenburrow D.P., Winlove C.P., and Matcher S.J. The collagen structure of equine articular cartilage, characterized using polarization-sensitive optical coherence tomography // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2005. V. 38. P. 2612–2619.
864. Vabre L., Dubois A., and Boccara A.C. Thermal-light-full-field optical coherence tomography // *Opt. Lett.* 2002. V. 27. P. 530–533.
865. Dubois A., Grieve K., Moneron G., Lecaque R., Vabre L., and Boccara A.C. Ultra-high resolution full-field optical coherence tomography // *Appl. Opt.* 2004. V. 43. P. 2874–2883.
866. Boppart S.A., Bouma B.E., Pitris C., et al. Forward imaging instruments for optical coherence tomography. *Opt. Lett.* 1997. V. 22. P. 1618–1620.
867. Kamensky V., Feldchtein F., Gelikonov V., et al. In situ monitoring of laser modification process in cataracted eye lens and in cornea using coherence tomography // *J. Biomed. Opt.* 1999. V. 4, № 1, 137–143.
868. Shakhov A.V., Terentjeva A.B., Kamensky V.A., Snopova L.B., Gelikonov V.M., Feldchtein F.I., and Sergeev A.M. Optical coherence tomography monitoring for laser surgery of laryngeal carcinoma // *J. Surgical Oncology* 2001. V. 77. P. 253–258.
869. Boppart S.A., Herrmann J., Pitris C., Stamper D.L., Brezinski M.E., and Fujimoto J.G. High-resolution optical coherence tomography-guided laser ablation of surgical tissue // *J. Surgical Research* 1999. V. 82. P. 275–284.
870. Pan Y.-T. and Farkas D.L. Non-invasive imaging of living human skin with dual-wavelength optical coherence tomography in two and three dimensions // *J. Biomed. Opt.* 1998. V. 3, № 10. P. 446–455.
871. Schmitt J.M., Xiang S.H., and Yung K.M. Differential absorption imaging with optical coherence tomography // *J. Opt. Soc. Am. A* 1998. V. 15. P. 2288–2296.
872. Morgner U., Kärtner F.X., Cho S.H., Chen Y., Haus H.A., Fujimoto J.G., Ippen E.P., Scheuer V., Angelow G., and Tschudi T. Sub-two cycle pulses from a Kerr-lens mode-locked Ti:sapphire laser // *Opt. Lett.* 1999. V. 24. P. 411–413.
873. Leitgeb R., Wojtkowski M., Kowalczyk A., Hitzenberger C.K., Sticker M., and Fercher A.F. Spectral measurement of absorption by spectroscopic frequency-domain optical coherence tomography // *Opt. Lett.* 2000. V. 25. P. 820–822.
874. Barton J., Welch A., and Izatt J. Investigating pulsed dye laser-blood vessel interaction with color Doppler optical coherence tomography // *Opt. Express* 1998. V. 3. P. 251–256.
875. Habelhand U.H.P., Blazek V., Schmitt H.J. Chirp optical coherence tomography of layered scattering media // *J. Biomed. Opt.* 1998. V. 3. P. 259–266.
876. Manapuram R.K., Manne V.G.R., and Larin K.V. Phase-sensitive swept source optical coherence tomography for imaging and quantifying of microbubbles in clear and scattering media // *J. Appl. Phys.* 2009. V. 105. P. 102040-1–10.
877. Digital Holography and Three-Dimensional Display: Principles and Applications / Ed. by Poon T.-C. Berlin: Springer, 2006.
878. Liebling, M., Blu T., and Unser M. Complex-wave retrieval from a single off-axis hologram // *J. Opt. Soc. Am. A*, 2004. V. 21, № 3. P. 367–377.

879. Rappaz B., Marquet P., Cuche E., Emery Y., Depeursinge C., and Magistretti P. Measurement of the integral refractive index and dynamic cell morphometry of living cells with digital holographic microscopy // *Optics Express*, 2005. V. 13. P. 9361–9373.
880. Lue N., Popescu G., Ikeda T., Dasari R.R., Badizadegan K., and Feld M.S. Live cell refractometry using microfluidic devices // *Opt. Lett.* 2006. V. 31. P. 2759–2761.
881. Kemper B., Kosmeier S., Langehanenberg P., von Bally G., Bredebusch I., Domschke W., and Schnekenburger J. Integral refractive index determination of living suspension cells by multi focus digital holographic phase contrast microscopy // *J. Biomed. Opt.* 2007. V. 12. P. 054009.
882. Rappaz B., Charriere F., Depeursinge C., Magistretti P.J., and Marquet P. Simultaneous cell morphometry and refractive index measurement with dual-wavelength digital holographic microscopy and dye-enhanced dispersion of perfusion medium // *Opt. Lett.*, 2008. V. 33. P. 744–746.
883. Debailleul M., Georges V., Simon B., Morin R., and Haeberlé O. High resolution three-dimensional tomographic diffractive microscopy of transparent inorganic and biological samples // *Opt. Lett.* 2009. V. 34. P. 79–81.
884. Popescu G., Ikeda T., Best C., Badizadegan K., Dasari R.R., and Feld M.S. Erythrocyte structure and dynamics quantified by Hilbert phase microscopy // *J. Biomed. Opt.* 2005. V. 10. P. 060503-1–3.
885. Yishnyakov G., Levin G., Minaev V., Pickalov V., and Likharev A. Tomographic interference microscopy of living cells // *Europ. J. Microscopy and Analysis* 2004. V. 87. P. 19–21.
886. Park Y., Popescu G., Badizadegan K., Dasari R., Feld M. Diffraction phase and fluorescence microscopy // *Opt. Express* 2006. V. 14, № 18. P. 8263–8268.
887. Popescu G., Park Y., and Choi W. Imaging red blood cell dynamics by quantitative phase microscopy // *Blood Cells Mol. Diseases* 2008. V. 4, № 1. P. 10–16.
888. Lue N., Choi W., Popescu G., Yaqoob Z., Badizadegan K., Dasari R., and Feld M. Live cell refractometry using Hilbert phase microscopy and confocal reflectance // *J. Phys. Chem. A.* 2009. V. 113. P. 13327–13330.
889. Park Y.-K., Best C.A., Badizadegan K., Dasari R.R., Feld M.S., Kuriabova T., Henle M.L., Levine A.J., and Popescu G. Measurement of red blood cell mechanics during morphological changes // *Proc. Nat. Acad. Sci.* 2010. V. 107, № 15. P. 6731–6736.
890. Tychinsky V.P. On superresolution of phase objects // *Opt. Comm.* 1989. V. 74. P. 41–45.
891. Тычинский В.П., Тавров А.В., Шепельский Д.О., Щучкин А.Г. Экспериментальное подтверждение возможности сверхразрешения фазовых объектов // *Письма в ЖТФ* 1991. Т. 17, № 22. С. 80–83.
892. Кретушев А.В., Тычинский В.П. Сверхразрешение в сингулярных точках фазовых изображений // *Квантовая электроника* 2002. Т. 32, № 1. С. 66–70.
893. Чиссов В.И., Тычинский В.П., Волченко Н.Н., Решетов И.В., Кретушев А.В., Вышенская Т.В., Славнова Е.Н., Барыгина В.В., Клемяшов И.В. Когерентная фазовая микроскопия опухолей на модели рака молочной железы // *Российский онкологический журнал* 2006. Т. 2. С. 11–15.
894. Тычинский В.П., Кретушев А.В., Клемяшов И.В., Вышенская Т.В., Иванов А.Б., Игнатъев П.С., Филиппова Н.А., Райхлин Н.Т., Штиль А.А. Снижение фазовой толщины — характерная реакция ядрышек на токсические воздействия при исследовании методом когерентной фазовой микроскопии // *Бюлл. эксп. биол. мед.* 2007. Т. 4. С. 473–477.
895. Sacconi L., Mapelli J., Gandolfi D., Lotti J., O'Connor R.P., D'Angelo E., and Pavone F.S. Optical recording of electrical activity in intact neuronal networks with random access second-harmonic generation microscopy // *Opt Express*. 2008. V. 16, № 19. P. 14911–14911.
896. Nazarov M., Shkurinov A., Tuchin V.V., and Zhang X.-C. Terahertz tissue spectroscopy and imaging, Chapter 17 in *Handbook of Photonics for Biomedical Science* / Ed. by Tuchin V.V. CRC Press, London: Taylor & Francis Group, 2010. P. 592–617.

897. Назаров М.М., Шкуринов А.П., Кулешов Е.А., Тучин В.В. Терагерцовая импульсная спектроскопия биологических тканей // Квантовая электроника 2008. Т. 38, № 7. С. 647–654.
898. Zhang X.-C., Hu B.B., Darrow J.T., Auston D.H. Generation of femtosecond electromagnetic pulses from semiconductor surfaces // Appl. Phys. Lett. 1990. V. 56. P. 1011–1013.
899. Nazarov M.M., Makarova S.A., Shkurinov A.P., Okhotnikov O.G. The use of combination of nonlinear optical materials to control THz pulse generation and detection // Appl. Phys. Lett. 2008. V. 92. P. 021114–021117.
900. Nazarov M.M., Shkurinov A.P., and Tuchin V.V. Tooth study by terahertz time-domain spectroscopy // Proc. SPIE 2008. V. 6791. P. 679109-1–9.
901. Nazarov M.M., Shkurinov A.P., Tuchin V.V., and Zhernovaya O.S. Modification of terahertz pulsed spectrometer to study biological samples // Proc. SPIE 2007. V. 6535. P. 65351J-1–7.
902. Dolotov L.E., Sinichkin Yu.P., Tuchin V.V., Utz S.R., Altshuler G.B., Yaroslavsky I.V. Design and evaluation of a novel portable erythema-melanin-meter // Laser Surg. Med. 2004. V. 34, № 2. P. 127–135.
903. Pickering J.W., Moes C.J.M., Sterenborg H.J.C.M. et al. Two integrating spheres with an intervening scattering sample // J. Opt. Soc. Am. A. 1992. V. 9. P. 621–631.
904. Pickering J.W., Prahl S.A., van Wieringen N. et al. Double-integrating sphere system for measuring the optical properties of tissue // Appl. Opt. 1993. V. 32. P. 399–410.
905. Prahl S.A., van Gemert M.J.C., Welch A.J. Determining the optical properties of turbid media by using the adding-doubling method // Appl. Opt. 1993. V. 32. P. 559–568.
906. Hammer M., Roggan A., Schweitzer D., Müller G. Optical properties of ocular fundus tissues — an *in vitro* study using the double-integrating-sphere technique and inverse Monte Carlo simulation // Phys. Med. Biol. 1995. V. 40. P. 963–978.
907. Star W.M. The relationship between integrating sphere and diffusion theory calculations of fluence rate at the wall of a spherical cavity // Phys. Med. Biol. 1995. V. 40. P. 1–8.
908. Marquet P., Bevilacqua F., Depeursinge C., de Haller E.B. Determination of reduced scattering and absorption coefficients by a single charge-coupled-device array measurement. 1. Comparison between experiments and simulations // Opt. Eng. 1995. V. 34. P. 2055–2063.
909. Bevilacqua F., Marquet P., Depeursinge C., de Haller E.B. Determination of reduced scattering and absorption coefficients by a single charge-coupled-device array measurement. 2. Measurements on biological tissue // Opt. Eng. 1995. V. 34. P. 2064–2069.
910. Bevilacqua F., Pignatelli D., Marquet P. et al. *In vivo* local determination of tissue optical properties // Photon migration in tissues / Ed. by Benaron D., Chance B., Ferrari M. Bellingham: SPIE, 1997. V. 3194–39.
911. Bashkatov A.N., Genina E.A., and Tuchin V.V. Tissue optical properties, Chapter 5 in Handbook of Biomedical Optics / Ed. by Boas D.A., Pitrakis C., and Ramanujam N. CRC Press, London: Taylor & Francis Group, 2010.
912. Yaroslavsky A.N., Yaroslavsky I.V., Goldbach T., et al. Influence of the scattering phase function approximation on the optical properties of blood determined from the integrating sphere measurements // J. Biomed. Opt. 1999. V. 4. P. 47–53.
913. Ярославская А.Н., Приезжев А.В., Родригес Х., Ярославский И.В., Баттарби Г. Оптика крови // Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1 / Под ред. Тучина В.В. М.: Физматлит, 2007. С. 157–196; пер. с англ. под ред. Тучина В.В. Handbook of Optical Biomedical Diagnostics / Ed. by Tuchin V.V. Bellingham, WA: SPIE Press, 2002.
914. Yaroslavsky A.N., Schulze P.C., Yaroslavsky I.V., et al. Optical properties of selected native and coagulated human brain tissues *in vitro* in the visible and near infrared spectral range. Phys. Med. Biol. 2002. V. 47. P. 2059–2073.
915. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Кочубей В.И., Тучин В.В., Чикина Е.Э., Князев А.Б., Мареев О.В. Оптические свойства слизистой оболочки в спектральном диапазоне 350–2000 нм // Опт. спектр. 2004. Т. 97, № 6. С. 1043–1048.
916. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Кочубей В.И., Тучин В.В. Оптическое просветление твердой мозговой оболочки человека // Опт. спектр. 2005. Т. 98, № 3. С. 515–521.

917. *Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., and Tuchin V.V.* Optical properties of human skin, subcutaneous and mucous tissues in the wavelength range from 400 to 2000 nm // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2005. V. 38. P. 2543–2555.
918. *Башкатов А.Н., Генина Э.А., Кочубей В.И., Тучин В.В.* Оптические свойства подкожной жировой ткани в спектральном диапазоне 400–2500 нм // *Опт. спектр.* 2005. V. 99, № 5. С. 868–874.
919. *Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., and Tuchin V.V.* Optical properties of human cranial bone in the spectral range from 800 to 2000 nm // *Proc SPIE* 2006. V. 6163. C. 616310-21.
920. *Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Gavrilova A.A., Kapralov S.V., GrishaeV V.A., and Tuchin V.V.* Optical properties of human stomach mucosa in the spectral range from 400 to 2000 nm: prognosis for gastroenterology // *Medical Laser Application* 2007. V. 22. P. 95–104.
921. *Bashkatov A.N., Genina E.A., Kochubey V.I., Kamenskikh T.G., and Tuchin V.V.* Optical clearing of human eye sclera // *Proc SPIE* 2009. V. 7163. P. 71631R.
922. *Башкатов А.Н., Генина Э.А., Кочубей В.И., Тучин В.В.* Оптические свойства склеры глаза человека в спектральном диапазоне 370–2500 нм // *Опт. спектр.* 2010. Т. 109, № 2. С. 226–234.
923. *Key H., Davies E.R., Jackson P.C., Wells P.N.T.* Optical attenuation characteristics of breast tissues at visible and near-infrared wavelengths // *Phys. Med. Biol.* 1991. V. 36, № 5. P. 579–590.
924. *Marchesini R., Bertoni A., Andreola S. et al.* Extinction and absorption coefficients and scattering phase functions of human tissues in vitro // *Appl. Opt.* 1989. V. 28. P. 2318–2324.
925. *Jacques S.L., Alter C.A., Prahl S.A.* Angular dependence of the He-Ne laser light scattering by human dermis // *Lasers Life Sci.* 1987. V. 1. P. 309–333.
926. *Yaroslavskaya A.N., Utz S.R., Tatarintsev S.N., Tuchin V.V.* Angular scattering properties of human epidermal layers // *Cell and biotissue optics: applications in laser diagnostics and therapy* / Ed. V.V. Tuchin. Bellingham: SPIE, 1994. V. 2100. P. 38–41.
927. *Driver I., Lowdell C.P., Ash D.V.* *In vivo* measurement of the optical interaction coefficients of human tumours at 630 nm // *Phys. Med. Biol.* 1991. V. 36. P. 805–813.
928. *Peters V.G., Wyman D.R., Patterson M.S., Frank G.L.* Optical properties of normal and diseased human tissues in the visible and near infrared // *Phys. Med. Biol.* 1990. V. 35. P. 1317–1334.
929. *Graaff R., Aarnoudse J.G., Zijp J.R. et al.* Reduced light scattering properties for mixtures of spherical particles: a simple approximation derived from Mie calculations // *Appl. Opt.* 1992. V. 31. P. 1370–1376.
930. van der Zee P. Methods for measuring the optical properties of tissue samples in the visible and near infrared wavelength range // *Medical Optical Tomography: Functional Imaging and Monitoring* / Ed. by Müller G., Chance B., Alfano R. et al. Bellingham: SPIE, 1993. V. IS11.
931. *Fine I., Loewinger E., Weinreb A., Weinberger D.* Optical properties of the sclera // *Phys. Med. Biol.* 1985. V. 30. P. 565–571.
932. *Топорец А.С.* Оптика шероховатой поверхности. М.: Машиностроение, 1988.
933. *Wang L.-H., Jacques S.L.* Use of laser beam with an oblique angle of incidence to measure the reduced scattering coefficient of a turbid medium // *Appl. Opt.* 1995. V. 34. P. 2362–2366.
934. *Lin S.-P., Wang L.-H., Jacques S.L., Tittel F.K.* Measurement of tissue optical properties by the use of oblique-incidence optical fiber reflectometry // *Appl. Opt.* 1997. V. 36. P. 136–143.
935. *Bolin F.P., Preuss L.E., Taylor R.C., Ference R.J.* Refractive index of some mammalian tissues using a fiber optic cladding method // *Appl. Opt.* 1989. V. 28. P. 2297–2303.
936. *Шумилина С.Ф.* Дисперсия действительной и мнимой части комплексного показателя преломления гемоглобина в диапазоне 450–820 нм // *Изв. АН БССР. Сер. физ.-мат. наук.* 1984. № 1. С. 79–84.

937. Грисимов В.Н. Показатель преломления основного вещества дентина // Опт. спектр. 1994. Т. 77. С. 272–273.
938. Тучин В.В., Башкатов А.Н., Генина Э.А., Синичкин Ю.П., Лакодина Н.А. *In vivo* исследование динамики иммерсионного просветления кожи человека // Письма ЖТФ 2001. Т. 27, № 12. С. 10–14.
939. Galanzha E.I., Tuchin V.V., Solov'eva A.V., and Zharov V.P. Development of optical diagnostics of microlymphatics at the experimental lymphedema: comparative analysis // J. X-Ray Sci. and Technol. 2002. V. 10. P. 215–223.
940. Galanzha E.I., Tuchin V.V., Solovieva A.V., Stepanova T.V., Luo Q., Cheng H. Skin backreflectance and microvascular system functioning at the action of osmotic agents // J. Phys. D: Appl. Phys. 2003. V. 36. P. 1739–1746.
941. Башкатов А.Н., Генина Э.А., Синичкин Ю.П., Кочубей В.И., Лакодина Н.А., Тучин В.В. Определение коэффициента диффузии глюкозы в склере глаза человека // Биофизика 2003. Т. 48, № 2. С. 309–313.
942. Tuchin V.V., Zhestkov D.M., Bashkatov A.N., and Genina E.A. Theoretical study of immersion optical clearing of blood in vessels at local hemolysis // Optics Express 2004. V. 12. P. 2966–2971.
943. Башкатов А.Н., Жестков Д.М., Генина Э.А., Тучин В.В. Иммерсионное просветление крови человека в видимом и ближнем ИК спектральных диапазонах // Опт. спектр. 2005. Т. 98, № 4. С. 695–703.
944. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Синичкин Ю.П., Тучин В.В. Оптическое просветление склеры глаза *in vivo* под действием глюкозы // Квантовая электроника 2006. Т. 36, № 12. С. 1119–1124.
945. Tuchin V.V., Altshuler G.B., Gavriloa A.A., Pravdin A.B., Tabatadze D., Childs J., Yaroslavsky I.V. Optical clearing of skin using flashlamp-induced enhancement of epidermal permeability // Lasers Surg. Med. 2006. V. 38, № 9. P. 824–836.
946. Bashkatov A.N., Genina E.A., Tuchin V.V., Altshuler G.B. Skin optical clearing for improvement of laser tattoo removal // Laser Physics 2009. V. 19, № 6. P. 1312–1322.
947. Oliveira L., Lage A., Clemente M.P., Tuchin V. Optical characterization and composition of abdominal wall muscle from rat // Opt. Lasers Eng. 2009. V. 47, № 6. P. 667–672.
948. Wen X., Tuchin V.V., Luo Q., and Zhu D. Controlling the scattering of Intralipid by using optical clearing agents // Phys. Med. Biol. 2009. V. 54, № 22. P. 6917–6930.
949. Tuchin V.V. The latest advances in skin optical clearing // SOFW Journal 2009. № 10. P. 48–57.
950. Liu C., Zhi Z., Tuchin V.V., Luo Q., and Zhu D. Enhancement of skin optical clearing efficacy using photo-irradiation // Lasers Surg. Med. 2010. V. 42. P. 132–140.
951. Ghosn M.G., Sudheendran N., Wendt M., Glasser A., Tuchin V.V., Larin K.V. Monitoring of glucose permeability in monkey skin *in vivo* using optical coherence tomography // J. Biophoton. 2010. V. 3, № 1–2. P. 25–33.
952. Wen X., Mao Z., Han Z., Tuchin V.V., and Zhu D. *In vivo* skin optical clearing by glycerol solutions: mechanism // J. Biophoton. 2010. V. 3, № 1–2. P. 44–52.
953. Oliveira L., Lage A., Clemente M.P., Tuchin V. Rat Muscle opacity decrease due to the osmosis of a simple mixture // J. Biomed. Opt. 2010. V. 15, № 5. P. 055004-1-9.
954. Special issue on optical clearing for biomedical imaging / Ed. by Tuchin V.V., Leahy M., and Zhu D. // J. Innov. Opt. Health Sci. 2010. V. 3, № 3. P. 147–211.
955. Sudheendran N., Mohamed M., Ghosn M.G., Tuchin V.V., and Larin K.V. Assessment of tissue optical clearing as a function of glucose concentration using optical coherence tomography // J. Innov. Opt. Health Sci. 2010. V. 3, № 3. P. 169–176.
956. Migacheva E.V., Pravdin A.B., and Tuchin V.V. Alterations in autofluorescence signal from rat skin *ex vivo* under optical immersion clearing // J. Innov. Opt. Health Sci. 2010. V. 3, № 3. P. 147–152.
957. Генина Э.А., Башкатов А.Н., Синичкин Ю.П., Тучин В.В. Оптическое просветление кожи под действием глицерина: исследования *ex vivo* и *in vivo* // Оптика и спектроскопия 2010. Т. 109, № 2. С. 256–263.

958. Аскарьян Г.А. Увеличение прохождения лазерного и другого излучения через мягкие мутные физические и биологические среды // Квант. электрон. 1982. Т.9, №7. С.1379–1383.
959. Vogt W. C., Shen H. and Wang G., and Rylander C. G. Parametric study of tissue optical clearing by localized mechanical compression using combined finite element and Monte Carlo simulation // J. Innov. Opt. Health Sci. 2010. V. 3, № 3. P. 203–211.
960. Иванов А.П., Макаревич С.А., Хайруллина А.Я. Распространение излучения в тканях и жидкостях с плотно упакованными рассеивателями // ЖПС. 1987. Т. 47. С. 662–668.
961. Rol P., Niederer P., Dürr U. et al. Experimental investigation on the light scattering properties of the human sclera // Laser Light Ophthal. 1990. V. 3. P. 201–212.
962. Rol P. O. Optics for transscleral laser applications: Dis. for the degree of Doctor of Natural Sciences. Zurich, 1992, 152 p.
963. Qu J., Wilson B. C. Monte Carlo modeling studies of the effect of physiological factors and other analytes on the determination of glucose concentration *in vivo* by near infrared optical absorption and scattering measurements // J. Biomed. Opt. 1997. V. 2, № 3. P. 319–325.
964. Veretout F., Delaye M., Tardieu A. Molecular basis of lens transparency. Osmotic pressure and X-ray analysis of α -crystallin solutions // J. Mol. Biol. 1989. V. 205. P. 713–728.
965. Максимова И.Л., Зимняков Д.А., Тучин В.В. Управление оптическими свойствами биотканей. 1. Спектральные характеристики склеры глаза // Оптика и спектроскопия 2000. Т. 89, № 1. С. 86–95.
966. Зимняков Д.А., Максимова И.Л., Тучин В.В. Управление оптическими свойствами биотканей. 2. Когерентно-оптические методы исследования структуры тканей // Оптика и спектроскопия 2000. Т. 88, № 6. С. 1026–1034.
967. Chance B., Liu H., Kitai T., Zhang Y. Effects of solutes on optical properties of biological materials: models, cells, and tissues // Anal. Biochem. 1995. V. 227. P. 351–362.
968. Liu H., Beauvoit B., Kimura M., Chance B. Dependence of tissue optical properties on solute — induced changes in refractive index and osmolarity // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1. P. 200–211.
969. Kolmel K. F., Sennhenn B., Giese K. Investigation of skin by ultraviolet remittance spectroscopy // British J. Dermatol. 1990. V. 122, № 2. P. 209–216.
970. Утц С.Р., Синичкин Ю.П., Пилипенко Е.А. *In vivo* лазерная флуоресцентная спектроскопия кожи человека: влияние эритемы // Опт. спектр. 1994. Т. 76, № 5. С. 864–868.
971. Синичкин Ю.П., Утц С.Р., Долотов Л.Е., Пилипенко Е.А., Тучин В.В. Методика и прибор для оценки степени эритемы и меланиновой пигментации кожи человека // Радиотехника. 1997. № 4. С. 77–81.
972. Утц С.Р., Кнушке П., Синичкин Ю.П. Применение неинвазивных методов диагностики в экспериментальной дерматологии // Вестн. дерматол. 1997. № 1. С. 13–16.
973. Соустов Л.В., Челноков Е.В., Сапогова Н.В., Битюрин Н.М., Немов В.В., Сергеев Ю.В., Островский М.А. Исследование биофизических механизмов агрегации кристаллинов, индуцированной импульсным лазерным УФ излучением 308 нм // Биофизика 2008. Т. 53, № 4. С. 582–597.
974. Соустов Л.В., Челноков Е.В., Сапогова Н.В., Битюрин Н.М., Немов В.В., Карпова О.Е., Шеремет Н.Л., Полуниц Г.С., Аветисов С.Э., Островский М.А. Исследование влияния шапероноподобной (защитной) активности короткоцепочечных пептидов на скорость УФ-индуцированной эксимерным лазером агрегации бета-кристаллина // Вестник офтальмологии 2008. Т. 124, № 2. С. 6–8.
975. Grzegorzewski B., Yermolenko S. Speckle in far-field produced by fluctuations associated with phase separation // Proc. SPIE, Bellingham, SPIE, 1995. V. 2647. P. 343–349.
976. Schwarzmaier H.-J., Heintzen M. P., Müller W. et al. Optical density of vascular tissue before and after 308-nm excimer laser irradiation // Opt. Eng. 1992. V. 31. P. 1436–1440.
977. Genina E. A., Bashkatov A. N., and Tuchin V. V. Tissue optical immersion clearing // Expert Review of Medical Devices 2010.
978. Карлов Н.В. Лекции по квантовой электронике. М.: Наука, 1988.
979. Справочник по лазерам / Под ред. А.М. Прохорова. М.: Сов. Радио, 1978. Т. 1, 2.

980. Демтредер В. Лазерная спектроскопия. Основные принципы и техника эксперимента. М.: Наука, 1985; Demtröder W. Laser Spectroscopy V. 1: Basic Principles; V. 2: Experimental Techniques / 4th edition. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2008 / Пер. с англ.; под ред. Мельникова Л. А. М.: Интеллект, 2011.
981. Справочник по лазерной технике / Пер. с нем.; под ред. А. П. Напартовича. М.: Энергоатомиздат, 1991.
982. Дьюли У. Лазерная технология и анализ материалов. М.: Мир, 1986.
983. Баранов В. Ю., Борисов В. М., Степанов Ю. Ю. Электроразрядные эксимерные лазеры на галогенидах инертных газов. М.: Энергоатомиздат, 1988.
984. Технологические лазеры. Справочник / Под ред. Г. А. Абилюева. М.: Машиностроение, 1991. Т. 1, 2.
985. Звелто О. Принципы лазеров. М.: Мир, 1990.
986. Мнускин В. Е., Тринчук Б. Ф., Токарев А. Н. Перестраиваемые лазеры на красителях в твердой матрице. М.: ЦНИИ «Электроника», 1987.
987. Алексеев В. А., Тринчук Б. Ф. Лазеры на растворах органических соединений с ламповой накачкой. М.: ЦНИИ «Электроника», 1985.
988. Special issue on solid-state lasers // IEEE J. Quant. Electr. 1988. V. 24, № 6. P. 883–1228.
989. Материалы V Международной конференции «Перестраиваемые лазеры» // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1990. Т. 54, № 8. С. 1442–1568.
990. Борников Н. В. Инжекционные гетеролазеры видимого диапазона. М.: ЦНИИ «Электроника», 1987.
991. Тучин В. В. Флуктуации в инжекционных полупроводниковых лазерах. М.: ЦНИИ «Электроника», 1986.
992. Birngruber R. Laser output characteristics // Health Phys. 1989. V. 56, № 5. P. 605–611.
993. Тучин В. В. Динамические процессы в газоразрядных лазерах. М.: Энергоатомиздат, 1990.
994. Алейников В. С., Масычев В. И. Лазеры на окиси углерода. М.: Радио и связь, 1990.
995. Аблеков В. К., Денисов Ю. Н. Проточные химические лазеры. М.: Энергоатомиздат, 1987.
996. Зверев Г. М., Голяев Ю. Д., Шалаев Е. А., Шокин А. А. Лазеры на алюмоиттриевом гранате с неодимом. М.: Радио и связь, 1985.
997. Реди Дж. Промышленное применение лазеров. М.: Мир, 1981.
998. Ахманов С. А., Выслоух В. А., Чиркин А. С. Оптика фемтосекундных лазерных импульсов. М.: Наука, 1988.
999. Херман Й., Вильгельми Б. Лазеры ультракоротких импульсов. М.: Мир, 1987.
1000. Витteman В. СО₂-лазер. М.: Мир, 1990.
1001. Дутов А. И., Евстратов И. Ю., Иванов В. Н. и др. Экспериментальное исследование и численное моделирование щелевого волноводного СО₂-лазера с высокочастотной накачкой // Квант. электрон. 1996. Т. 23, № 6. С. 499–503.
1002. Кубарев В. В., Куренский Е. А. Сверхмалозумящий мощный DCN-лазер с высокочастотной накачкой // Квант. электрон. 1996. Т. 23, № 4. С. 311–314; Кубарев В. В., Куренский Е. А. Сверхмалозумящий Н₂О-лазер с высокочастотной накачкой // Квант. электрон. 1995. Т. 22, № 12. С. 1179–1183.
1003. Сонин А. Ю. Субнаносекундный УФ азотный ТЕА-лазер // Квант. электрон. 1994. Т. 21, № 3. С. 213–215.
1004. Бондарчук Я. М., Возняк Р. М., Корбецкий Р. В., Привалов В. Е. Гелий-неоновые лазеры на слабых переходах неона. М.: ЦНИИ «Электроника», 1990.
1005. Ristici M. Determination of unsaturated gain coefficient and saturation intensity for some visible laser transitions in He–Ne mixture // Rev. Roum. Phys. 1982. V. 27, № 6–7. P. 577–580.
1006. Jhao Suitang. Study of model HND-120 visible multi-wavelength He–Ne laser // Chin. J. Lasers. 1984. V. 11, № 1. P. 34–38.
1007. Jhao Suitang. The He–Ne laser working on one of the eight lines in μm range // Chin. J. Lasers. 1986. V. 13, № 5. P. 314–316.

1008. Гусак П. М., Михайловский С. С. Перестраиваемый по частоте лазер на базе ЛГ-126 // ПТЭ. 1987. № 5. С. 162–164.
1009. Козубовский В. Р., Голдовский В. Л., Чекрий С. Г. Переключение длин волн He–Ne лазера, работающего на конкурирующих переходах // Укр. физ. ж. 1988. Т. 33, № 4. С. 526–529.
1010. Бойко С. А., Попов А. И. Анализ NO с помощью He–Ne лазера и зеемановской модуляции поглощения // Опт. атмосф. 1988. Т. 1, № 5. С. 119–121.
1011. Привалов В. Е. Газоразрядные лазеры в измерительных комплексах. Л.: Судостроение, 1989.
1012. Куликова Н. И., Перебякин В. А., Эцин И. Ш. Стабильность положения пучков излучения лазеров ЛГН-207А и ЛГН-208 // ОМП. 1986. № 9. С. 56–57.
1013. Holmes L. Metal-vapor lasers special capabilities for special applications // Laser Focus / Electro-Opt. 1986. V. 22, № 12. P. 76, 78, 80.
1014. Алейников В. С., Беляев В. П., Девятков Н. Д. и др. Лазер на парах меди — источник излучения для многофункциональной медицинской аппаратуры в биомедицинских исследованиях // Электрон. промышл. 1984. № 10 (138). С. 10–12.
1015. Гарагатый С. Н., Пеленков В. П., Юдин Н. А. Лазеры на парах меди с независимым нагревом «Милан-М/2Е» // Квант. электрон. 1988. Т. 15, № 10. С. 1974–1975.
1016. Логинов А. С., Соколов Г. Н., Маркин Е. П., Амбарцумян Р. Б. Применение лазеров на парах меди при лечении длительно незаживающих язв желудка // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1990. Т. 54, № 10. С. 1957–1960.
1017. Буткевич В. И., Привалов В. Е. Особенности применения лазеров в прецизионных аналитических измерениях // ЖПС. 1988. Т. 49, № 2. С. 183–201.
1018. Бабин С. А., Донин В. И. Провал Лэмба и времена жизни нижних лазерных уровней иона Ag III // Опт. спектр. 1985. Т. 59, № 5. С. 983–987.
1019. Бадалян А. М., Бондарев Б. В., Донин В. И., Тимофеев Т. Т. Мощный аргоновый лазер для применения в голографии // Квант. электрон. 1986. Т. 13, № 9. С. 1917–1919.
1020. Быковский В. Ф., Дятлов М. К., Малькова Г. И. и др. Мощный аргоновый лазер синне-зеленого диапазона ЛГН-11 // ПТЭ. 1987. № 6. С. 203.
1021. Omnichrome argon and argon/krypton ion lasers. Chino, 1997.
1022. Быковский В. Ф., Дятлов М. К., Малькова Г. И. и др. Мощный аргоновый лазер ультрафиолетового диапазона // Автометрия. 1987. № 2. С. 113–114.
1023. Innova ion laser systems. The essence of innovations. Coherent, 1988. May.
1024. Иванов И. Г., Латуш Е. Л., Сэм М. Ф. Ионные лазеры на парах металлов. М.: Энергоатомиздат, 1989.
1025. Тучин В. В. Флуктуации в лазерах на парах металлов. М.: ЦНИИ «Электроника», 1985.
1026. Eberhardt J. E., Haub J. G., Whitbourn L. B. Carbon dioxide laser tuning through 110 lines in 3 ms for airborne remote sensing // Appl. Opt. 1988. V. 27, № 5. P. 879–884.
1027. Кухлевский С. В., Проворов А. С., Реушев М. Ю. Волноводный CO₂-лазер на полосах секвенции с поперечным ВЧ возбуждением через диэлектрик // Квант. электрон. 1989. Т. 16, № 3. С. 465–468.
1028. Осипов В. В., Тельнов В. А., Хамидулин Г. М. Малогабаритный импульсно-периодический отпаянный CO₂-лазер // ПТЭ. 1988. № 1. С. 181–182.
1029. Герасимчук А. Г., Корнилов С. Т., Проценко Е. Д., Тымпер С. И. Эффективный CO₂-лазер с высокочастотным возбуждением активной среды // ПТЭ. 1988. № 2. С. 222.
1030. CO₂-laser in kompakter banform // Electron.-Technol. Electron.-Auwend. Electron.-Market. 1988. № 9. P. 47–48.
1031. Zhengyu M. Biological research by optically pumped far infrared lasers // Infrared Phys. 1989. V. 29. № 2–4. P. 631–636.
1032. Батыгов А. А., Гриценко А. Н., Морозов В. И. и др. Миниатюрный азотный лазер с поперечным возбуждением // ПТЭ. 1986. № 4. С. 223.
1033. Борисов В. М., Виноходов А. Ю., Кирюхин Ю. Б. и др. Компактный импульсно-периодический XeCl-лазер // ПТЭ. 1988. № 4. С. 157–159.
1034. Sierra R. Flashlamp-excited dye lasers achieve new performance levels // Laser Focus / Electro-Opt. 1988. V. 24, № 4. P. 77–91.

1035. Копылов С. М., Лысой Б. Г., Серегин С. Л., Чередниченко О. Б. Перестраиваемые лазеры на красителях и их применение. М.: Радио и связь, 1991.
1036. Жильцов В. И., Климашина А. Г., Мнускин В. Е. и др. Лазер на красителях, перестраиваемый в диапазоне длин волн 217–3100 нм // ЖПС. 1985. Т. 43, № 3. С. 400–404.
1037. Бабенко В. А., Сычев А. А. Эффективная генерация в диапазоне 1,1–1,5 мкм суперфлуоресцентного лазера на ИК красителях в твердотельной матрице // Квант. электрон. 1996. Т. 23, № 5. С. 413–416.
1038. Ищенко А. А. Лазерные среды на основе полиметиновых красителей // Квант. электрон. 1994. Т. 21, № 6. С. 513–534.
1039. Крымов А. И., Петухов В. А. Получение широкой области перестройки длины волны генерации в зеленой и красной областях спектра на новых лазерных красителях // Квант. электрон. 1986. Т. 13, № 3. С. 657–658.
1040. Аникеев Ю. Г., Жаботинский М. Е., Кравченко В. Б. Лазеры на неорганических жидкостях. М.: Наука, 1986.
1041. Надточеев В. Е., Наний О. Е. Двухволновая генерация в непрерывном твердотельном лазере на YAG:Nd^{3+} // Квант. электрон. 1989. Т. 16, № 4. С. 680–684.
1042. Конов В. И., Прохоров А. М., Сисакян И. Н. и др. Лазеры ближнего ИК диапазона на основе кристаллов хромсодержащих скандиевых гранатов // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1990. Т. 54, № 10. С. 1935–1940.
1043. Гапонцев В. П., Громов А. К., Изынеев А. А. и др. Низкопороговый минилазер на эрибиевом стекле // Квант. электрон. 1989. Т. 16, № 4. С. 684–686.
1044. Севостьянов Б. К., Орехов В. П., Набатов В. В. и др. Квазинепрерывный перестраиваемый лазер на кристаллах $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Ti}^{3+}$ с ламповой накачкой // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1990. Т. 54, № 8. С. 1463–1466.
1045. Holmes L. Tunable crystals and diodes lasers in the infrared // Laser Focus / Electro-Opt. 1986. V. 22, № 4. P. 70–76.
1046. Круглик Г. С., Скрипко Г. А., Шкадаревич А. П. и др. Генерационные характеристики лазера на кристалле $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Ti}^{3+}$ при когерентной накачке // Квант. электрон. 1986. Т. 13, № 6. P. 1207–1209.
1047. Пестряков Е. В., Трунов В. И., Алимпов А. И. Генерация перестраиваемого излучения в лазере на $\text{BeAl}_2\text{O}_4:\text{Ti}^{3+}$ при импульсной когерентной накачке с высокой частотой повторения // Квант. электрон. 1987. Т. 14, № 5. С. 919–922.
1048. Митягин М. В., Никитин С. Н., Силкин Н. И. и др. Активные среды для перестраиваемых лазеров на основе хромсодержащих фторидов // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1990. Т. 54, № 8. С. 1512–1519.
1049. Basiev T. T., Zverev P. G., Fedorov V. V., Mirov S. B. Multiline, superbroadband and sun-color oscillation of a LiF:F_2 -color-center laser // Appl. Opt. 1997. V. 36, № 12. P. 2512–2522.
1050. Барышников В. И., Колесникова Т. А. Перестраиваемый лазер видимого диапазона на основе кристаллов сапфира с центрами окраски // Квант. электрон. 1996. Т. 23, № 9. P. 779–781.
1051. Инжекционные лазеры в системах передачи и обработки информации / Тр. ФИАН. М.: Наука, 1987. Т. 185.
1052. Грибковский В. П. Полупроводниковые лазеры. Минск: 1988.
1053. Елисеев П. Г. Введение в физику инжекционных лазеров. М.: Наука, 1983.
1054. Ривлин Л. А., Семенов А. Т., Якубович С. Д. Динамика и спектры излучения полупроводниковых лазеров. М.: Радио и связь, 1983.
1055. Физика полупроводниковых лазеров / Под ред. Х. Такумы; пер. с япон.; М.: Мир: 1989.
1056. Полупроводниковые инжекционные лазеры. Динамика, модуляция, спектры / Под ред. У. Тсанга; пер. с англ.; М.: Радио и связь, 1990.
1057. Дьякова Ю. Г., Куратов И. И., Мирошниченко Т. А. Твердотельные лазеры с накачкой лазерными диодами // Зарубежная радиоэлектроника. 1988. № 6. С. 42–55.
1058. Акимова И. В., Бочкарев А. Э., Долгинов Л. М. и др. Инжекционные лазеры спектрального диапазона 2,0–2,4 мкм, работающие при комнатной температуре // ЖТФ. 1988. Т. 58, № 4. С. 701–707.

1059. *Berger J., Welch D.F., Streifer W. et al.* Fiber-bundle coupled diode end-pumped Nd:YAG laser // *Opt. Lett.* 1988. V. 13, № 4. P. 306–308.
1060. *Белозеров С.А., Бессонов Ю.Л., Бородулин В.И. и др.* Высокоэффективный твердотельный лазер, излучающий в зеленой области спектра // *Квант. электрон.* 1988. Т. 15, № 5. P. 962–963.
1061. *Куратов И.И., Цветков Ю.В.* Неодимовые излучатели с лазерной диодной накачкой // *Изв. АН СССР. Сер. физическая.* 1990. Т. 54, № 10. С. 1994–2001.
1062. *Никогосян Д.Н., Гурзаян Г.Г.* Кристаллы для нелинейной оптики // *Квант. электрон.* 1987. Т. 14, № 8. С. 1529–1541; *Гурзаян Г.Г., Дмитриев В.Г., Никогосян Д.Н.* Нелинейно-оптические кристаллы. М.: Радио и связь, 1991.
1063. *Крылов В.Н., Михайлов В.Н., Стаселько Д.И.* Импульсный лазер на АИГ с преобразованием частоты в УФ, видимой и ИК областях спектра // *ОМП.* 1987. № 8. С. 22–25.
1064. *Андреев Ю.М., Бовдей С.М., Гейко П.П. и др.* Многочастотный лазерный источник диапазона 2,6–3,2 мкм // *Опт. атмосфер.* 1988. Т. 1, № 4. С. 124–127.
1065. *Маршалл Т.* Лазер на свободных электронах. М., Мир, 1987.
1066. *Борисов В.И., Лебедев В.И.* Промышленные гелий-неоновые лазеры — источники стабильных субнаносекундных импульсов // *Квант. электрон.* 1986. Т. 13, № 8. С. 1736–1738.
1067. *Becker P.C., Fragnito H.L., Fork R.L. et al.* Generation of tunable 9 femtosecond optical pulses in the near infrared // *Appl. Phys. Lett.* 1989. V. 54, № 5. P. 411–412.
1068. *Moore D.S., Schmidt S.C.* Tunable subpicosecond infrared pulse generation to 4 μm // *Opt. Lett.* 1987. V. 12, № 7. P. 480–482.
1069. *Boima B.E., Tearney G.J., Voppart S.A. et al.* High resolution optical coherence tomographic imaging using mode-locked Ti: Al₂O₃ laser source // *Opt. Lett.* 1995. V. 20. P. 20–23.
1070. *Boima B.E., Tearney G.J., Bilinsky I.P. et al.* Source for optical coherence tomography // *Opt. Lett.* 1996. V. 21. P. 1839–1841.
1071. *Умысков А.Ф., Заварцев Ю.Д., Загуменный А.И. и др.* Лазер на кристалле YSGG: Cr³⁺, Yb³⁺, Ho³⁺ с плавно перестраиваемой длиной волны излучения в диапазоне 2,84–3,05 мкм // *Квант. электрон.* 1996. Т. 23, № 7. С. 579–580.
1072. *Демчук М.И., Жаворонков Н.И., Михайлов В.П., Минков Б.С.* Эффективная генерация форстерита с хромом при накачке в ближайшей ИК области спектра // *Квант. электрон.* 1994. Т. 21, № 1. С. 19–20.
1073. *Дураев В.П., Неделин Е.Т., Мельников А.В. и др.* Низкопороговые лазеры с длиной волны излучения 1,02 мкм на основе InGaP/InGaAsP // *Квант. электрон.* 1996. Т. 23, № 9. С. 785–786.
1074. *Ватоврин В.К., Гармаш И.А., Геликонов В.М. и др.* Суперлюминесцентные диоды на основе однослойных квантоворазмерных (GaAl)As-гетероструктур // *Квант. электрон.* 1996. Т. 23, № 2. С. 113–118.
1075. *Vasiliev P.P.* Ultrafast diode lasers: fundamentals and applications. N. Y., L.: Artech House Optoelectronics Library, 1995.
1076. *Коняев В.П., Курносков В.Д., Лукьянов В.Н. и др.* Спектральные характеристики одночастотных квантово-размерных гетеролазеров // *Квант. электрон.* 1994. Т. 21, № 12. С. 1137–1140.
1077. *Журавлева О.В., Киселева Н.Н., Курносков В.Д. и др.* Одночастотные GaAlAs/GaAs-лазеры // *Квант. электрон.* 1994. Т. 21, № 3. С. 205–208.
1078. *Адлванкин А.С., Безотосный В.В., Маркова Н.В. и др.* Излучательные характеристики двумерных матриц инжекционных лазеров на основе AlGaAs/GaAs на длине волны 0,81 мкм для систем накачки твердотельных активных элементов // *Квант. электрон.* 1996. Т. 23, № 11. С. 974–976.
1079. *Бурый Е.В., Косых А.Е.* Пространственно-временные характеристики излучения матрицы инжекционных лазеров в режиме генерации наносекундных импульсов // *Квант. электрон.* 1995. Т. 22, № 8. С. 785–787.
1080. *Кравцов Н.В., Наний О.Е.* Высокостабильные одночастотные твердотельные лазеры // *Квант. электрон.* 1993. Т. 20, № 4. С. 322–344.

1081. *Kartner F. X., Brovelli L. R., Kopf D. et al.* Control of solid state laser dynamics by semiconductor devices // *Opt. Eng.* 1995. V. 34, № 7. P. 2024–2036.
1082. *Смирнов В. Г.* Нетрадиционные принципы построения мощных лазеров с нелинейными преобразователями // *Квант. электрон.* 1993. Т. 20, № 5. С. 421–440.
1083. *Edwards G. S., Johnson B., Kozub J. et al.* Biomedical applications of free-electron lasers // *Opt. Eng.* 1993. V. 32, № 2. P. 314–319.
1084. *Баер А., Швоб Д. Л., Циглер А. и др.* Рентгеновский лазер с высоким коэффициентом усиления на Ni-подобных ионах с накачкой двумя лазерными импульсами // *Квант. электрон.* 1996. Т. 23, № 5. С. 393–398.
1085. *Handbook of Lasers* / Ed. by Weber M. J., Boca Raton, London, NY: CRC Press LLC, 2001
1086. *Грачев С. В., Джигладзе Т. А., Загородний Н. В. и др.* Гольмиевый лазер в медицине / Под ред. Грачева С. В. М.: «Триада», 2003.
1087. *Solid-State Mid-Infrared Laser Sources* / Ed. by Sorokina I. T., Vodopyanov K. L. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2003.
1088. *Handbook of Optical and Laser Scanning* / Ed. by Marshall G. F. NY, Basel: Marcel Dekker, Inc., 2004.
1089. *Ye C.* Tunable Semiconductor Diode Lasers. New Jersey, London, Singapor, et al.: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2004.
1090. *Handbook of Laser Technology and Applications, V. 1: Principles* / Ed. by Webb C. E. and Jones J. D. C. Bristol and Philadelphia: Inst. of Physics Publishing, 2004.
1091. *Handbook of Laser Technology and Applications, V. 2: Laser Design and Laser Systems* / Ed. by Webb C. E. and Jones J. D. C. Bristol and Philadelphia: Inst. of Physics Publishing, 2004.
1092. *Handbook of Laser Technology and Applications, V. 3: Applications* / Ed. by Webb C. E. and Jones J. D. C. Bristol and Philadelphia: Inst. of Physics Publishing, 2004.
1093. *Laser Safety Management* / Ed. by Barat K. Boca Raton, London, NY: CRC Press LLC, 2005.
1094. *Григорьянц А. Г., Казарян М. А., Лябин Н. А.* Лазеры на парах меди. М.: Физматлит, 2005.
1095. *Solid-State Laser Engineering* / Ed. by Koechner W. 6th edition, NY: Springer Science+Business Media, Inc. 2006.
1096. *Laser Physics and Applications: Subvolume B: Laser Systems, Part 1* / Ed. by Herziger G., Weber H., and Poprawe R. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2007.
1097. *Laser Physics and Applications: Subvolume B: Laser Systems, Part 2* / Ed. by Schulz W., Weber H., and Poprawe R. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2008.
1098. *Ultrashort Laser Pulses in Biology and Medicine* / Ed. by Braun M., Gilch P., and Zinth W. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2008.
1099. *Tunable Laser Applications* / Ed. by Duarte F. 2nd edition. Boca Raton, London, NY: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009.
1100. *Liu J.-M.* Photonic Devices. Cambridge, et al.: Cambridge University Press, 2005.
1101. *Гапонцев В. П., Минаев В. П., Савин В. И., Самарцев И. Э.* Медицинские аппараты на основе мощных полупроводниковых и волоконных лазеров // *Квантовая электроника* 2002. Т. 32, № 1. С. 1003–1008.
1102. *Минаев В. П.* Лазерные аппараты для хирургии и силовой терапии на основе мощных полупроводниковых и волоконных лазеров // *Квантовая электроника* 2005. Т. 35, № 11. С. 976–983.
1103. *Минаев В. П.* Лазерные аппараты для хирургии и «силовой терапии» на основе мощных полупроводниковых и волоконных лазеров // *Лазерная медицина* 2005. Т. 9, № 4. С. 50–59.
1104. *Femtosecond Laser Pulses: Principles and Experiments* / Ed. by Rullière C. NY: Springer, 2nd edition, 2005.
1105. *Femtosecond Technology for Technical and Medical Applications* / Ed. by Dausinger F., Lichtner F., and Lubatschowski H. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 2004.
1106. *Lubatschowski H.* Overview of commercially available femtosecond lasers in refractive surgery // *J. Refract. Surg.* 2008. V. 24. P. 102–107.

1107. Yao Y., Zheng Q., Qu D.P., Zhou K., Liu Y., and Zhao L. All-solid-state continuous-wave frequency-doubled Nd:YAG/LBO laser with 1,2 W output power at 561 nm // *Laser Phys. Lett.* 2010. V. 7, № 2. P. 112–115.
1108. Lü Y.F., Li C.L., Fu X.H., Lu J., Sun, and Zhao Z.M. All-solid-state continuous-wave frequency-doubling Nd:GdVO₄/LBO laser at 541,5 nm // *Laser Phys. Lett.* 2010. V. 7, № 9. P. 627–629.
1109. Giesen A., Speiser J. Fifteen years of work on thin-disk lasers: Results and scaling laws // *IEEE J. Sel. Tops Quant. Electr.* 2007. V. 13. P. 598–609.
1110. Ларионов М., Даузингер Ф., Зоммер Ш., Гизен А. Лазеры на тонких дисках: Принцип работы и применение. Часть 1 // *Фотоника* 2009. № 3. С. 1–7.
1111. Marchese S., Baer C., G. Engqvist A. et al. Femtosecond thin disk laser oscillator with pulse energy beyond the 10-microjoule level // *Opt. Express* 2008. V. 16. P. 6397–6407.
1112. Neuhaus J., Bauer D., Zhang J. et al. Subpicosecond thin-disk laser oscillator with pulse energies of up to 25,9 microjoules by use of an active multipass geometry // *Opt. Express* 2008. V. 16. P. 20530–20539.
1113. Shidlovski V.R. Superluminescent Diode Light Sources for OCT, Chapter 9 // *Optical Coherence Tomography: Technology and Applications* / Ed. by Drexler W., Fujimoto J.G. Berlin: Springer, 2008. P. 281–299.
1114. Eyal O., Zur A., Shenfeld O. et al. Infrared radiometry using silver halide fibers and cooled photonic detector // *Opt. Eng.* 1994. V. 33, № 2. P. 502–509.
1115. Дианов Е. М. Волоконная оптика // *Физическая энциклопедия* / Под ред. А. М. Прохорова. М.: Советская энциклопедия, 1988. Т. 1. С. 333–335.
1116. Солименко С., Крозиньяни Б., Ди Порто П. Дифракция и волноводное распространение оптического излучения. М.: Мир, 1989.
1117. Суэмацу Я., Катаока С., Кисино К. и др. Основы оптоэлектроники М.: Мир, 1988.
1118. Дианов Е. М., Прохоров А. М. Лазеры и волоконная оптика // *Успехи физ. наук.* 1986. Т. 148. С. 289–300.
1119. Грудинин А. Б., Дианов Е. М., Прохоров А. М., Серкин В. Н. Волоконная оптика: фундаментальные и прикладные аспекты, перспективы развития // *Изв. АН СССР. Сер. физическая.* 1987. Т. 51, № 8. С. 1419–1424.
1120. Проблемы волоконной оптики. Тр. ИОФАН. / Под ред. Е. М. Дианова. М.: Наука, 1988.
1121. Григорьянц В. В., Иванов Г. А., Чаморовский Ю. К. Одномодовые волоконные световоды // *Итоги науки и техн. Сер. Связь.* М.: ВИНТИ, 1988. С. 67–114.
1122. Марков П. И., Кеткович А. А., Саттаров Д. К. Волоконно-оптическая интроскопия. Л.: Машиностроение, 1987.
1123. Бутусов М. М., Галкин С. Л., Оробинский С. П., Пал Б. П. Волоконная оптика и приборостроение. Л.: Машиностроение, 1987.
1124. Гауэр Дж. Оптические системы связи. М.: Радио и связь, 1989.
1125. Волоконно-оптические линии связи: Справочник / Под ред. С. В. Свечникова и Л. М. Андрушко. Киев: Наукова думка, 1988.
1126. Носов Ю. Р. Оптоэлектроника. М.: Радио и связь, 1989.
1127. Снайдер А., Лав Дж. Теория оптических волноводов. М.: Радио и связь, 1987.
1128. Дианов Е. М., Плотниченко В. Г. Инфракрасные волоконные световоды. М.: Знание, 1991.
1129. Берикашвили В. Ш., Гнатюк Л. Н., Фирсов В. М. Волоконные световоды типа кварц–полимер // *Электрон. промыш.* 1989. № 3. С. 21–23.
1130. Котюк А. Ф., Курчатов Ю. А., Майборода Ю. П. и др. Введение в технику измерений оптико-физических параметров световодных систем. М.: Радио и связь, 1987.
1131. Затыкин А. А., Моршнев С. К., Францессон А. В. Взаимодействие излучения с поглощающей средой на участке световода с крутым изгибом // *Квант. электрон.* 1983. Т. 10, № 11. С. 2283–2288.
1132. Takeo T., Hattori H. Optical fiber sensor for measuring refractive index // *Jap. J. Appl. Phys.* 1982. V. 21, № 10. P. 1509–1512.

1133. *Артюшенко В. Г., Калайджан К. И., Миракян М. М.* Медицинская установка на основе CO₂-лазера с гибким скальпелем // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1990. Т. 54, № 10. С. 1881–1885.
1134. *Biosensors with fiberoptics / Eds L. B. J. Wingard, D. D. Wise.* Clifton; N. Y.: Human Press, 1991.
1135. *Fiber optic chemical sensors and biosensors / Ed. O. S. Wolfbeis.* Boca Raton: CRC Press, 1991. V. 1, 2.
1136. *Ватутин В. М., Вагин А. И.* Волоконно-оптические системы в технике физического эксперимента: Принципы работы и компоненты // ПТЭ. 1989. № 1. С. 7–36.
1137. *Адамс М.* Введение в теорию оптических волноводов. М.: Мир, 1984.
1138. *Macfadyen A. J., Jennings B. R.* Fiber-optic systems for dynamic light scattering — a review // Opt. Laser Technol. 1990. V. 22, № 3. P. 175–187.
1139. *Артюшенко В. Г., Блинов Л. М., Володько В. В. и др.* Кварцевые волоконные световоды для передачи мощного лазерного излучения // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1990. Т. 54, № 8. С. 1570–1573.
1140. *Артюшенко В. Г., Данев Г., Жукова Л. В. и др.* Лазерные кабели на основе кристаллических ИК световодов // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1990. Т. 54, № 8. С. 1574–1580.
1141. *Артюшенко В. Г., Дианов Е. М., Калайджан К. И. и др.* Световоды с линзами на торцах для медицинских применений. М., 1988. № 35 (Препринт ИОФАН СССР).
1142. *Shenfeld O., Belotserkovsky E., Goldwasser B. et al.* Silver halide fiber optic radiometry for temperature monitoring and control of tissues heated by microwave // Opt. Eng. 1993. V. 32, № 2. P. 216–221.
1143. *Inshiwatari H., Ikedo M., Tateishi F.* An optical cable for CO₂ laser scalpel // J. Lightwave Technol. 1986. V. 4, № 8. P. 1273–1279.
1144. *Антипенко Б. М., Березин Ю. Д., Дубровин А. Н. и др.* Волоконные световоды для эндоскопических ИК лазерных хирургических установок // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1990. Т. 54, № 10. С. 1886–1887.
1145. *Артюшенко В. Г., Бубнов М. М., Варпанетов С. К. и др.* Прохождение интенсивного излучения эксимерных лазеров через кварцевый световод // Квант. электрон. 1988. Т. 15, № 5. P. 1067–1074.
1146. *Biswas D. R.* Optical fiber coatings for biomedical applications // Opt. Eng. 1992. V. 31, № 7. P. 1400–1403.
1147. *Томашук А. Л.* Сравнение двух методов прогнозирования параметра широкополосности многомодовых градиентных волоконных световодов // Квант. электрон. 1993. Т. 20, № 1. С. 76–78.
1148. *Дьяконов Г. И., Михайлов В. А., Пак С. К. и др.* ИСГГ:Сг:Ег-лазер со световодной доставкой излучения для целей интракорпоральной литотрипсии // Квант. электрон. 1993. Т. 20, № 2. С. 194–197.
1149. *Батище С. А., Тарковский В. В.* Спектральные особенности разрушения почечных камней лазерным излучением микросекундной длительности // Квант. электрон. 1995. Т. 22, № 7. С. 751–752.
1150. *Касымджанов М. А., Курбанов С. С., Серебрянская Л. М., Тартаковский Г. Х.* «Опережающая» люминесценция многомодового оптического световода, возбуждаемого импульсным УФ излучением // Опт. спектр. 1989. Т. 67, № 3. С. 721–723.
1151. *Дианов Е. М., Конов В. И., Пашинин В. П. и др.* Прохождение импульсно-периодического излучения ХеСl-лазера через кварцевый световод // Письма в ЖТФ. 1988. Т. 14, № 16. С. 1444–1448.
1152. *Fujii H., Asakura T., Jutamula S. et al.* Light scattering properties of a rough-ended optical fibre // Opt. Laser Technol. 1984. V. 16, № 1. P. 40–44.
1153. *Arnfield M., Gonzalez S., Lea P. et al.* Cylindrical irradiator fiber tip for photodynamic therapy // Lasers Surg. Med. 1986. V. 6, № 2. P. 150–154.
1154. *Bolin F. P., Preuss L. E., Taylor R. C.* Optimization of photodynamic therapy light dose distribution and treatment volume by multi-fiber insertions // Photochem. Photobiol. 1987. V. 46, № 5. P. 609–617.

1155. *Ложенко А. С., Жаров В. П.* Световодные инструменты с различными индикатрисами для внутритриполостной лазерной терапии // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1990. Т. 54, № 10. С. 1964–1970.
1156. *Артемов В. В., Курочкин А. В., Мирски Э. и др.* Вторичное излучение многомодового градиентного волоконного световода при накачке излучением с $\lambda = 532$ нм и 1064 нм // Опт. спектр. 1989. Т. 67, № 3. С. 724–729.
1157. *Грудинин А. Б., Дианов Е. М., Коробкин Д. В. и др.* ВКР-генерация и динамика распространения фемтосекундных солитонов в волоконных световодах // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1989. Т. 53, № 8. С. 1552–1561.
1158. *Margulis W., Osterberg U.* Four-photon fiber laser // Opt. Lett. 1987. V. 12, № 7. P. 519–521.
1159. *Сычугов В. А., Тихомиров А. Е., Кузнецов А. В., Самарцев И. Е.* Узкополосный лазер на основе волокна, легированного Nd^{3+} // Квант. электрон. 1994. Т. 21, № 1. С. 21–22.
1160. *Лындин Н. М., Сычугов В. А., Тихомиров А. Е., Абрамов А. А.* Лазерная система из нескольких активных элементов, объединенных одномодовыми разветвителями // Квант. электрон. 1994. Т. 21, № 12. С. 1141–1144.
1161. *Optical fiber sensors technical digest.* New Orleans; La; Washington, 1988. V. 2.
1162. *Peterson J. I., Vurek G. G.* Fiber-optic sensors for biomedical application // Science. 1984. V. 224, № 4645. P. 123–127.
1163. *Obeid A. N., Dougherty G., Pettinger S.* In vivo comparison of a twin wavelength laser Doppler flow-meter using He–Ne and laser diode sources // J. Med. Eng. Technol. 1990. V. 14, № 3. P. 102–110.
1164. *Zang D. Y., Wilder-Smith P., Millerd J. E., Arrastia A. M. A.* Novel approach to laser Doppler measurement of pulpal blood flow // J. Biomed. Opt. 1997. V. 2. С. 304–309.
1165. *Красюк Б. А., Семенов О. Г., Шереметьев А. Г., Шестериков В. А.* Световодные датчики М.: Машиностроение, 1990.
1166. *Henning M., Gerdt D., Spraggins T.* Using a fiber-optic pulse sensor in magnetic resonance imaging // Optical fibers in medicine VI: imaging, diagnostics, and therapy devices / Ed. A. Katzir. Bellingham: SPIE, 1991. V. 1420.
1167. *Tuchin V. V., Ampilogov A. V., Bogoroditsky A. A. et al.* Laser speckle and optical fiber sensors for micromovements monitoring in biotissues // Optical fibers in medicine VI: imaging, diagnostics, and therapy devices / Ed. A. Katzir. Bellingham, SPIE, 1991. V. 1420.
1168. *Wyatt P. J., Schehrer K. L., Phillips S. D. et al.* Aerosol particle analyzer // Appl. Opt. 1988. V. 27, № 2. P. 217–221.
1169. *Kitagawa Y., Hayashi A., Minami S.* Fiber-optic particle size monitor // Appl. Opt. 1988. V. 27, № 15. P. 3068–3073.
1170. *Meyer M. S., Eesley G. L.* Optical fiber refractometer // Rev. Sci. Instrum. 1987. V. 58, № 11. P. 2047–2048.
1171. *Гурьянов А. И., Гусовский Д. Д., Девярых Г. Г. и др.* Многоканальные анизотропные одномодовые волоконные световоды для волоконно-оптических датчиков // Квант. электрон. 1987. Т. 14, № 3. С. 609–610.
1172. *Conde R., Coquoz O., Depeursinge C. et al.* Measurements of the point spread function for multicore fibers used as image guides in microendoscopy // Opt. Eng. 1995. V. 34, № 7. P. 2092–2102.
1173. *Rol P., Jenny R., Beck D. et al.* Optical properties of miniaturized endoscopes for ophthalmic use // Opt. Eng. 1995. V. 34, № 7. P. 2070–2077.
1174. *Stenov E. N. D., Oberg P. A.* Design and evaluation of a fibre-optic sensor for limb blood flow measurements // Physiol. Meas. 1994. V. 15, № 3. P. 261–270.
1175. *Tjin S. C., Ng S. L., Soo K. T.* New side-projected fiber optic probe for in vivo flow measurements // Opt. Eng. 1996. V. 35, № 11. P. 3123–3129.
1176. *Tjin S. C., Kilpatrick D., Johnston P. R.* Evaluation of the two-fiber laser Doppler anemometer for in vivo blood flow measurements: experimental and flow simulation results // Opt. Eng. 1995. V. 34, № 2. P. 460–469.

1177. Dahnoun N., Mottram S.D., Fothergill J., Smith G. An optical technique for measurement of thoracic wall movement during high-frequency jet ventilation // *Physiol. Meas.* 1994. V. 15, №3. P. 271–279.
1178. Gao H.H., Chen Z., Kumar J. et al. Tapered fiber tips for fiber optical biosensors // *Opt. Eng.* 1995. V. 34, № 12. P. 3465–3470.
1179. Golden J.P., Saaski E.W., Shriver-Lake L.C. et al. Portable multichannel fiber optic biosensor for field detection // *Opt. Eng.* 1997. V. 36, № 4. P. 1008–1013.
1180. Kopola H.K., Lahti A., Myllyla R.A., Hannuksela M. Two-channel fiber optic skin erythemometer // *Opt. Eng.* 1993. V. 32, № 2. P. 222–226.
1181. Tromberg B.J., Eastham J.F., Sepaniak M.J. Optical fiber fluoroprobe for biological measurements // *Appl. Spectr.* 1984. V. 38, № 1. P. 38–42.
1182. Окоси Т., Окамото К., Оцу М. и др. Волоконно-оптические датчики / Под ред. Т. Окоси. Л.: Энергоатомиздат, 1990.
1183. Балаев В.И., Мишин Е.В., Пятахин В.И. Волоконно-оптические датчики параметров физических полей // *Квант. электрон.* 1984. Т. 11, № 1. С. 10–30.
1184. Cook R.O., Hamm C.W., Konishi T. Measures of basilar membrane motion obtained from intact cochleas of guinea pig via fiber optic lever // *J. Acoust. Soc. Am.* 1983. V. 73, № 1. P. S. 80(A).
1185. Blum L.J., Gautier S.M., Coulet P.R. Luminescence fiber-optic biosensor // *Analyt. Lett.* 1988. V. 21, № 5. P. 717–726.
1186. Heideman R.G., Kooyman R.P.H., Greve J.A. Polarimetric optical-fiber sensor for biochemical measurements // *Sensors and Actuators B.* 1993. V. 12. P. 205–212.
1187. Wang J. Cylindrical waveguide evanescent field ellipsometry // *Opt. Eng.* 1992. V. 31, № 7. P. 1432–435.
1188. Melnik I.S., Hibst R., Fisher M., Flemming G. New modified optical fiber tips for medical applications // *Opt. Eng.* 1993. V. 32, № 2. P. 227–232.
1189. Starodub N.F., Arenkov P.Y., Starodub A.N., Berezin V.A. Construction and biomedical application of immunosensors based on fiber optics and enhanced chemiluminescence // *Opt. Eng.* 1994. V. 33, № 9. P. 2958–2963.
1190. Blanc D., Colles M.J. Transmission measurements of various tissue sample between 1064 and 2000 nm // *Lasers Med. Sci.* 1990. V. 5, № 1. P. 71–75.
1191. Поляков А.Ю., Бочарников В.И., Дятлов Д.В. и др. Комплекс спектрального мониторинга кровоснабжения и метаболизма тканей *in vivo* // *Диагностические применения лазеров и волоконной оптики* / Под ред. В.В. Тучина. Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та, 1989. Ч. 2.
1192. Melnik I., Steiner R. In vivo measurements of laser irradiation in human tissue by small isotropic detector // *Lasermedizin.* 1992. V. 8. P. 73–77.
1193. Gottlieb A. The optical measurement of blood gases — approaches, problems, and trends // *Proc. SPIE. Bellingham, SPIE, 1992. V. 1648. P. 4–11.*
1194. Bechi P., Falciai R., Baldini F. et al. A new fiber optic sensor for ambulatory entero-gastric reflex detection // *Proc. SPIE. Bellingham, SPIE, 1992. V. 1648. P. 130–135.*
1195. Dieckman M., Dierks K. Diagnostics methods and tissue parameter investigations together with measurement results (in vivo) // *Proc. SPIE. Bellingham, SPIE, 1995. V. 2126. P. 331–345.*
1196. Holavanahali R., Carter G.M. et al. Directly modulated diode laser frequency doubled in a KTP waveguide as an excitation source for CO₂ and O₂ phase fluorometric sensors // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 1. P. 124–130.
1197. Курков А.С., Дианов Е.М. Непрерывные волоконные лазеры средней мощности // *Квант. электроника*, 2004, Т. 34, № 10. С. 881–900.
1198. Желтиков А.М. Дырчатые волноводы // *Успехи физ. наук* 2000. Т. 170, № 11. С. 1203–1215.
1199. Желтиков А.М. Сверхкороткие световые импульсы в полых волноводах // *Успехи физ. наук* 2002. Т. 172, № 7. С. 745–776.
1200. Желтиков А.М. Нелинейная оптика микроструктурированных волокон // *Успехи физ. наук* 2004. Т. 174, № 1. С. 73–105.

1201. Желтиков А.М. Да будет белый свет: генерация суперконтинуума сверхкороткими лазерными импульсами // Успехи физ. наук 2006. Т. 176, № 6. С. 623–649.
1202. Желтиков А.М. Микроструктурированные световоды для нового поколения волоконно-оптических источников и преобразователей световых импульсов // Успехи физ. наук 2007. Т. 177, № 7. С. 737–762.
1203. Konorov S.O., Sidorov-Biryukov D.A., Bugar I., Bloemer M.J., Beloglazov V.I., Skibina N.B., Chorvat Jr. D., Chorvat D., Scalora M., and Zheltikov A.M. Experimental demonstration of a photonic-crystal-fiber optical diode // Appl. Phys. B 2004. V. 78, № 5. P. 547–550.
1204. Konorov S.O., Fedotov A.B., Beloglazov V.I., Skibina N.B., Scalora M., Vaselli M., and Zheltikov A.M. Transmission of ultrashort pulses through hollow photonic-crystal fibers with passbands in the visible and infrared spectral ranges // Laser Physics 2004. V. 14, № 5. P. 780–784.
1205. Konorov S.O., Mitrokhin V.P., Fedotov A.B., Sidorov-Biryukov D.A., Beloglazov V.I., Skibina N.B., Shcherbakov A.V., Wintner E., Scalora M., and Zheltikov A.M. Laser ablation of dental tissues with picosecond pulses of 1,06- μm radiation transmitted through a hollow-core photonic-crystal fiber // Applied Optics 2004. V. 43, № 11. P. 2251–2256.
1206. Glas P., Fischer D., Steinmeyer G., Husakou A., Herrmann J., Iliew R., Skibina N.B., Beloglazov V.I., and Skibina Y.S. Supercontinuum generation in a two-dimensional photonic kagome crystal // Special Issue on Photonic Crystals, Appl. Phys. B 2005. V. 81. P. 209–217.
1207. Special Issue on Nanostructure Glass Technology for X-ray Optics and Biophotonics // J. X-Ray Sci. Technol. 2005. V. 13, № 4 / Ed. by Tuchin V.V. and Langhoff N.
1208. Skibina J., Beloglazov V.I., Chainikov M.V., and Tuchin V.V. Spectral properties of a soft glass photonic crystal fiber // J. X-Ray Sci. Technol. 2005. V. 13, № 4. P. 171–177.
1209. Скибина Ю.С., Белоглазов В.И., Тучин В.В., Чайников М.В. Пропускание стеклянных микроструктурных световодов с полой сердцевинной при наличии фотонных запрещенных зон // Письма в ЖТФ 2005. Т. 31, № 23. С. 55–60.
1210. Fedotov A.B., Sidorov-Biryukov D.A., Ivanov A.A., Alfimov M.V., Beloglazov V.I., Skibina N.B., Sun C.-K., and Zheltikov A.M. Soft-glass photonic-crystal fibers for frequency shifting and white-light spectral superbroadening of femtosecond Cr:forsterite laser pulses // J. Opt. Soc. Am. B 2006. V. 23, № 7. P. 1471–1477.
1211. Serebryannikov E.E., Fedotov A.B., Zheltikov A.M., Ivanov A.A., Alfimov M.V., Beloglazov V.I., Skibina N.B., Skryabin D.V., Yulin A.V., and Knight J.C. Third-harmonic generation by Raman-shifted solitons in a photonic-crystal fiber // J. Opt. Soc. Am. B 2006. V. 23, № 9. P. 1975–1980.
1212. Skibina J.S., Iliew R., Bethge J., Bock M., Ficher D., Beloglazov V.I., Wedell R., Scheinmeyer G. A chirped photonic crystal fiber // Nature Photonics. 2008. V. 2. P. 679–683.
1213. Тучин В.В., Скибина Ю.С., Белоглазов В.И., Чайников М.В., Скибина Н.Б., Михайлова Н.А., Жестков П.М., Силохин И.Ю. Сенсорные свойства фотонно-кристаллического волновода с полой сердцевинной // Письма в ЖТФ 2008. Т. 34, № 15. С. 63–69.
1214. Skibina J. Micro- and nano-capillary glass technology for optical biosensing // SPIE Newsroom 2009. DOI: 10.1117/2.1200904.1631.
1215. Малинин А.В., Скибина Ю.С., Михайлова Н.А., Силохин И.Ю., Чайников М.В. Биологический сенсор на базе фотонно-кристаллического световода с полой сердцевинной // Письма в ЖТФ 2010. Т. 36, № 8. С. 33–38.
1216. Buczynski R., Bookey H. T., Pysz D., Stepien R., Kujawa I., McCarthy J. E., Waddie A. J., Kar A. K., and Taghizadeh M. R. Supercontinuum generation up to 2,5 μm in photonic crystal fiber made of lead-bismuth-galate glass // Laser Phys. Lett. 2010. V. 7, № 9. P. 666–672.
1217. Nightingale J.R. Optical biosensors: sparrow biosensor and photonic crystal-based fluorescence enhancement // MS Thesis, West Virginia University, Morgantown, West Virginia, 2008.

1218. *Jensen J.B., Pedersen L.H., Hoiby P.E., Nielsen L.B., Hansen T.P., Folkenberg J.R., Riishede J., Noordegraaf D., Nielsen K., Carlsen A., and Bjarklev A.* Photonic crystal fiber based evanescent-wave sensor for detection of biomolecules in aqueous solutions // *Optics Letters* 2004. V. 29, № 17. P. 1974–1976.
1219. *Schwartz M.P., Derfus A.M., Alvarez S.D., Bhatia S.N., and Sailor M.J.* The smart Petri dish: A nanostructured photonic crystal for real-time monitoring of living cells // *Langmuir* 2006. V. 22. P. 7084–7090.
1220. *Martelli C., Canning J., Kristensen M., and Groothoff N.* Refractive index measurement within a photonic crystal fibre based on short wavelength diffraction // *Sensors* 2007. V. 7. P. 2492–2498.
1221. *Villatoro J., Finazzi V., Badenes G., and Pruneri V.* Highly sensitive sensors based on photonic crystal fiber modal interferometers (review article) // *J. Sensors* 2009. V. 2009, Article ID 747803, 11 pages; DOI:10.1155/2009/747803.
1222. *Cubillas A.M., Lazaro J.M., Conde O.M., Petrovich M.N., and Lopez-Higuera J.M.* Gas sensor based on photonic crystal fibres in the $2\nu_3$ and $\nu_2 + 2\nu_3$ vibrational bands of methane // *Sensors* 2009. V. 9. P. 6261–6272.
1223. Сверхчувствительная лазерная спектроскопия / Под ред. Д. Клайджера. М.: Мир, 1986.
1224. *Бульчев А.А., Верхотуров В.Н., Гуляев Б.А. и др.* Современные методы биофизических исследований. Практикум по биофизике: Учеб. пособие. М.: Высш. шк., 1988.
1225. *Буткевич В.И., Привалов В.Е.* Применение лазеров в прецизионных аналитических измерениях // *ЖПС*. 1988. Т. 48, № 1. P. 7–26.
1226. *Буткевич В.И., Демкин В.Н.* Лазерный спектрометр для абсолютных измерений концентрации газов // *ЖПС*. 1989. Т. 51, № 1. P. 155–161.
1227. *Верхотуров В.Н., Рубин А.Б.* Автоматизация биофизических исследований. М.: Высш. шк., 1988.
1228. *Лукъяненко С.Ф., Макогон М.М., Саница Л.Н.* Внутривибраторная лазерная спектроскопия. Основы метода и применения. Новосибирск: Наука СО, 1985.
1229. *Гордиенко В.М., Дмитриев А.К., Коновалов А.Н. и др.* Автодинный эффект в условиях лазерно-индуцированных динамических потоков и его применение для идентификации типа биоткани в процессе деструкции // *Квант. электрон.* 1996. Т. 23, № 10. С. 869–870.
1230. *Siddique M., Wang Q.Z., Alfano R.R.* Laser action in condensed disordered media of active dye-stained animal tissues and sandy colloidal scattering walls // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 4. P. 442–447.
1231. *Lamba O.P., Borchman D., Sinha S.K., et al.* Estimation of the secondary structure and conformation of bovine lens crystallins by infrared spectroscopy: quantitative analysis and resolution by Fourier self-deconvolution and curve fit // *Biochimica et Biophysica Acta*. 1993. V. 1163. P. 113–123.
1232. *Schmitt J.M., Kumar G.* Spectral distortions in near-infrared spectroscopy of turbid materials // *Appl. Spectr.* 1996. V. 50, № 8. P. 1066–1073.
1233. *Кузнецов А.И., Логачев А.П., Степанов Е.В.* Анализ выдыхаемого человеком воздуха методами диодной лазерной спектроскопии // *Изв. АН СССР. Сер. физическая*. 1990. Т. 54. С. 1909–1914.
1234. *Ivanov S.V., Novoderezhkin V.I., Panchenko V.Ya. et al.* Laser infrared spectrometer for atmosphere gas analysis and medicine // *Opt. Eng.* 1994. V. 33, № 10. P. 3202–3205.
1235. *Хайруллина А.Я.* Определение процентного содержания кислорода в цельной крови // *Вестн. АН БССР. Сер. физ.-мат. наук*. 1994. № 6. С. 72–76.
1236. *Дубова Г.С., Мишуrow Э.А., Хайруллина А.Я.* Спектры миллимолярных показателей поглощения метабемоглобинов цельной крови в диапазоне длин волн 660–1000 нм // *ЖПС*. 1986. Т. 44, № 3. С. 446–449.
1237. *Пустовалов В.К., Хорунжий И.А.* Об учете изменений коэффициента отражения излучения от слоистых биотканей в процессе лазерной коагуляции // *Квант. электрон.* 1987. Т. 14, № 8. С. 1718–1720.
1238. *Barrett S.F., Wright C.H.G., Jerath M.R. et al.* Computer-aided retinal photocoagulation system // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 1. P. 83–91.

1239. Александров М. Т. Лазерная клиническая биофотометрия (теория, эксперимент, практика). М.: Техносфера, 2008.
1240. *Matcher S.J., Cope M., Delpy D.T.* Use of water absorption spectrum to quantify tissue chromophore concentration changes in near-infrared spectroscopy // *Phys. Med. Biol.* 1994. V. 39. P. 177–196.
1241. *Matcher S.J., Cooper C.E.* Absolute quantification of deoxyhaemoglobin concentration in tissue near infrared spectroscopy // *Phys. Med. Biol.* 1994. V. 39. P. 1295–1312.
1242. *Robinson M.R., Eaton R.P., Haaland D.M. et al.* Noninvasive glucose monitoring in diabetic patients: a preliminary evaluation // *Clin. Chem.* 1992. V. 38, № 9. P. 1618–1622.
1243. *Marbach R., Koshinsky T.H., Gries F.A., Heise H.M.* Noninvasive blood glucose assay by near-infrared diffuse reflectance spectroscopy of the human inner lip // *Appl. Spectr.* 1993. V. 47. P. 875–881.
1244. *Kumar G., Schmitt J.M.* Optimal probe geometry for near-infrared spectroscopy of biological tissue // *Appl. Opt.* 1997. V. 36, № 10. P. 2286–2293.
1245. *Kumar G., Schmitt J.M.* Optimum wavelength for measurement of blood hemoglobin content and tissue hydration by NIR spectrophotometry // *Proc. SPIE.* Bellingham, SPIE, 1995. V. 2678. P. 442–453.
1246. *Arnold M.A., Small G.W.* Determination of physiological levels of glucose in an aqueous matrix with digitally filtered Fourier transform near-infrared spectra // *Anal. Chem.* 1990. V. 62. P. 1457–1464.
1247. *Chung H., Arnold M.A., Rhiel M., Murhammer D.W.* Simultaneous measurements of glucose, glutamine, ammonia, lactate, and glutamate in aqueous solutions by near-infrared spectroscopy // *Appl. Spectr.* 1996. V. 50, № 2. P. 270–276.
1248. *Kohl M., Esseupreis M., Cope M.* The influence of glucose concentration upon the transport of light in tissue-simulating phantoms // *Phys. Med. Biol.* 1995. V. 40. P. 1267–1287.
1249. *Jagemann K.U., Fischbacher C., Müller U.A., Mertes B.* Application of near-infrared spectroscopy for noninvasive determination of blood tissue glucose using neural networks // *Z. Phys. Chem; Int. J. Res. Phys. Chem. & Chem. Phys.* 1995. V. 191. Pt 2. P. 179–190.
1250. *Ozaki Y., Mizuno A., Kaneuchi F.* Nondestructive structural analysis of biological molecules included in various eye tissues by ATR/FT-IR Spectroscopy // *Spectroscopy of biological molecules — state of the art. Proc. Third European conference spectroscopy of biological molecules* / Eds A. Bertoluzza, C. Fagnano, P. Monti. Bologna: Esculapia, 1989. P. 409–412.
1251. *Guillaumie C., Angiboust J.-F., Manfait M.* Micro FT-IR investigations on a single living cell and biological samples // *Spectroscopy of biological molecules — state of the art. Proc. Third European conference spectroscopy of biological molecules* / Eds A. Bertoluzza, C. Fagnano, P. Monti. Bologna: Esculapia, 1989. P. 349–352.
1252. *Becker A., Taran Ch., Uhmman W., Siebert F.* Time-resolved FTIR spectroscopy using a step-Scan interferometer // *Spectroscopy of biological molecules — state of the art. Proc. Third European conference spectroscopy of biological molecules* / Eds A. Bertoluzza, C. Fagnano, P. Monti. Bologna, Esculapia, 1989. P. 299–302.
1253. Светосильные спектральные приборы / Под ред. К. И. Тарасова. М.: Наука, 1988.
1254. *Hopkinson J.H., Mousto C., Reynolds N., Newbery J.E.* Applications of attenuated total reflection in the infrared analysis of carbohydrates and biological whole cell samples in aqueous solution // *Analyst.* 1987. V. 112. P. 501–505.
1255. *Frank C.J., Redd D.C.B., Gansler T.S., McCreery R.L.* Characterization of human breast biopsy specimens with Near-IR Raman spectroscopy // *Anal. Chem.* 1994. V. 66, № 3. P. 319–326.
1256. *Malik Z., Dishi M., Garini Y.* Fourier transform multipixel spectroscopy and spectral imaging of protoporphyrin in single melanoma cells // *Photochem. Photobiol.* 1996. V. 63, № 5. P. 608–614.
1257. Лазеры и фотосинтез / Под ред. М. Г. Гольдфельда // *Итоги науки и техн. М.: ВИНТИ, 1986. Т. 19. Биофизика.*

1258. Чекалин С.В., Матвеев Ю.А., Ярцев А.П. Фемтосекундная абсорбционная спектроскопия первичных процессов в бактериальных реакционных центрах фотосинтеза // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1989. Т. 53, № 8. С. 1462–1466.
1259. Джагиров Б.М., Гульбинас В., Кабелка В., Савицкене Ж. Пикосекундная спектроскопия гемоглобина // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1989. Т. 53, № 8. С. 1504–1509.
1260. Rotomskis R., Streckyte G., Didziapetriene J. Steady state and time-resolved absorption spectroscopy of porphyrins aggregates: relation to photosensitized tumor therapy // Proc. SPIE, Bellingham, SPIE, 1995. V. 2370. P. 73–84.
1261. Chance M.R., Courtney S.H., Chavez M.D. et al. O₂ and CO₂ reactions with heme proteins: quantum yields and geminate recombination on picosecond time scales // Biochemistry. 1990. V. 29. P. 5537–5545.
1262. Dzhangarov B.M., Gulbinas V., Kruk N.N. et al. Laser picosecond and nanosecond flash-photolysis of hemoglobin: excited state spectra and lifetimes, oxygen photodissociation and recombination, the pH-effects // Lithuanian J. Phys. 1994. V. 34. P. 99–103.
1263. Novoderezhkin V.I., Razjivin A.P. Excitonic interactions in the light-harvesting antenna of photosynthetic purple bacteria and their influence on picosecond absorbance difference spectra // FEBS Lett. 1993. V. 330. P. 5–7.
1264. Хаст Ю., Мюллюля Р., Сорвойа Х., Миеттинен Я. Использование автодинного эффекта в диодном лазере для измерения формы артериальной пульсовой волны // Квантовая электроника 2002. Т. 32, № 11. С. 975–980.
1265. Gonchukov S.A., Lazarev Y.B. Laser refractometry in medicine and biology // Laser Physics 2003. V. 13, № 5. P. 749–755.
1266. Gonchukov S., Vakurov M., and Yermachenko V. Precise laser refractometry of liquids // Laser Phys. Lett. 2006. V. 3, № 6. P. 314–318.
1267. Степанов Е.В. Лазерный анализ изотопического отношения углерода ¹³C/¹²C в CO₂ выдыхаемого воздуха // Квантовая электроника 2002. Т. 32, № 11. С. 981–986.
1268. Степанов Е.В., Миляев В.А. Применение перестраиваемых диодных лазеров для высокочувствительного анализа газообразных биомаркеров в выдыхаемом воздухе // Квантовая электроника 2002. Т. 32, № 11. С. 987–992.
1269. Лощенов В.Б. Разработка методов и аппаратуры для спектрально-флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии / Дис. соиск. уч. степ. док. физ.-мат. наук. М. Центр естественно-научных исследований Института общей физики им. А.М. Прохорова РАН, 2006.
1270. Стратонников А.А., Ермишова Н.В., Лощенов В.Б. Диагностика реакции капиллярного русла тканей на лазерное излучение // Квантовая электроника 2002. Т. 32, № 10. С. 917–922.
1271. Стратонников А.А., Меерович Г.А., Рябова А.В., Савельева Т.А., Лощенов В.Б. Использование спектроскопии обратного диффузного отражения света для мониторинга состояния тканей при фотодинамической терапии // Квантовая электроника 2006. Т. 36, № 12. С. 1103–1110.
1272. Меерович Г.А., Шевчик С.А., Лощенов М.В., Будзинская М.В., Ермакова Н.А., Харнас С.С. Лазерно-спектроскопический комплекс для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии заболеваний сетчатой и сосудистой оболочек глаза // Квантовая электроника 2002. Т. 32, № 11. С. 959–962.
1273. Jiang J., Voese M., Turner P., and Wang R.K. Penetration kinetics of dimethyl sulphoxide and glycerol in dynamic optical clearing of porcine skin tissue *in vitro* studied by Fourier transform infrared spectroscopic imaging // J. Biomed. Opt. 2008. V. 13, № 2. P. 021105-1–7.
1274. Photoacoustic and photothermal science and engineering / Eds A. Mandelis, K. H. Michaelian // Opt. Eng. 1997. V. 36, № 2. P. 301–534.
1275. Гусев В.Э., Карабутов А.А. Лазерная оптоакустика. М.: Наука, 1991.
1276. Мерфи П., Уетсел Г. Фототермальные методы оптической проверки материалов // Экспресс-информация: Испыт. приб. и стенды. 1987. № 24. С. 18–24.
1277. Braslauskys S.E., Heihoff K. Photothermal methods. Handbook of organic photochemistry / Ed. J. C. Scaiano. Boca Raton: CRC Press, 1989.

1278. Nagai S., Izuchi M. Quantitative photoacoustic imaging of biological tissues // Jap. J. Appl. Phys. 1988. V. 27, № 3. P. L423–L425.
1279. Жаров В. П., Зубов Б. В., Лоцинов В. И. и др. Исследование оптических и теплофизических свойств биоткани методом импульсной фототермической радиометрии. М.: 1987. № 146. (Препринт ИОФ АН СССР).
1280. Long F. H., Anderson R. R., Deutsch T. F. Pulsed photothermal radiometry for depth profiling of layered media // Appl. Phys. Lett. 1987. V. 51. P. 2076–2078.
1281. Long F. H., Deutsch T. F. Pulsed Photothermal Radiometry of Human Artery // IEEE J. Quantum Electr. 1987. V. 23, № 10. P. 1821–1830.
1282. Long F. H., Nishioka N. S., Deutsch T. F. Measurement of the optical and thermal properties of biliary calculi using pulsed photothermal radiometry // Lasers Surg. Med. 1987. V. 7. P. 461–466.
1283. Anderson R. R., Beck H., Bruggemann U. et al. Pulsed photothermal radiometry in turbid media: internal reflection of backscattered radiation strongly influences optical dosimetry // Appl. Opt. 1989. V. 28. P. 2256–2262.
1284. Prahl S. A., Vitkin I. A., Bruggemann U. et al. Determination of optical properties of turbid media using pulsed photothermal radiometry // Phys. Med. Biol. 1992. V. 37. P. 1203–1217.
1285. Vitkin I. A., Wilson B. C., Anderson R. R. Analysis of layered scattering materials by pulsed photothermal radiometry: application to photon propagation in tissue // Appl. Opt. 1995. V. 34. P. 2973–2982.
1286. Jacques S. L., Nelson J. S., Wright W. H., Milner T. E. Pulsed photothermal radiometry of port-wine-stain lesions // Appl. Opt. 1993. V. 32. P. 2439–2446.
1287. Milner T. E., Goodman D. M., Tanenbaum B. S. et al. Noncontact determination of thermal diffusivity in biomaterials using infrared imaging radiometry // J. Biomed. Opt. 1996. V. 1. P. 92–97.
1288. Milner T. E., Goodman D. M., Tanenbaum B. S., Nelson J. S. Depth profiling of laser-heated chromophores in biological tissues by pulsed photothermal radiometry // J. Opt. Soc. Am. A. 1995. V. 12. P. 1479–1488.
1289. Chen L., Zhang S. Y. Photothermal Detection for Light-Scattering Material by Laser Interferometry // Appl. Phys. Lett. 1987. V. 50, № 19. P. 1340–1342.
1290. Teng P., Nishioka N. S., Anderson R. R., Deutsch T. F. Acoustic Studies of the Role of Immersion in Plasma-Mediated Laser Ablation // IEEE J. Quantum Electr. 1987. V. 23, № 10. P. 1845–1852.
1291. Srinivasan R., Dyer P. E., Braren B. Far-Ultraviolet Laser Ablation of the Cornea: Photoacoustic Studies // Lasers Surg. Med. 1987. V. 6, № 4. P. 514–519.
1292. Жаров В. П., Амер Н. М. Лазерная калориметрическая спектроскопия в потоках // Изв. АН СССР. Сер. физическая. 1986. Т. 50, № 4. С. 820–827.
1293. Жаров В. П., Гаврилов В. В., Литвин Е. Ф., Монтанари С. Г. Лазерный оптико-акустический детектор для газового хроматографа // ЖПС. 1985. Т. 42, № 3. С. 506–512.
1294. Гандурин А. Л., Герасимов С. Б., Желтухин А. А. и др. Оптико-акустический газоанализатор примесей NO, NO₂, NH₃, C₃H₄ и предельных углеводородов // ЖПС. 1986. Т. 45, № 12. С. 337–343.
1295. Voightman E., Jurgensen A., Winefordner J. Condensed Phase Photoacoustic Spectroscopic Detection of Porphyrins and Dyes // Anal. Chem. 1981. V. 53, № 9. P. 1442–1446.
1296. Уайли, Лей. Разработка фотоакустического метода для исследования седиментации гуминовых кислот // ПНИ. 1986. № 6. С. 127–134.
1297. Язгаси М., Итого Ф., Сучитани Е. Метод фотоакустического определения глюкозы // Jap. Analyst. 1985. V. 34, № 12. P. 771–776.
1298. Quan K. M., Christison G. B., Mackenzie H. A., Hodgson P. Glucose determination by a pulsed photoacoustic technique: an experimental study using a gelatin-based tissue phantom // Phys. Med. Biol. 1993. V. 38. P. 1911–1922.
1299. Nitsch C., Schatz G. H., Braslavsky S. E. Laser-induced photoacoustic calorimetry of primary processes in cells of *rhodospirillum rubrum* // Biochimica et Biophysica Acta. 1989. V. 975. P. 88–95.

1300. *Зубов Б. В., Кононенко А. А., Мурина Т. М. и др.* Исследование конформационных переходов в фотосинтетических реакционных центрах методом температурного скачка // *Биофизика*, 1988. Т. 33, № 4. С. 604–608.
1301. *Helander P., Lundstrom I.* Whole blood a sedimenting sample studied by photoacoustic spectroscopy // *J. Photoacoustic*. 1982. V. 1, № 2. P. 203–215.
1302. *Sugi M.* Light-sonic microscope and its application // *J. Soc. Non-Traditional Technol.* 1986. № 200. P. 8–11.
1303. *Sathyam U.S., Prahl S.A.* Limitations in measurement of subsurface temperatures using pulsed photothermal radiometry // *J. Biomed. Opt.* 1997. V. 2, № 3. P. 251–261.
1304. *Cross F.M., Al-Dhahir R.K., Dyer R.E., MacRobert A.J.* Time-resolved photoacoustic studies of vascular tissue ablation of three laser wavelengths // *Appl. Phys.* 1987. V. 50. P. 1019–1021.
1305. *Бейлин Е. Н., Буянов-Уздальский А. Ю., Жаров В. П. и др.* Исследование лазерно-акустических эффектов в воде и их влияние на клеточные структуры // *Акустич. журн.* 1987. Т. 33, № 2. С. 194–199.
1306. *Алейников В. С., Гапонов С. С., Масычев В. И., Рабодзей Н. В.* Фотоакустическая микроскопия биологических объектов и структур // *Электрон. промыш.* 1987. № 1. С. 51–52.
1307. *Аицуров А. М., Мадвалиев У., Проклов В. В. и др.* Фотоакустический микроскоп с оптическим сканированием // *ПТЭ*. 1988. № 2. С. 154–157.
1308. *Sowa M.G., Mantsch H.H.* FT-IR step-scan photoacoustic phase analysis and depth profiling of calcified tissue // *Appl. Spectr.* 1994. V. 48, № 3. P. 316–319.
1309. *Fried D., Visuri S.R., Featherstone J.D. et al.* Infrared radiometry of dental enamel during Er: YAG and Er: YSGG laser irradiation // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 4. P. 455–465.
1310. *Oraevsky A.A., Jacques S.L., Tittel F.K.* Measurement of tissue optical properties by time-resolved detection of laser-induced transient stress // *Appl. Opt.* 1997. V. 36, № 1. P. 402–415.
1311. *Oraevsky A.A.* A nanosecond acoustic transducer with applications in laser medicine // *IEEE/LEOS Newsletter*. 1993. № 2. P. 6–8, 17.
1312. *Oraevsky A.A.* Laser optoacoustic imaging for diagnosis of cancer // *IEEE/LEOS Newsletter*. 1996. № 12. P. 17–20.
1313. *Kruger R.A., Lin P.* Photoacoustic ultrasound: pulse production and detection in 0,5 % Liposyn // *Med. Phys.* 1994. V. 21, № 7. P. 1179–1184.
1314. *Kruger R.A., Pingyu L., Fang Y., Appledorn C.R.* Photoacoustic ultrasound-reconstruction tomography // *Med. Phys.* 1995. V. 22, № 10. P. 1605–1609.
1315. *Karabutov A.A., Podymova N.B., Letokhov V.S.* Time-resolved laser optoacoustic tomography of inhomogeneous media // *Appl. Phys. B*. 1996. V. 63. P. 545–563.
1316. *Itzkan I., Albagli D., Dark M.L. et al.* The thermoelastic basis of short pulsed laser ablation of biological tissue // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 1960–1964.
1317. *Pacheco M.T.T., Urruchi W.I.* Light absorption-induced heating causes altered surface reflectance of an oblique laser probe beam to achieve high signal-to-noise in a laser absorption spectrometer prism device // *Proc. SPIE, Bellingham, SPIE*, 1992. V. 1646. P. 410–417.
1318. *Seidel B.S., Faubel W., Ache J.* Thermal lens detectors system for capillary electrophoresis // *J. Biomed. Opt.* 1997. V. 2, № 3. P. 326–331.
1319. *Карабутов А. А., Ораевский А. А.* Регистрация оптико-акустических импульсов с высоким временным разрешением для измерения распределения оптической энергии в биотканях, в кн. *Оптическая биомедицинская диагностика. Т. 1* / Под ред. В. В. Тучина, Физматлит, М.: 2007. С. 507–554 / Пер. с англ. под ред. Тучина В. В. *Handbook of Optical Biomedical Diagnostics* / Ed. by Tuchin V. V. Bellingham, WA: SPIE Press, 2002.
1320. *Ларин К. В., Ларина И. В., Мотамеди М., Есеналиев Р. О.* Мониторинг охлаждения и замораживания ткани с помощью лазерного оптико-акустического метода // *Квантовая электроника* 2002. Т. 32, № 11. С. 953–958.
1321. *Oraevsky A.A. and Karabutov A.A.* Optoacoustic tomography, Chapter 34 in *Biomedical Photonics Handbook* / Ed. by Vo-Dinh T. Boca Raton: CRC Press, 2003. P. 34-1–34.

1322. Kruger R.A., Kiser W.L., Reinecke D.R., and Kruger G.A. Thermoacoustic computed tomography using a conventional linear transducer array // *Med. Phys.* 2003. V.30. P. 856–860.
1323. Pilatou M.C., Voogd N.J., de Mul F.F.M., van Adrichem L.N.A., and Steenbergen W. Analysis of three-dimensional photoacoustic imaging of a vascular tree *in vitro* // *Rev. Sci. Instrum.* 2003. V.74, №10. P. 4495–4499.
1324. Kolkman R.G.M., Hondebrink E., Steenbergen W., van Leeuwen T.G., and de Mul F.F.M. Photoacoustic imaging of blood vessels with a double-ring sensor featuring a narrow angular aperture // *J. Biomed. Opt.* 2004. V.9, №6. P. 1327–1335.
1325. Wang X.D., Pang Y.J., Ku G., Xie X.Y., Stoica G., and Wang L.V. Noninvasive laser-induced photoacoustic tomography for structural and functional *in vivo* imaging of the brain // *Nat. Biotechnol.* 2003. V.21. P. 803–806.
1326. Wang X.D., Pang Y.J., Ku G., Xie X.Y., Stoica G., and Wang L.V. Three-dimensional laser-induced photoacoustic tomography of mouse brain with the skin and skull intact // *Opt. Lett.* 2003. V.28, №19. P. 1739–1741.
1327. Niederhauser J.J., Frauchiger D., Weber H.P., and Frenz M. Real-time optoacoustic imaging using a schlieren transducer // *Appl. Phys. Lett.* 2002. V.81. P. 571–573.
1328. Payne B.P., Venugopalan V., Mikić B.B., and Nishioka N.S. Optoacoustic determination of optical attenuation depth using interferometric detection // *J. Biomed. Opt.* 2003. V.8, №2. P. 264–272.
1329. Payne B.P., Venugopalan V., Mikić B.B., and Nishioka N.S. Optoacoustic tomography using time-resolved interferometric detection of surface displacement // *J. Biomed. Opt.* 2003. V.8, №2. P. 273–280.
1330. Oberheide U., Bruder I., Welling H., Ertmer W., and Lubatschowski H. Optoacoustic imaging for optimization of laser cyclophotocoagulation // *J. Biomed. Opt.* 2003. V.8, №2. P. 281–287.
1331. Schüle G., Hüttman G., Framme C., Roeder J., and Brinkmann R. Noninvasive optoacoustic temperature determination at the fundus of the eye during laser irradiation // *J. Biomed. Opt.* 2004. V.9, №1. P. 173–179.
1332. Li B., Majaron B., Viator J.A., Milner T.E., Chen Z., Zhao Y., Ren H., and Nelson J.S. Accurate measurement of blood vessel depth in port wine stained human skin *in vivo* using pulsed photothermal radiometry // *J. Biomed. Opt.* 2004. V.9, №2. P. 299–307.
1333. Choi B., Majaron B., and Nelson J.S. Computational model to evaluate port wine stain depth profiling using pulsed photothermal radiometry // *J. Biomed. Opt.* 2004. V.9, №5. P. 961–966.
1334. Jeon R.J., Mandelis A., Sanchez V., and Abrams S.H. Nonintrusive, noncontacting frequency-domain photothermal radiometry and luminescence depth profilometry of carious and artificial subsurface lesions in human teeth // *J. Biomed. Opt.* 2004. V.9, №4. P. 804–819.
1335. Lapotko D., Romanovskaya T., and Zharov V. Photothermal images of live cells in presence of drug // *J. Biomed. Opt.* 2002. V.7, №3. P. 425–434.
1336. Larin K.V., Larina I.V., and Esenaliev R.O. Monitoring of tissue coagulation during thermotherapy using optoacoustic technique // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2005. V.38. P. 2645–2653.
1337. Larina I.V., Larin K.V., and Esenaliev R.O. Real-time optoacoustic monitoring of temperature in tissues // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2005. V.38. P. 2633–2639.
1338. Esenaliev R.O., Larina I.V., Larin K.V., Deyo D.J., Motamedi M., and Prough D.S. Optoacoustic technique for noninvasive monitoring of blood oxygenation: A feasibility study // *Appl. Opt.* 2002. V.41, №22. P. 4722–4731.
1339. Wang L.V. Ultrasound-mediated biophotonics imaging: A review of acousto-optical tomography and photo-acoustic tomography // *Disease Markers* 2003/2004. V.19. P. 123–138.
1340. Maslov K., Stoica G., and Wang L.V. *In vivo* dark-field reflection-mode photoacoustic microscopy // *Opt. Lett.* 2005. V.30, №6. P. 625–627.

1341. *Selb J., Lévéque-Fort S., Dubois A., Forget B.C., Pottier L., Ramaz F., and Boccara C.* Ultrasonically modulated optical imaging, Chapter 35 in *Biomedical Photonics Handbook* / Ed. by Vo-Dinh T. Boca Raton: CRC Press, 2003. P. 35-1–12.
1342. *Kinnunen M. and Myllylä R.* Effect of glucose on photoacoustic signals at the wavelength of 1064 and 532 nm in pig blood and Intralipid // *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2005. V. 38. P. 2654–2661.
1343. *Petrova I., Esenaliev R.O., Petrov Y.Y., Brecht H.-P.F., Svendsen C.H., Olsson J., Deyo D.J., and Prough D.S.* Optoacoustic monitoring of blood hemoglobin concentration: A pilot clinical study // *Opt. Lett.* 2005. V. 30. P. 1677–1679.
1344. *Xu M. and Wang L.V.* Photoacoustic imaging in biomedicine // *Rev. Sci. Instrum.* 2006. V. 77. P. 041101.
1345. *Zhang H.F., Maslov K., Stoica G., and Wang L.V.* Functional photoacoustic microscopy for high-resolution and noninvasive *in vivo* imaging // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. P. 848–851.
1346. *Zhang E.Z., Laufer J.G., Pedley R.B., and Beard P.C.* *In vivo* high-resolution 3D photoacoustic imaging of superficial vascular anatomy, *Phys. Med. Biol.* 2009. V. 54. P. 1035–1046.
1347. *Khokhlova T., Pelivanov I., and Karabutov A.* Advances in optoacoustic imaging, Chapter 12 in *Handbook of Photonics for Biomedical Science* / Ed. by Tuchin V.V. CRC Press, London: Taylor & Francis Group, 2010. P. 343–360.
1348. *Hu S., Maslov K., and Wang L.V.* Optical-resolution photoacoustic microscopy for *in vivo* volumetric microvascular imaging in intact tissues, Chapter 13 in *Handbook of Photonics for Biomedical Science* / Ed. by Tuchin V.V. CRC Press, London: Taylor & Francis Group, 2010. P. 361–375.
1349. *Eghedari M., Oraevsky A., Copland J.A., Kotov N.A., Conjusteau A., and Motamedi M.* High sensitivity of *in vivo* detection of gold nanorods using a laser optoacoustic imaging system // *Nano Lett.* 2007. V. 7. P. 1914–1918.
1350. *Shashkov E. V., Everts M., Galanzha E.I., and Zharov V.P.* Quantum dots as multimodal photoacoustic and photothermal contrast agents // *Nano Lett.* 2008. V. 8, 3953–3958.
1351. *Kim J.-W., Galanzha E.I., Shashkov E. V., Moon H.-M., and Zharov V.P.* Golden carbon nanotubes as multimodal photoacoustic and photothermal high-contrast molecular agents // *Nat. Nanotechnol.* 2009. V. 4, 855–860.
1352. *Galanzha E.I., Shashkov E. V., Spring P., Suen J.Y., and Zharov V.P.* *In vivo*, noninvasive, label-free detection and eradication of circulating metastatic melanoma cells using two-color photoacoustic flow cytometry with a diode laser // *Cancer Res.* 2009. V. 69. P. 7926–7934.
1353. *Song K.H., Stein E.W., Margenthaler J.A., and Wang L.V.* Noninvasive photoacoustic identification of sentinel lymph nodes containing methylene blue *in vivo* in a rat model // *J. Biomed. Opt.* 2008. V. 13. P. 054033.
1354. *Song K.H., Kim C., Cogley C.M., Xia Y., and Wang L.V.* Near-infrared gold nanocages as a new class of tracers for photoacoustic sentinel lymph node mapping on a rat model // *Nano Lett.* 2009. V. 9. P. 183–188.
1355. *Song K.H., Kim C., Maslov K., and Wang L.V.* Noninvasive *in vivo* spectroscopic nanorod-contrast photoacoustic mapping of sentinel lymph nodes // *Eur. J. Radiol.* 2009. V. 70. P. 227–231.
1356. *Tuchin V.V., Galanzha E.I., and Zharov V.P.* *In vivo* photothermal and photoacoustic flow cytometry, Chapter 17, in *Advanced Optical Cytometry: Methods and Disease Diagnoses* / Ed. by Tuchin V.V. Weinheim, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2010.
1357. *Максимова И.Л., Акчурич Г.Г., Терентюк Г.С., Хлебцов Б.Н., Акчурич Г.Г. мл., Ермолаев И.А., Скапцов А.А., Ревзина Е.М., Тучин В.В., Хлебцов Н.Г.* Лазерный фототермализ биотканей с использованием плазмонно-резонансных наночастиц // *Квантовая электроника* 2008. Т. 38, № 6. С. 536–542.
1358. *Sterenberg H.J.C.M., Motamedi M., Sahebkar F. et al.* *In vivo* optical spectroscopy: new promising techniques for early diagnosis of skin cancer // *Skin Cancer.* 1993. V. 8, № 1. P. 57–65.

1359. Zeng H., MacAulay C.E., McLean D.I., Palcic B. Spectroscopic and microscopic characteristics of human skin autofluorescence emission // *Photochem. Photobiol.* 1995. V. 61, № 6. P. 639–645.
1360. Bigio I.J., Mourant J.R. Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy // *Phys. Med. Biol.* 1997. V. 42. P. 803–814.
1361. Loschenov V.B., Poleshkin P.V., Stratonnikov A.A., Torshina N.L. The spectroscopy analysis of tissues in vivo // *Proc. SPIE, Bellingham, SPIE, 1995. V. 2370. P. 500–508.*
1362. Cubeddu R., Canti G., Pifferi A. et al. Study of the absorption properties of sulfonated aluminum phthalocyanine in vivo and ex vivo in murine tumor models // *J. Biomed. Opt.* 1997. V. 2, № 1. P. 131–139.
1363. Doornbos R., Hennink E.J., Putman C.A.J. et al. White blood cell differentiation using a solid state flow cytometry // *Cytometry.* 1993. V. 14. P. 589–594.
1364. Schmidt W. Novel single-beam optical spectrophotometer for fast luminescence absorption, and reflection measurements of turbid materials // *Opt. Eng.* 1995. V. 34, № 2. P. 589–595.
1365. Ono K., Kanda M., Hiramoto J. et al. Fiber optic reflectance spectrophotometry for in vivo tissue diagnosis // *Appl. Opt.* 1991. V. 30. P. 98–105.
1366. Fishkin J.B., Coquoz O., Anderson E.R. et al. Frequency-domain photon migration measurements of normal and malignant tissue optical properties in a human subject // *Appl. Opt.* 1997. V. 36, № 1. P. 10–20.
1367. Tromberg B., Coquoz O., Fishkin J.B. et al. Non-invasive measurements of breast tissue optical properties using frequency-domain photon migration // *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 1997. V. 352. P. 661–668.
1368. Синичкин Ю.П., Утц С.П. *In vivo* отражательная и флуоресцентная спектроскопия / Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та, 2001.
1369. Синичкин Ю.П., Долотов Л.Е., Зимняков Д.А., Тучин В.В., Утц С.П. Специальный практикум по оптической биофизике. *In vivo* отражательная и флуоресцентная спектроскопия кожи человек / Учебное пособие для студентов вузов. Саратов: Изд-во Саратовск. ун-та, 2003.
1370. Когерентно-оптические методы в измерительной технике и биофотонике / Учебное пособие под ред. Рубухо В.П., Тучина В.В. Саратов: ООО «Саттелит», 2009. ISBN 978-5-904395-06-3.
1371. Тучинский В.П. Микроскопия субволновых структур // *Успехи физ. наук.* 1996. Т. 166, № 11. С. 1219–1229.
1372. Shapiro H.M. *Practical Flow Cytometry.* 4th ed. N. Y.: Wiley-Liss Inc., 2003.
1373. *Flow cytometry and sorting* / Ed. by Melamed M.R., Lindmo T., Mendelsohn M. L. N. Y.: Wiley-Liss Inc., 1990.
1374. *Laser scattering spectroscopy of biological objects* / Eds J. Stepanek, P. Auzenbacher, B. Sedlacek. Amsterdam: Elsevier, 1987.
1375. *Spectroscopy of biological molecules — state of the art* / Eds A. Bertoluzza, C. Fagnano, P. Monti. Bologna: Esculapio, 1989.
1376. van Best J.A., Kuppens E. V.M.J. Summary of studies on the blue-green autofluorescence and light transmission of the ocular lens // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 3. P. 243–250.
1377. Weale R.A. Age and human lenticular fluorescence // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 3. P. 251–261.
1378. Anidjar M., Cussenot O., Avrillier S. et al. Ultraviolet laser-induced autofluorescence distinction between malignant and normal urothelial cells and tissues // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 3. P. 335–341.
1379. König K., Kienle A., Boehncke W.-H. et al. Photodynamic tumor therapy and on-line fluorescence spectroscopy after ALA administration using 633 nm light as therapeutic and fluorescence excitation radiation // *Opt. Eng.* 1994. V. 33, № 9. P. 2945–2952.
1380. Alexander A., Davenport C.M.C., Gmitro A.F. Comparison of illumination wavelengths for detection of atherosclerosis by optical fluorescence spectroscopy // *Opt. Eng.* 1994. V. 33, № 1. P. 167–174.

1381. Yappert M.C., Lal S., Borchman D. Age dependence and distribution of green and blue fluorophores in human lens homogenates // *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 1992. V. 33, № 13. P. 3555–3560.
1382. Yappert M.C., Borhman D., Byrdwell W.C. Comparison of specific blue and green fluorescence in cataractous versus normal human lens fractions // *Invest. Ophthalm. Vis. Sci.* 1993. V. 34, № 3. P. 630–636.
1383. Braichotte D.R., Wagnieres G.A., R. Bays R. et al. Clinical pharmacokinetic study of photofrin by fluorescence spectroscopy in the oral cavity, the esophagus, and the bronchi // *Cancer.* 1995. V. 75, № 11. P. 2768–2778.
1384. Tang G.C., Pradhan A., Sha W. et al. Pulsed and cw fluorescence spectra from cancerous, normal, and chemically treated human breast and lung tissue // *Appl. Opt.* 1989. V. 28, № 12. P. 2337–2342.
1385. Yang Y., Mitchell L.D., Alfano R.R. Fluorescence spectroscopy of dermal wounds in rats // *J. Biomed. Opt.* 1997. V. 2, № 1. P. 53–57.
1386. Green M.A., Bua D., Anderson R.R., Wishioka N.S. Burn depth estimation using indocyanine green fluorescence // *Arch. Dermatol.* 1992. V. 128. P. 43–49.
1387. Bocher T., Beuthan J., Minet O. et al. Minimal invasive ischemia-monitoring using quantitative measurements of NADH-concentrations // *Minimal Invasive Med.* 1994. V. 5, № 2. P. 71–74.
1388. Ramanujam N., Mitchell M.F., Mahadevan M.S. et al. Fluorescence spectroscopy: a diagnostic tool for cervical intraepithelial neoplasia (CIN) // *Gynecologic Oncology.* 1994. V. 52. P. 31–38.
1389. Ramanujam N., Mitchell M.F., Mahadevan M.S. et al. *In vivo* diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337-nm-excited laser — induced fluorescence // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994. V. 91. P. 10193–10197.
1390. Sinaasappel M., Sterenborg H.J.C.M. Quantification of the hematoporphyrin derivative by fluorescence measurement using dual-wavelength excitation and dual-wavelength detection // *Appl. Opt.* 1993. V. 32, № 4. P. 541–548.
1391. Sterenborg H.J.C.M., Motamedi M., Wagner R.F. et al. *In vivo* fluorescence spectroscopy and imaging of human skin tumours // *Lasers Med. Sci.* 1994. V. 9. P. 191–201.
1392. van der Breggen E.W.J., Rem A.I., Christian M.M. et al. Spectroscopic detection of oral and skin tissue transformation in a model for squamous cell carcinoma: autofluorescence versus systemic aminolevulinic acid-induced fluorescence // *IEEE J. Select. Top. Quant. Electr.* 1996. V. 2, № 4. P. 997–1007.
1393. Sterenborg H.J.C.M., Saarnak A.E., Frank R., Motamedi M. Evolution of spectral correction techniques for fluorescence measurements on pigmented lesions in vivo // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1996. V. 35. P. 159–165.
1394. Andersson-Engels S., Klinteberg C., Svanberg K., Svanberg S. *In vivo* fluorescence imaging for tissue diagnostics // *Phys. Med. Biol.* 1997. V. 42. P. 815–824.
1395. Papazoglou T.G. Malignant and atherosclerotic plaque diagnosis — is laser induced fluorescence spectroscopy the ultimate solution? // *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 1995. V. 28. P. 3–11.
1396. Oraevsky A., Jacques S.L., Pettit G.H. et al. XeCl laser-induced fluorescence of atherosclerotic arteries. Spectral similarities between lipid-rich lesions and peroxidized lipoproteins // *Circulation Res.* 1993. V. 72, № 1. P. 84–90.
1397. Bottiroli G., Croce A.C., Locatelli D. et al. Natural fluorescence of normal and neoplastic human colon: a comprehensive «ex vivo» study // *Lasers Surg. Med.* 1995. V. 16. P. 48–60.
1398. König K., Liu Y., Sonek G.J. et al. Autofluorescence spectroscopy of optically trapped cells // *Photochem. Photobiol.* 1995. V. 62, № 5. P. 830–835.
1399. Tang G.C., Oka N., Nagamatsu G.R., Alfano R.R. Laser fluorescence spectroscopy from human spermatozoa // *Appl. Opt.* 1993. V. 32, № 4. P. 464–467.
1400. Cubeddu R., Canti G., Taroni P., Valentini G. Tumor visualization in a murine model by time-delayed fluorescence of sulphonated aluminium phthalocyanine // *Lasers Med. Sci.* 1997. V. 12. P. 200–208.

1401. *Schneckenburger H., König K.* Fluorescence decay kinetics and imaging of NAD(P)H and flavins as metabolic indicators // *Opt. Eng.* 1992. V. 31, № 7. P. 1447–1457.
1402. *Mizert J., Wagnieres G., Stepinac T., van der Bergh H.* Endoscopic tissue characterization by frequency-domain fluorescence lifetime imaging (FD-FLIM) // *Lasers Med. Sci.* 1997. V. 12. P. 209–217.
1403. *Yu N.-T., Krantz B. S., Eppstein J. A. et al.* Development of noninvasive diabetes screening device using the ratio of fluorescence to Rayleigh scattered light // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 3. P. 280–288.
1404. *Lago A., Obeidat A. T., Kaplan A. E. et al.* Two-photon-induced fluorescence of biological markers based on optical fiber // *Opt. Lett.* 1995. V. 20, № 20. P. 2054–2056.
1405. *Piston D. W., Masters B. R., Webb W. W.* Three dimensionally resolved NAD(P)H cellular metabolic redox imaging of the *in situ* cornea with two-photon excitation laser scanning microscopy // *J. Microsc.* 1995. V. 178. P. 20–27.
1406. *Gryczynski I., Malak H., Hell S. W., Lakowicz J. R.* Three-photon excitation of 2,5-BIS (4-biphenyl) oxazole: steady state and time resolved intensities and anisotropies // *J. Biomed. Opt.* 1996. V. 1, № 4. P. 473–480.
1407. *Charlesworth P., Truscott T. G.* The use of 5-aminolevulinic acid (ALA) in photodynamic therapy // *J. Photochem. Photobiol. B.: Biol.* 1993. V. 18. P. 99–100.
1408. *König K., Schneckenburger H., Ruck A., Steiner R.* In vivo photoproduct formation during PDT with ALA-induced endogenous porphyrins // *J. Photochem. Photobiol. B.: Biol.* 1993. V. 18. P. 287–290.
1409. *Schneckenburger H., König K., Dienersberger T., Hahn R.* Time-gated microscopic imaging and spectroscopy in medical diagnosis and photobiology // *Opt. Eng.* 1994. V. 33. P. 3156–3167.
1410. *Соколов В. В., Филоненко Е. В., Телегина Л. В., Булгакова Н. Н., Смирнов В. В.* Комбинация флуоресцентного изображения локальной спектрофотометрии при флуоресцентной диагностике раннего рака гортани и бронхов // *Квантовая электроника* 2002. Т. 32, № 11. С. 963–969.
1411. *Gonchukov S., Biryukova T., Sukhinina A., and Vdovin Yu.* Fluorescence detection of dental calculus // *Laser Phys. Lett.* 2010. V. 7, № 11. P. 812–816.
1412. *Бахмутов Д. Н., Гончуков С. А., Харченко О. Н., Никифорова О. А.* Флуоресцентная диагностика стоматологических заболеваний // *Медицинская физика* 2006. № 1. С. 62–67.
1413. *Czaika V., Alborova A., Sterry W., Lademann J., and Koch S.* Application of laser scan microscopy *in vivo* for wound healing characterization // *Laser Phys. Lett.* 2010. V. 7, № 9. P. 685–692.
1414. *Yaroslavsky A. N., Neel V., and Anderson R. R.* Fluorescence polarization imaging for delineating nonmelanoma skin cancers // *Optics Letters* 2004. V. 29. P. 2010–2012.
1415. *Yaroslavsky A. N., Barbosa J., Neel V., DiMarzio C., and Anderson R. R.* Combining multi-spectral polarized-light imaging and confocal microscopy for localization of non-melanoma skin cancer // *J. Biomed. Opt.* 2005. V. 10, № 1. P. 014011.
1416. *Yaroslavsky A. N., Salomatina E. V., Neel V., Anderson R., and Flotte T.* Fluorescence polarization of tetracycline derivatives as a technique for mapping nonmelanoma skin cancers // *J. Biomed. Opt.* 2007. V. 12, № 1. P. 014005.
1417. *Al-Arashi M., Salomatina E. V., and Yaroslavsky A. N.* Multimodal confocal microscopy for the detection of nonmelanoma skin cancers // *Las. Surg. Med.* 2007. V. 39, № 9. P. 706–715.
1418. *Tannous Z., Al-Arashi M., Shah S., and Yaroslavsky A. N.* Delineating melanoma using multimodal polarized light imaging // *Las. Surg. Med.* 2009. V. 41. P. 10–16.
1419. *Борисова Е., Троянова П., Павлова П., Аврамов Л.* Диагностика пигментированных кожных новообразований методами лазерно-индуцированной автофлуоресцентной и диффузной отражательной спектроскопии // *Квантовая электроника* 2008. Т. 38, № 6. С. 597–605.
1420. *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials / Ed. by Gremlich H. U. and Yan B.* NY: Marcel Dekker Inc., 2001.

1421. Biomedical Vibrational Spectroscopy / Ed. by Lasch P. and Kneipp J. Hoboken, Wiley, 2008.
1422. Vibrational Spectroscopy in Medicine: Applications to Diagnosis of Disease / Ed. by Diem M. // *J. Biophotonics* 2009. V. 2, № 1–2. P. 1–116.
1423. Modern Biophotonic Trends in Microbiological and Medical Diagnostics / Ed. by Naumann D. and Diem M. // *J. Biophotonics* 2010. V. 3, № 8–9. P. 1–116.
1424. *Летохов В. С.* Лазерная фотоионизационная спектроскопия. М.: Наука, 1987.
1425. *Чернобродов Е. Г., Шерозия Г. А.* Применение методов лазерной спектроскопии для создания высокочувствительных аналитических приборов. М.: ЦНИИ «Электроника», 1988.
1426. *Апатин В. М., Беков Г. И., Веселов В. А. и др.* Ультрочувствительный автоматизированный лазерный фотоионизационный аналитический спектрометр ЛАФИС-1 // *Изв. АН СССР. Сер. физическая.* 1990. Т. 54, № 8. С. 1526–1530.
1427. *Kruger A. E., Surmenko E. L., Surmenko L. A., et al.* Applications of direct atomic laser spectral analysis of laser plasma for determination of inorganic components presence in biological objects. *Proc SPIE* 2000. V. 4001. P. 299–303.
1428. *Surmenko E. L., Sokolova T. N., Tuchin V. V.* Microspectral investigation of hair of one girl during six years by laser emission analysis. *Proc SPIE* 2001. V. 4432. P. 253–256.
1429. *Surmenko E. L., Tuchin V. V., Sokolova T. N., et al.* Studies of rejected dental Ti-implants by laser microspectral analysis // *Proc SPIE* 2003. V. 5068. P. 362–366.
1430. *Сурменко Е. Л.* Применение лазерного микроспектрального анализа в технологии электронных приборов и медицинской диагностике: — Дис. канд. физ.-мат. наук. Саратов, 2004. 173 с.
1431. *Сурменко Е. Л., Тучин В. В., Соколова Т. Н., Kishen A.* Спектроскопическое исследование процессов деминерализации и реминерализации зубной эмали // *Альманах клинической медицины* 2006. № 12. С. 39.
1432. *Gordienko V. M., Makarov I. A., Khomenko A. S., Timofeev M. A., and Tuchin V. V.* Microspectral analysis of dentine with femtosecond laser induced plasma, *Laser Physics*. 2009. V. 19, № 6. P. 1288–1293.
1433. *Быковский Ю. А., Неволин В. Н.* Лазерная масс-спектрометрия. М.: Энергоатомиздат, 1985.
1434. *Арефьев И. М., Беняев Н. Е., Комлева А. А. и др.* Количественный элементный анализ медико-биологических проб с использованием лазерного масс-спектрометра // *Ж. аналит. хим.* 1986. Т. 41, № 1. С. 50–54.

Предметный указатель

- Абляция 13, 48, 77, 78, 88, 170, 236, 290
Абсорбционная спектроскопия 324
Абсорбционные методы 324
Автофлуоресценция 43, 44, 384
Аденокарцинома 371, 375
Аденома 317, 371
Активная спектроскопия КР 70
Альбедо 94, 96, 97, 99, 203
5-Аминолевулиновая кислота 75, 86
Ангиопластика 87, 231, 383
Аорта 194, 195, 208
Апатит 209
Артериальная стенка 22, 358, 360
Астроцитомы 24, 202
Атеросклеротическая бляшка 22
- Баллистические фотоны** 68, 104, 115, 132, 163, 164, 390
Белки 44, 49, 51, 58, 66, 68, 77, 186, 322, 401–403
Билирубин 20, 22, 60, 86, 110, 316, 353
Биоткань 13, 20–22, 24, 36, 44, 46–65, 75, 79, 97, 102, 132, 144, 148, 159, 204–207, 211, 281, 288, 292–294, 313, 317, 332, 358, 361, 375
Биофотометры 319
Биохимические датчики 291, 304
Брыжейка 207
- Вектор Стокса** 130
Вена 196, 208
Визуализация 10, 44, 56, 63, 66–68, 70, 71, 72, 75, 108, 109, 114, 115, 123, 132, 133, 144, 153–155, 157, 164, 168, 170, 172, 173, 181–183, 285, 300, 301, 316, 333, 335, 336, 360, 363, 365, 374, 376, 381, 387–389, 401
Влага передней камеры глаза 141
Влажность 303
- Вода 26, 52, 353, 393
Волны фотонной плотности 105, 106, 107, 109, 122, 125, 126
Волоконно-оптические аппликаторы 75, 86
— датчики 290, 291, 293, 295, 297, 299, 301, 303, 305, 349, 467,
— зонды 85, 293, 315
— катетеры 73, 87
— облучатели 281
Волоконно-оптический доплеровский измеритель микроциркуляции крови 294
— когерентный томограф 296
— микрофлуориметр 297, 299
— фотон-корреляционный спектрометр 295, 296
Волоконные жгуты 263
Волоконные световоды 260
— кварцевые 275, 278, 311,
— кварц-полимерные 278
— медицинские 275
— многомодовые 263, 269, 275, 286,
— на основе галогенидов серебра 270, 271, 278, 293
— на основе галогенидов таллия 270,
— на основе фторидов тяжелых металлов 270
— на основе халькогенидных стекол 270
— одномодовые 143, 159, 164, 165, 169, 173, 176, 178, 243, 247, 254, 261, 262, 264–271, 273–275, 286, 287, 293–296, 300, 304
— одномодовые с сохранением поляризации 261
— полые металлические 279
— полые пластиковые 280
— сапфировые 270
— с крутым изгибом 265, 266, 300, 305
— типа PANDA 261, 263
Волоконный ИК-радиометр 293

- Временная когерентность 76, 213
Время термодиффузии 331
- Газовый анализ** 312
Гауссов пучок 216
Гематокрит 33, 37, 39, 40, 41, 131, 132, 200, 211
Гемоглобин 20, 26, 37, 51, 52, 76, 111, 353
Генерация второй гармоники 181, 239
Гигантское КР 69
Гидратация 193
Гидроксипатит 19, 127, 402
Гипертермия 75
Глаз 73, 141, 145, 209, 296, 323, 358, 376, 377
Глаукома 385
Глиобластома 24
Глиома 199, 402
Глубина модуляции 106, 148, 149
— проникновения света 21, 24, 52, 102, 189
Глюкоза 110
Голография 74
Градиентный световод 261, 287
Граничные условия 50, 94
Гранулоциты 379
- Двухфотонная флуоресцентная микроскопия** 68, 389
Дентин зуба 127, 360
Дезоксигемоглобин 69, 111, 124, 207
Дерма 16, 22, 28, 34, 76, 99, 102, 131, 193, 194, 202
Деполяризация света 131
Дефлекционный метод 330, 350
Диабет 78, 129, 313, 355, 385, 386
Динамические калориметрические системы 349, 350
Динамическое рассеяние света 150
Дисперсия
— волноводная 267
— волоконных световодов 267
— материала 267, 268, 278
— межмодовая 268
— профиля волоконного световода 268
— флуктуаций интенсивности 146, 155
Дисплазия 371
Дифракция волн фотонной плотности 107
- Диффузионная длина 63
— теория 96, 189
Диффузионно-волновая спектроскопия 111, 158
Диффузионное приближение 38, 96, 110
Диффузионный коэффициент 96, 361
— уравнение 105, 316
Диффузия тепла 53, 55
Диффузное отражение 190
— пропускание 190
Длина деполяризации 131, 134
— свободного пробега фотона 160
— поляризационных биений ВС 263
Доза облучения 82–84, 92
Дозиметрия 93, 98
Доплеровские визуализаторы кровотока 153
- Железистая ткань** 197, 198
Желудок 199, 209, 280
Жидкостная ячейка 344
Жировая ткань 24, 197, 198, 202, 207, 208
- Закон Бугера-Бера** 189
Затухание волн фотонной плотности 107
- Изобестическая длина волны** 160, 161, 291, 313
ИК-световоды 270, 293
ИК-фурье-спектрометр 320
Иммерсия 109
Импульсный метод 118, 201, 202, 352
Инверсная заселенность уровней 212
Инверсный метод Монте Карло 92, 189
Индикатриса рассеяния 135, 189, 204
Индуцированное излучение 212
Индуцированное поглощение 212
Интегрирующая сфера 205, 206
Интенсивность 21, 41, 44, 103, 136, 218, 393
Интерференция волн фотонной плотности 107, 122
Интерферометрические исследования
— методы 179, 328
Интерферометрия 74, 86, 143, 144, 164
Интерферометр Саньяка 324
Итерационные методы 190
- 16 Тучин

- Камни желчного пузыря** 200
β-Каротин 70, 316
 Каротиноиды 402, 403
 Карцинома 23, 24, 124, 197, 198, 315
 Катаракта 142, 149, 396
 Квазиупругое рассеяние 150
 Коагулированная ткань 205
 Коагуляция 46, 50, 51, 78, 79, 87, 216, 425, 431
 Когерентная томография 129, 164, 413
 Когерентный пик 105
 Кожа 23, 27, 98, 143, 181, 185, 191, 193, 198, 200, 205, 208, 281, 314, 360, 386
 Коллаген 32, 49, 181, 384, 387, 403
 Коллагеновые волокна 17, 18, 28, 33, 58, 128, 129, 210, 317
 Коллимированное пропускание 189, 200, 203, 315
 Компрессия ткани 115
 Конденсированный инверсный метод Монте-Карло 204
 Конфокальная микроскопия 143, 161, 374
 Конфокальная томография 144
 Конфокальный микроскоп 377, 395, 401
 Косые лучи 300
 Коэффициент диффузии 96, 97, 200, 156, 349
 — отражения 184, 185, 291, 299
 — поглощения 21, 37, 53, 58, 80, 100, 107, 127, 204, 211, 310, 329, 336, 339
 — рассеяния 21, 30, 31 34–37, 96, 127, 204, 207, 210, 211
 — температуропроводности 331
 — теплопроводности 331
 — термодиффузии 52, 360
 — экстинкции 21, 41, 115, 168, 189, 373
alpha-Кристаллин 140, 141, 210, 211, 322, 385, 397
 КР-микропроба 370, 390, 391, 393, 395, 397, 399, 401
 КР-микроскопия 395
 КР-спектры 68, 392, 395–397, 399, 401, 402
- Лазер**
 — азотный 87, 230, 355, 381, 460
 — аргонный 170, 225, 226, 228, 254, 287,
 — водородный 250
 Лазер галлий-арсенидовый 242
 — гелий-кадмиевый 226
 — гелий-ксеноновый 223
 — гелий-неоновый 179, 219
 — гелий-селеновый 226
 — гольмиевый 56, 87, 88, 259, 275
 — гранатовый 64, 241, 411, 412
 — криптоновый 259, 388
 — на алюмоиттриевом гранате с неодимом 235
 — на двуокиси углерода 227
 — на окиси углерода 228, 229
 — на парах меди 86, 223, 224
 — на парах золота 224
 — на свободных электронах 252
 — на стекле с неодимом 80, 235, 247
 — рубиновый 234, 238, 259, 406
 — с оптической накачкой 212, 229, 230
 — титан-сапфировый 82–84, 118, 119, 168, 215, 235, 237, 239, 259
 — форстеритовый 239, 407, 408,
 — эрбиевый 56, 76, 87, 236, 259, 275
 Лазерная ангиопластика 383
 — биостимуляция 75, 87
 — микрохирургия живых клеток 81
 — резонансная фотоионизация 409
 — спектроскопия 43, 85, 110, 155, 182, 232, 307, 328, 355
 — терапия 64, 75, 86, 144, 210
 — томография 86, 114, 122, 144, 164, 172
 — хирургия 78, 87, 90
 Лазерный биовиброметр 74, 86, 301
 Лазерный доплеровский измеритель скорости 293
 Лазерный микроанализ 85, 406, 412
 — скальпель 81, 143,
 — флуоресцентный анализ 307
 Лазеры ВКР 250, 251, 253, 269, 286, 287
 — волоконные 79, 85, 285, 287, 288, 308
 — газоразрядные 212
 — импульсные 88, 232, 248, 380
 — инъекционные 241, 246
 — молекулярные 227, 230, 410
 — на ионах металлов 238
 — на красителях 78, 87, 118, 232, 246, 383
 — на неорганических жидкостях 235
 — на парах химических элементов 226

- Лазеры непрерывные 248, 275
— рентгеновские 258
— с оптической накачкой 212, 229
— твердотельные на красителях 239
— твердотельные с диодной накачкой 46, 246
— химические 230
— на центрах окраски 239, 253, 312
— эксимерные 78, 87, 230, 275, 358, 383, 407
- Лейкемия 60, 357
Липиды 51, 186, 192, 402
Липосомы 383
Литотрипсия 88, 231
Лимфоциты 68, 379
Лучевая интенсивность 94, 95, 103
- Макродиагностика** 66, 71, 85
Масс-спектр 407
Масс-спектрометрия 409, 410
Мастопатия 315
Матка 201, 404
Матрица Мюллера (матрица рассеяния) 93, 130
Межмодовая дисперсия ВС 268
Межтканевая термотерапия 75, 86
Меланин 20, 21, 51, 52, 207
Меланинометры 319
Меланома 23, 24, 199, 384
Мембрана клетки 207
Меридиональные лучи 360
Метод ЛАММА 410–412
— добавления-удвоения 189, 192
— интегрирующих сфер 205, 206
— лазерной спекл-визуализации 154, 155
— Монте-Карло 92, 98, 133, 189
— синхронной оптической накачки 253
— сталкивающихся импульсов 254, 255
— тепловой линзы 328–330, 337, 340, 354, 355
- Методы измерения оптических параметров биотканей 189, 191, 193, 195, 197, 199, 201, 203, 205, 207, 209
- Миграция фотонов 105, 158
Микродиагностика 66, 85, 419
Микроспектральный анализ 370
Микроструктурные световоды 288, 289, 305
- Микрофлуориметрия 380, 383, 387, 413,
Микрофоны 333, 343, 347
Миоглобин 403
Многослойная модель ткани 22, 98, 99, 203, 317,
Многопараметрическая цитометрия 71
Многофотонная ионизация 77, 405, 409
Многофотонное возбуждение 77
Модель Кубелки-Мунка 98, 190
Модовый шум ВС 274
Модуляционный метод 105, 201
Монохроматичность 213, 247
Моноциты 379
Мышечная ткань 17, 23, 33, 57, 63, 74, 85, 120, 125, 128, 194, 198, 199, 202, 207–210, 291, 292
- НАДН** 297, 305, 355
Насыщение гемоглобина 111
Нейтрофилы 379
Нелинейные явления в ВС 269
Неоплазия 383, 384
Нерезонансные спектрофоны 341
Нестационарная теория переноса излучения 103, 118,
Нефелометрия 82, 141
Низкокогерентные источники 143, 158, 164, 296, 377
— томографы 85, 86, 143, 297
- Объемное рассеяние** 20, 26
Обратное рассеяние 20, 134, 317
Оксигемоглобин 20, 111
Оксигенация 20, 85, 111
Оксиметры 111, 319
Оптотермическая радиометрия 362
Оптоакустическая спектроскопия 67, 415, 427
— ячейка 334, 336, 339
Оптоакустический детектор 335, 336, 339, 348, 355, 358
— зонд 345, 354
— метод 330, 335, 336, 341
— сигнал 331, 332–336, 339, 341, 342
— спектр 333, 341, 353
— эффект 329, 359
Опτικο-геометрический метод 328

- Оптико-геометрический эффект 329
Оптико-калориметрические методы 307, 328, 350
Оптико-термический метод 328
— эффект 328
Оптическая инъекция 81, 82
Оптическая когерентная томография (ОКТ) 129, 164, 413
Оптическая томография 114, 119, 172, 417, 442
Оптический нерв 202
Оптические генераторы гармоник 251
Оптический пинцет 68
Оптическое просветление 455
Осмотические явления 211
Открытая ячейка 344
Офтальмология 87, 396
- Папилломавирус** 383
Параметр анизотропии рассеяния 35, 95, 127
Параметрический генератор 252, 325
Печень 23, 24, 196, 207, 208
Пищевод 87, 198, 208, 280, 383
Показатель преломления 19, 31, 127, 176
Полисахариды 402
Полная освещенность 95, 101
Полное пропускание 203
Поляризационная нефелометрия 72, 141
Поляризационный нефелометр 72, 141
Поляризованность 213, 217
Почка 196, 208, 407
Предплечье 161, 202
Преломление волн фотонной плотности 105
Приведенный коэффициент рассеяния 30, 35, 36, 96
Принцип работы лазера 210
Производные гематопорфирина 61, 66
Пролетная цитометрия 71
Просветление ткани 76
Простата 198, 199
Пространственная когерентность 143, 215
— корреляция 131, 154
Протопорфирин IX 131, 353
Псориаз 64, 210, 282, 297
Псориатические бляшки 192
ПУФА-терапия 64
- Пьезоэлектрические преобразователи 348
- Рак** 84, 88, 201, 368, 383
Резонансные ячейки 347
Резонаторы Гельмгольца 347
Ретина 143, 203
Ретинобластома 21
Рефлексотерапия 87
Рефлектометры 319
Роговица 17, 28, 33, 129, 323, 376
Роговой слой 22, 297
- Саркома**
Свойства лазерного излучения 212
Селфок-линза 272, 273
Селезенка 23, 199, 207, 209
Сенсибилизация 201, 210
Сердце 196, 208, 383
Синхронизация мод 201, 253, 256
Склера 17, 28, 200, 202, 210
Слезная жидкость 209
Слизистая оболочка бронхов 24
Спекл-интерферометрия 86
Спеклы 145–148, 151, 155
Спектральный анализ 66, 68
Спектроскопия ближнего ИК-диапазона 85
— квазиупругого рассеяния 72, 74
— комбинационного рассеяния
Спектрофоны 341, 352
— газомикрофонные 343
— жидкостные закрытого типа 343
— открытого типа 343
Спектрофотометрические методы 92, 307
Спектрофотометрия 307
Спектры отражения 186, 317, 371
— поглощения 42, 61, 187, 192, 320
— пропускания 136, 315
— рассеяния 138
Спинномозговая жидкость 200, 209
Спонтанные переходы 212
Средний косинус угла рассеяния 95
Статистическое моделирование 100
Стационарная длина ВС 262
Стекловидное тело 209
Степень поляризации 33, 130, 133, 382

- Температура** 50, 52, 224, 328
Теория переноса излучения 94
Тепловая дефлексия 328, 330, 338, 339, 350, 359
Тепловые эффекты 48, 51, 77
Теплопроводность 55, 105, 331, 332, 352, 357
Терагерцовая спектроскопия 182
Терапевтическое окно 21
Термодиффузионная длина 332
Термотерапия 75, 86
Типы фотовоздействий 46
Тирозин 358, 398, 411
Ткани глаза 130, 143, 168
— головы 200, 315
— зубов 105, 383
— легких 24, 67, 105, 207, 313
мозга 132, 402
— молочной железы 23, 26, 310
— мочевого пузыря 281, 371, 388, 404
— прямой кишки 383, 402
— шейки матки 401, 402
Ткань матки
— стенки аорты 36, 66, 131, 195
— стенки мочевого пузыря 389
Томография 86, 119, 122, 129, 164, 172
Транспортная длина 96, 160
Транспортный коэффициент рассеяния 30, 35, 96
Триптофан 21, 43, 66, 137, 358, 398, 404
- Удельная теплоемкость** 48, 329
Удельное затухание ВС 265
Управление оптическими свойствами биотканей 196
Упругое рассеяние 72
Устройства связи ВС 273
- Фазовая функция рассеяния** 29, 94, 204
Фазовые методы 205
Фактор анизотропии рассеяния 29–31, 96, 189, 204
Фенилаланин 43, 192, 398, 402
Фиброаденома 197, 375
Фиброзная ткань 197
Фиброид 201
Флавин 65, 75, 316
- Флуоресцентная спектроскопия** 68, 389
Флуоресцентный микроскоп 382
Флуоресценция 298, 378, 980, 388, 394
Флуорофоры 82, 84, 386
Фокон 270, 271
Фосфолипид 402
Фотоакустическая микроскопия 364
Фотоакустический метод 328
Фотодинамическая терапия 210
Фотосенсибилизатор 61, 62, 318
Фототепловое разрушение 47
Фототерапия 58, 86
Фотохимиотерапия 86, 210
Фотохимические реакции 75
Фталоцианин 60, 64, 66, 75, 86, 388
Функция Грина 100, 125
— распределения выходящего излучения 95
— распределения рассеивающих центров 25, 135, 151, 155
— Хеньи-Гринштейна 95, 133, 204
Фурье-спектрометры 85, 322, 324
Фурье-спектроскопия 70
Фурье-спектроскопия КР
- Хирургия** 78, 87, 88, 90, 91
Хроматическая дисперсия ВС 268
Хромосомы 68, 144, 395
Хромофоры 46, 65, 390
Хрусталик 32, 34, 73, 78, 87, 105, 135–139, 207
- Цитометры** 71, 85
— пролетные 376
Цитоплазма 20, 180, 207, 209
Цитохром 65, 69, 75, 110, 316, 353
Цифровая голографическая микроскопия 171
— интерференционная микроскопия 171
- Числовая апертура** 45, 148, 261, 266, 270, 272, 279
Число возбуждаемых волн световода 262
Четырехпоточковая модель 98
- Ширина полосы ВС** 267
Шлирен-микрофон 348, 349

- Эластин 32, 43, 383, 387, 404
Эмаль зуба 18, 49, 127, 209
Эмиссионная спектроскопия 405, 406
Эмиссионный спектр 406, 407
Эндометрия 404
Эозинофилы 379
Эпидермис 16, 17, 22, 27, 52, 57, 76, 99,
102, 149, 181, 191–194, 202, 204, 317,
357, 358
- Эритема 319
Эритемометр 292, 319
Эритроцит 16
Эффект кавитации 81
- Я**дро клетки 20, 180, 207
Ядрышко клетки 180
Яичник 90, 404
Яркость 117, 213, 218, 313