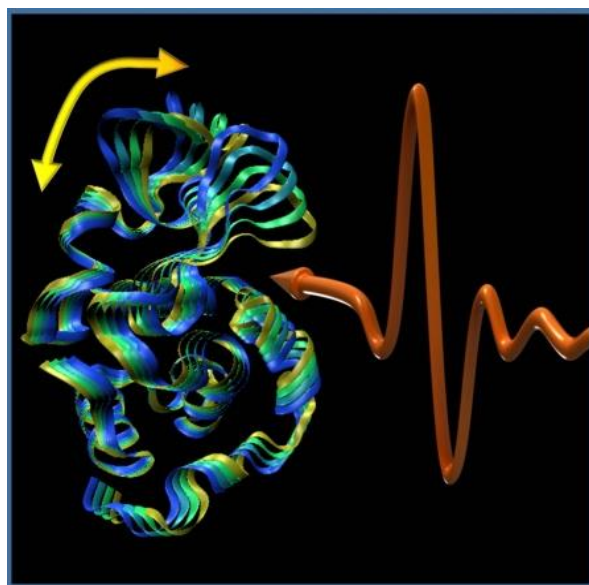


**О.А. Смолянская, А.В. Возианова,  
О.В. Кравценюк, М.К. Ходзицкий**

**БИОФОТОНИКА.  
МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ПО  
ЛАБОРАТОРНОМУ ПРАКТИКУМУ**



**Санкт-Петербург  
2018**

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

**О.А. Смолянская, А.В. Возианова,  
О.В. Кравценюк, М.К. Ходзицкий**

**БИОФОТОНИКА**

**МЕТОДИЧЕСКОЕ ПОСОБИЕ ПО  
ЛАБОРАТОРНОМУ ПРАКТИКУМУ**

РЕКОМЕНДОВАНО К ИСПОЛЬЗОВАНИЮ В УНИВЕРСИТЕТЕ ИТМО  
по направлению подготовки 12.04.03. Фотоника и оптоинформатика  
в качестве учебного пособия для реализации основных профессиональных  
образовательных программ высшего образования магистратуры

**Санкт-Петербург**

 **УНИВЕРСИТЕТ ИТМО**

**2018**

Смолянская О.А., Возианова А.В., Кравценюк О.В., Ходзицкий М.К. Биофотоника. Методическое пособие по лабораторному практикуму. – СПб: Университет ИТМО, 2018. – 49 с.

**Рецензент:** Порозов Ю.Б., кандидат медицинских наук, доцент, факультет инфокоммуникационных технологий, Университет ИТМО

### **Аннотация**

Дисциплина «Биофотоника» относится к профессиональным дисциплинам учебного плана магистерской программы «Биофотоника» направления подготовки 12.04.03 «Фотоника и оптоинформатика» и включает лекционные занятия и выполнение лабораторных работ по биофотонике. При освоении дисциплины главное внимание уделяется лабораторному практикуму, который знакомит студентов с методами измерения оптических характеристик и свойств биотканей, а также механизмами влияния излучения на биообъекты.

**Университет ИТМО** – ведущий вуз России в области информационных и фотонных технологий, один из немногих российских вузов, получивших в 2009 году статус национального исследовательского университета. С 2013 года Университет ИТМО – участник программы повышения конкурентоспособности российских университетов среди ведущих мировых научно-образовательных центров, известной как проект «5 в 100». Цель Университета ИТМО – становление исследовательского университета мирового уровня, предпринимательского по типу, ориентированного на интернационализацию всех направлений деятельности.

© Университет ИТМО, 2018

© Смолянская О.А., Возианова А.В., Кравценюк О.В., Ходзицкий М.К., 2018

## СОДЕРЖАНИЕ

<i>Лабораторная работа № 1</i> Исследование оптических свойств биологического объекта в терагерцевом диапазоне частот методом пропускания.	4
<i>Лабораторная работа № 2</i> Измерение оптических характеристик биологических тканей с помощью интегрирующей сферы.	14
<i>Лабораторная работа № 3</i> Исследование фотоабляции и эффективности лазерной обработки биологических тканей.	22
<i>Лабораторная работа № 4</i> Исследование влияния низкоинтенсивного импульсного терагерцевого излучения на биологические клетки.	29
<i>Лабораторная работа № 5</i> Экспериментальное наблюдение распространения излучения от непрерывного синусоидально-модулированного источника в сильно рассеивающей среде.	36
<i>Лабораторная работа № 6</i> Измерение коэффициента пропускания биотканей с помощью терагерцевого фотометра.	42

## Лабораторная работа № 1

### Исследование оптических свойств биологического объекта в терагерцевом диапазоне частот методом пропускания

**Цель работы:** получения оптических свойств биологического объекта на терагерцевом спектрометре в режиме на пропускание.

**Объект исследования:** спектры поглощения, диэлектрическая проницаемость и коэффициент преломления биологического объекта в терагерцевом диапазоне частот.

#### **Задачи, решаемые в работе:**

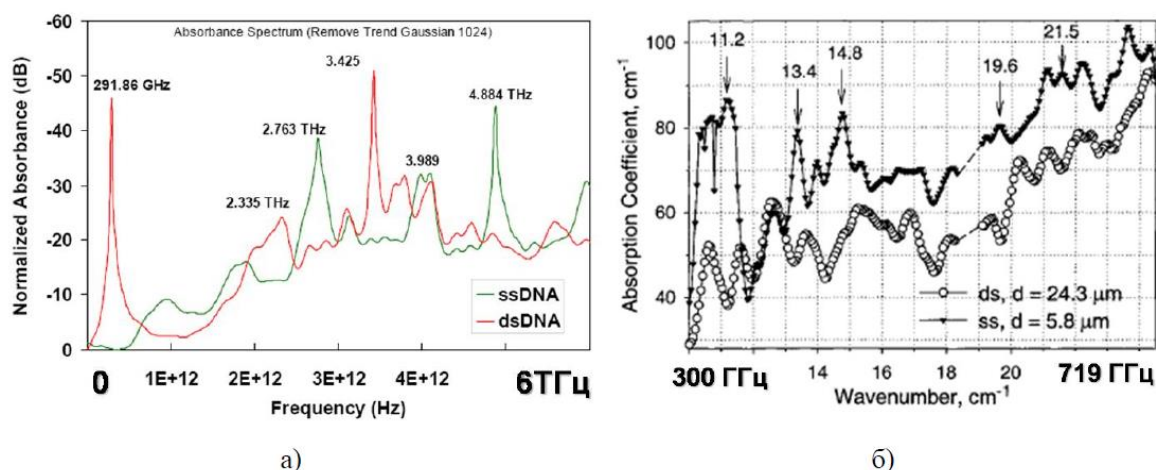
1. Ознакомление с методиками измерения оптических свойств биологического объекта методом на пропускание.
2. Ознакомление с конструкцией терагерцевого спектрометра в режиме на пропускание.
3. Изучение алгоритмов расчета показателя преломления  $n$  и других оптических свойств.

### Сведения из теории

Терагерцевый (ТГц) диапазон частот соответствует колебательно-вращательным спектрам квантовых переходов в молекулах воды, колебательным модам водородных связей, спектральным частотам низкоэнергетических квантовых состояний сложных биологических макромолекул, прежде всего белков и нуклеиновых кислот, чья конформационная устойчивость, пространственная организация и функциональная активность отдельных доменов зависит от степени гидратации и устойчивости слабых водородных связей [1]. К терагерцевому диапазону частот относятся спектры поглощения и других биологически активных соединений, причем не только отдельных молекул, но и колебательных переходов в местах межмолекулярного взаимодействия.

Основная часть поглощенного живыми тканями терагерцевого излучения приходится на молекулы воды [2,3]. Это происходит благодаря тому, что молекулы воды образуют максимальное количество водородных связей как между собой, так и с многочисленными растворенными и гидратированными соединениями. Это позволяет образовывать сложные динамические цепочки и сети из диполей, которые сообща отвечают на изменения среды. Межмолекулярные колебания макроскопической сети дипольных молекул воды обладают собственным вращательно-колебательным спектром с частотой 5,6 ТГц [3]. Кроме того, медленная релаксация больших агрегаций, которые молекулы воды образуют с помощью водородных связей, обуславливает сильные межмолекулярные колебания частотой 1,5 ТГц [3]. Все это делает водную среду наиболее эффективным хромофором для терагерцевого излучения.

Спектр молекулы ДНК в терагерцевом диапазоне частот являлся предметом исследования многих работ. Результаты изучения спектров синтезированных одноцепочечных и двухцепочечных образцов ДНК показали, что, несмотря на плохое разрешение используемого ТГц спектрометра, полученные спектры образцов существенно различаются (рис.1а). Авторы применили методы ТГц спектроскопии для регистрации спектра молекулы ДНК в растворе с водой (рис.1б). В результате исследований были найдены линии поглощения ДНК [4].



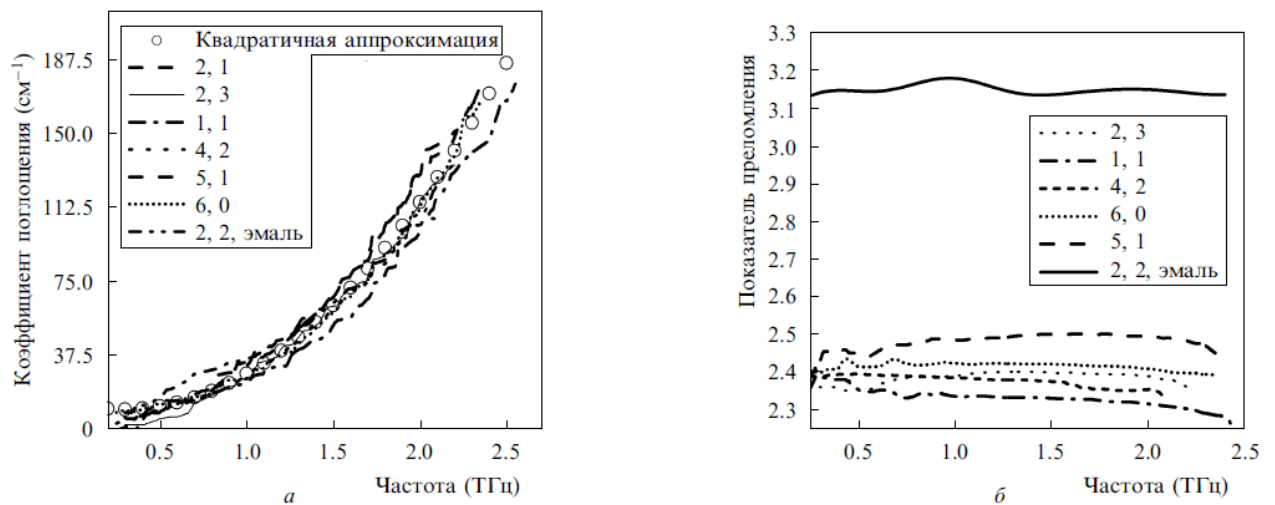
**Рисунок 1** – Спектр одно- и двуцепочечной молекулы ДНК, ss и ds соответственно, полученный с разным спектральным разрешением

Терагерцевое излучение перспективно для применений в спектроскопии и медицине. Малые органические молекулы имеют характеристические линии в терагерцевом диапазоне частот. Большие молекулы и ткани имеют значительное поглощение, практически линейно возрастающее с частотой. Кроме того, неоднородности размером менее 0,1 мм, приводящие к сильному рассеянию в видимой и ближней инфракрасной областях спектра, не дают значительного рассеяния в терагерцевом диапазоне [5]. Использование сверхкоротких импульсов позволяет исследовать широкий диапазон частот за одно измерение, а также достичь высокого разрешения по времени.

Исследования ряда биологических тканей показывают их высокое и сравнимое между собой поглощение, но довольно значительные различия в показателях преломления в терагерцевом диапазоне частот. Эта особенность позволяет измерять амплитуды импульсов, отраженных от границ различных слоев ткани, с помощью импульсного терагерцевого спектрометра.

Представленные на рис. 2 результаты измерений важны для развития терагерцевой томографии зубов, в частности, для диагностики ряда заболеваний, связанных с изменением содержания воды в тканях зуба, для

отслеживания диффузии лекарственных препаратов и движения зубного ликвора *in vivo*. Мониторинг патологических изменений в тканях зуба требует знания основных оптических характеристики различных зубных тканей в терагерцевом диапазоне частот. В результате исследований обнаружено существенное различие в показателях преломления эмали и дентина. При этом спектры поглощения для разных образцов без патологии практически совпадали. При этом дисперсия показателя преломления имеет небольшие различия в разных участках зуба. Усредненный показатель преломления эмали существенно больше, чем для дентина.



**Рисунок 2** – Спектры поглощения и преломления различных участков зуба. Первая цифра соответствует номеру зуба, вторая - номеру облучаемого участка зуба.

### Методика расчета

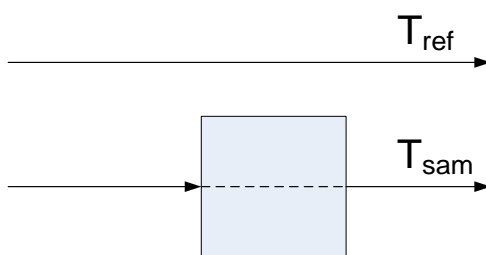
В импульсной терагерцевой схеме волновая форма терагерцевого импульса  $E(t)$  регистрируется путем получения выборки значений поля терагерцевого импульса в различные моменты времени [4]. Ультракороткий лазерный импульс расщепляется на импульс накачки и зондирующий импульс, которые используются, соответственно, для генерации и детектирования терагерцевых импульсов. Зондирующий лазерный импульс взаимодействует с определенным участком терагерцевого импульса на детекторе. Терагерцевое поле регистрируется как функция временной задержки зондирующего импульса. Преобразование Фурье от волновой формы позволяет получить спектр терагерцевого импульса:

$$E(\omega) = A(\omega) \cdot e^{-i\varphi(\omega)} = \int_{-\infty}^{\infty} E(t) \cdot e^{-i\omega t} \cdot dt. \quad (1)$$

Терагерцевый спектр (1) принципиально является комплексной величиной. Терагерцевый импульс обычно содержит всего несколько

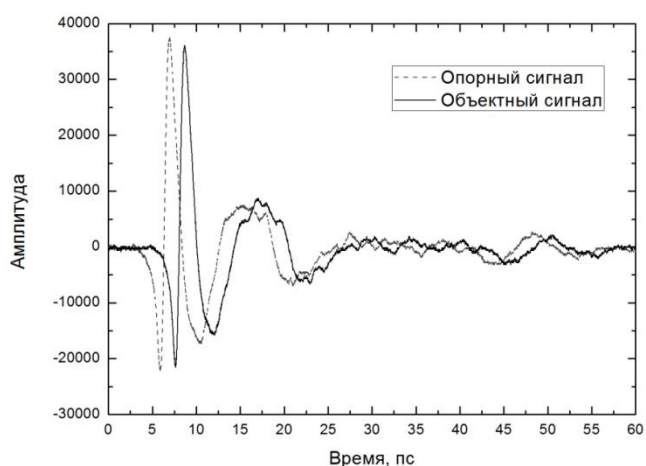
осцилляций поля, поэтому его спектр может простираться более чем на октаву (в спектральном интервале, равном одной октаве, наибольшая частота в два раза превосходит наименьшую). Ширина спектра излучения импульсного терагерцевого источника может составлять величину от 0,1 ТГц до 100,0 ТГц и даже более. Записывая волновую форму терагерцевого импульса после его взаимодействия с некоторой мишенью и затем, вычисляя спектр по формуле (1), можно получить спектральную характеристику мишени в диапазоне частот, присутствующих в спектре импульса. В связи с тем, что получение спектра происходит путем регистрации волновой формы (осциллограммы) импульса, данный метод получил название терагерцевой спектроскопии во временной области (в англоязычной литературе – Terahertz Time-Domain Spectroscopy, THz-TDS).

Как видно из рис. 3, в данном способе применяются измерения прошедшего сигнала как через объект, так и через воздух (оно выступает в роли опорного сигнала).



**Рисунок 3** – Метод, использующий опорный и объектный сигналы пропускания.

На рис. 4 показаны сигналы, прошедшие через воздух и образец. Отчетливо видно, что при прохождении через объект импульс выходит с временной задержкой и ослабленной интенсивностью.



**Рисунок 4** – Пример временных форм объектного и опорного сигналов.

Из этих сигналов можно получить коэффициент поглощения  $\alpha$ , оптическую глубину проникновения  $\delta$ , комплексный показатель



преломления  $n$ , а также диэлектрическую проницаемость  $\varepsilon$  при помощи следующих формул:

$$\alpha(f) = \frac{2}{d} \ln \frac{A_R(f)}{A_S(f)}, \quad (2)$$

$$\delta(f) = \frac{1}{\alpha(f)}, \quad (3)$$

$$n_{re}(f) = 1 + \frac{[\phi_S(f) - \phi_R(f)] \cdot c}{2\pi \cdot f \cdot d}, \quad (4)$$

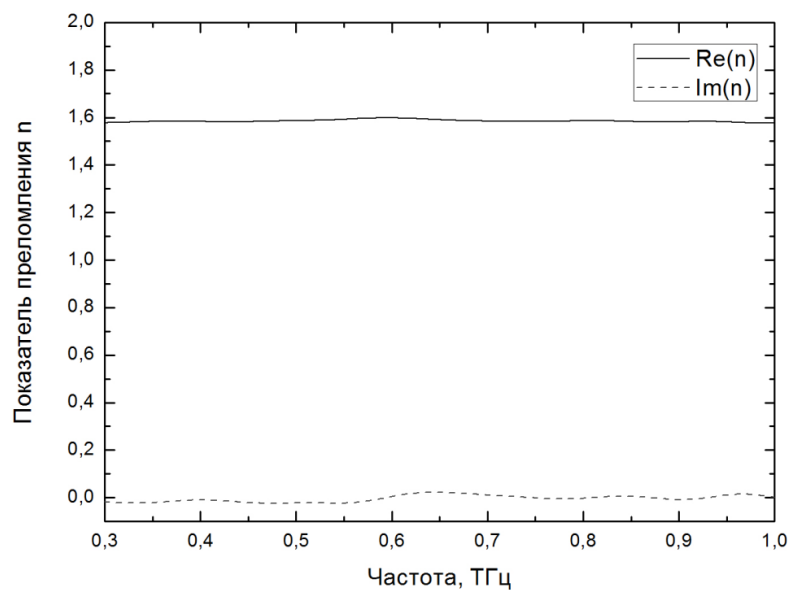
$$n_{im}(f) = \frac{\lambda \cdot \alpha(f)}{4\pi}, \quad (5)$$

$$\varepsilon_{re}(f) = n_{re}^2(f) - n_{im}^2(f), \quad (6)$$

$$\varepsilon_{im}(f) = 2n_{re}(f) \cdot n_{im}(f), \quad (7)$$

где  $\alpha$  - коэффициент поглощения [ $\text{м}^{-1}$ ],  $\varepsilon$  - диэлектрическая проницаемость ( $re$  - действительная,  $im$  - мнимая),  $n$  - показатель преломления,  $\delta$  - глубина проникновения [ $\text{м}$ ],  $A_R$  - амплитуда опорного сигнала,  $A_S$  - амплитуда объектного сигнала,  $\phi$  - фаза сигнала,  $d$  - толщина объекта [ $\text{м}$ ],  $c$  - скорость света в вакууме,  $f$  - частота [ $\text{Гц}$ ].

Дисперсии амплитуд и фаз, необходимые для расчета, получаются из сигнала путем преобразования Фурье. В данной лабораторной работе их можно получить, воспользовавшись программой Spectrina. Результатом будут являться дисперсии показателя преломления (действительная и мнимая части), коэффициент поглощения  $\alpha$ , диэлектрическая проницаемость  $\varepsilon$  (действительная и мнимая части), показатель преломления  $n$  (пример – рис. 5), глубина проникновения  $\delta$ .



**Рисунок 5** – Пример зависимости показателя преломления от частоты.

На общую точность измерения оптических свойств биологического объекта влияет точность измерения толщины объекта, тип, ширина и позиционирования оконной функции при выделении сигнала во время преобразования Фурье.

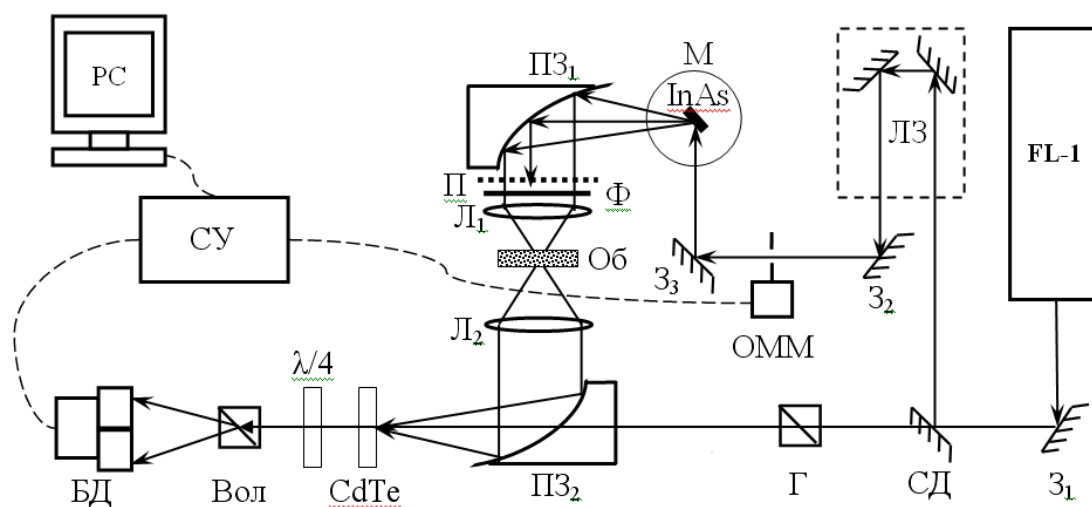
### **Экспериментальная установка**

В настоящей работе используется экспериментальная установка (рис. 6), генерирующая широкополосное терагерцевое импульсное излучение фотопроводящей антенной (нелегированный кристалл InAs) при облучении ее фемтосекундными импульсами лазера FL-1 с активной средой калий-иттриевый вольфрамат с примесью иттербия, Yb:KYW (Solar, Россия;  $\lambda = 1040 \pm 10$  нм,  $t_{\text{имп}} = 200$  фс,  $f = 70$  МГц,  $P \geq 1$  Вт). Схема универсального терагерцевого спектрометра представлена на рис. 6. Генерируемое излучение проходит через фильтр из тефлона, который отсекает длины волн в диапазоне меньше 50 мкм, а далее через образец, который обладает некоторым амплитудно-фазовым пропусканием. Образец фиксируется перпендикулярно оптической оси в фокальной плоскости, и при прохождении сквозь него происходит дифракция терагерцевого излучения. Электрооптическое детектирование осуществляется с помощью четвертьволновой пластины, призмы Волластона, балансного фотодетектора и синхронного усилителя.

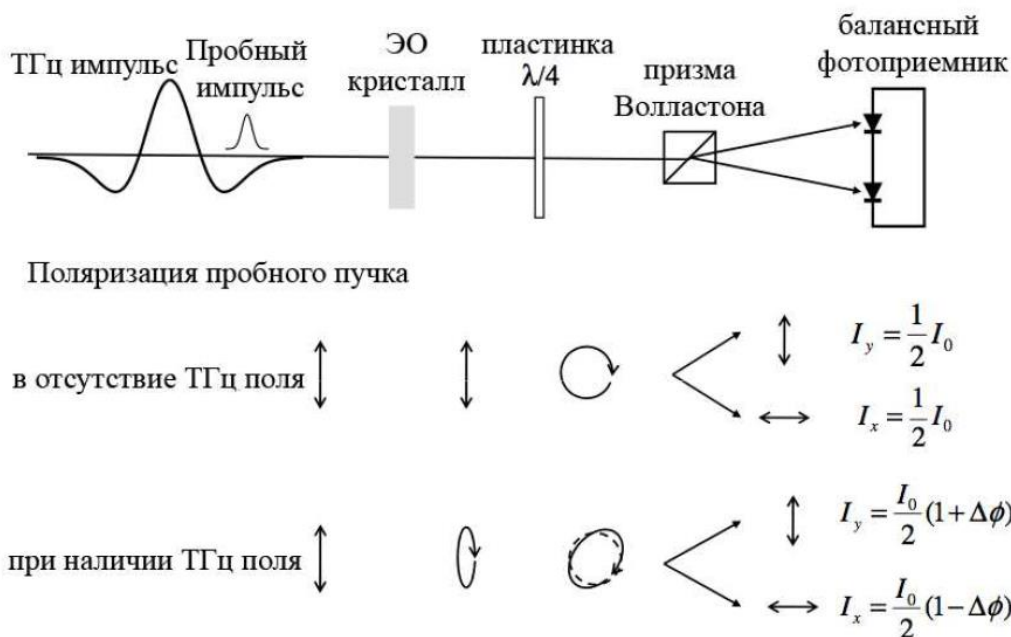
Электрооптическое детектирование позволяет измерить временной профиль терагерцевого импульса, тем самым позволяя с высокой точностью определить не только его амплитуду, но и фазу. Механизм электрооптического детектирования использует электрооптический эффект Поккельса. Статическое электрическое поле наводит двулучепреломление в нелинейной среде, пропорциональное амплитуде приложенного поля. Соответственно, амплитуду поля можно получить, измеряя двулучепреломление. На рис. 7 показана стандартная схема электрооптического детектирования наведенного терагерцевым излучением двулучепреломления. В идеале групповая скорость оптического излучения близка к фазовой скорости терагерцевого излучения, тогда оптический импульс по мере распространения по электрооптическому кристаллу будет подвергаться воздействию постоянного электрического поля. При коллинеарном распространении в кристалле линейная поляризация пробного пучка изменяется до эллиптической. С помощью четвертьволновой пластинки линейная поляризация переводится в круговую, затем с помощью призмы Волластона состояния поляризации разделяются и попадают на балансный детектор. Из рис. 7 видно, что разность интенсивностей на диодах балансной схемы пропорциональна полю терагерцевого излучения. Двулучепреломление, наводимое полем терагерцевого излучения, максимально, когда обе поляризации (и оптического пробного пучка, и

терагерцевого пучка) параллельны оси ориентированного кристалла. Нелинейная поляризация на оптической частоте ортогональна поляризации падающего излучения, что приводит к тому, что линейная поляризация пробного импульса преобразуется в эллиптическую при распространении через кристалл CdTe совместно с излучением терагерцевого диапазона частот. Таким образом, сигнал с балансного фотодетектора позволяет получить значение амплитуды терагерцевого поля.

Отфильтрованный и усиленный сигнал передается на компьютер через цифрового вольтметра. Спектральное разрешение при измерениях составляет около 10 ГГц для режима на пропускание терагерцевого излучения. Управление установкой реализовано в программной среде NI LabVIEW, посредством которой проводится контроль над временной задержкой пробного фемтосекундного импульса и процессом измерения, а также осуществляется регистрация временной формы терагерцевого импульса. Получаемое на данной экспериментальной установке терагерцевое излучение имеет следующие параметры: спектральный диапазон от 0,1 до 2,0 ТГц, средняя мощность около 0,3 мкВт, длительность импульса 2,7 пс. Наибольшая энергия распределена в интервале от 0,1 до 0,6 ТГц с максимумом вблизи 0,2 ТГц.



**Рисунок 6** – Схема установки для измерения отраженного от объекта сигнала. FL-1 – фемтосекундный лазер на кристалле калий-иттриевого вольфрамата, активированного иттербием (Yb:KYW), генерирующий фемтосекундные импульсы; Ф, П – набор фильтров из тефлона, не пропускающих ИК диапазон волн; СД – светоделитель; ЛЗ – оптическая линия задержки; З – зеркала; Об – исследуемый образец; Вол – призма Волластона; CdTe – электрооптический кадмий-теллурический кристалл; БД – балансный детектор; СУ – синхронный усилитель; PC – персональный компьютер; ОАП – опто-акустический приемник; Г – призма Глана; ПЗ – параболическое зеркало; ОММ – оптико-механический модулятор.



**Рисунок 7** – Электрооптическое детектирование: схема и состояния поляризации, соответствующие наличию и отсутствию ТГц поля

### Порядок выполнения работы

1. Измерить толщину образцов с помощью микрометра (см. примечание и рис. 7).
2. Получить сигналы пропускания на экспериментальной установке. Требуется записать сигналы пропускания для трех ситуаций:
  - 2.1. опорный сигнал (в экспериментальной схеме нет образца);
  - 2.2. объектный сигнал образца.
3. Получить из записанных сигналов спектры амплитуд и фаз при помощи программы Spectrina:
  - 3.1. запустить программу;
  - 3.2. открыть в программе файлы сигналов;
  - 3.3. отделить сигнал от шумов:
    - 3.3.1. выбрать гауссовы оконные функции;
    - 3.3.2. при помощи граф «Центр окна» и «Ширина окна», а также кнопки «Примерить» убедиться, что выделены пики сигнала;
  - 3.4. нажать кнопку «Расчет»;
  - 3.5. результаты скопируются в папку Calculation, которая появится в папке с выбираемыми файлами.  
*freq.txt* – значения частотной шкалы, Гц,  
*ampl\_1.txt* – частотная дисперсия значений амплитуд,  
*phase\_1.txt* – частотная дисперсия значений фаз.

*Примечание:* как измерить толщину образца с помощью микрометра. Указателем при отсчете по шкале 2 стебля служит торец барабана, а продольный штрих 1 является указателем для круговой шкалы 3.

Пронумерованная шкала стебля показывает количество миллиметров, а его дополнительная шкала служит для подсчета половин миллиметров.

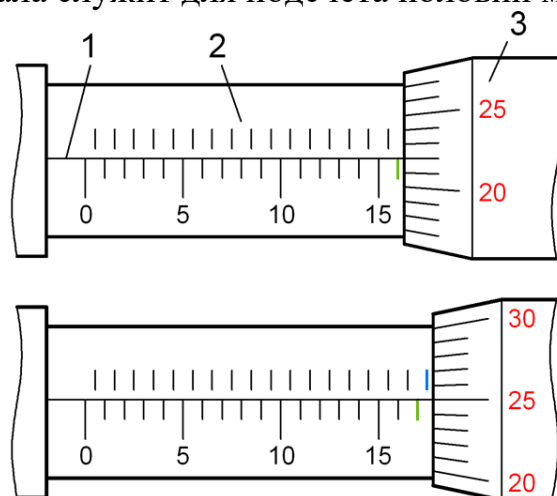


Рисунок 8 – Микрометр

Отметим последний полностью открытый барабаном штрих миллиметровой шкалы стебля. Его значение составляет целое число миллиметров, и на рис. 8 он обозначен зеленым цветом. Если правее этого штриха имеется открытый штрих дополнительной шкалы (выделен голубым), то нужно прибавить 0,5 мм к полученному значению. При отсчете показаний круговой шкалы 3 в расчет берут то ее значение, которое совпадает с продольным штрихом 1. Таким образом, на рис. 8 показания прибора составляют:

$$16 + 0,22 = 16,22 \text{ мм.}$$

$$17 + 0,5 + 0,25 = 17,75 \text{ мм.}$$

Распространенной ошибкой является случай, когда неверно учитывают (или не учитывают) величину 0,5 мм. Это связано с тем, что ближайший к барабану штрих дополнительной шкалы может быть открыт частично.

### Обработка результатов измерений

1. Для расчета результатов ( $n_{re}$ ,  $n_{im}$ ,  $\alpha$ ,  $\varepsilon_{re}$ ,  $\varepsilon_{im}$ ,  $n$ ,  $\delta$ ) используйте указанные в теоретической части формулы.
2. Результат выполнения работы представьте в наглядном развернутом виде. Удобнее всего производить расчеты в программе Origin.
3. Проанализируйте результат и сделайте выводы.

### Вопросы к лабораторной работе

1. Какие преимущества терагерцевого диапазона частот используются для спектроскопии биологических объектов?
2. Почему основная часть поглощенного живыми тканями терагерцевого излучения приходится на молекулы воды?

3. Что является наиболее сильным хромофором при поглощении терагерцевого излучения в биологических тканях?
4. Какие образцы подходят для измерения методом на пропускание, а какие не подходят?
5. Почему зарегистрированный объектный сигнал сдвинут относительно опорного, а также имеет более слабый максимум?
6. Как повлияет на результат неправильно измеренная толщина образца, если ее значение по ошибке стало больше или меньше?
7. Как рассчитываются оптические свойства объекта в терагерцевом диапазоне частот?
8. Как осуществляется генерация импульсного терагерцевого излучения в спектрометре в режиме на пропускание?
9. Как происходит электрооптическое детектирование терагерцевого излучения?
10. Какие параметры имеет терагерцевое излучение, генерируемое на данной экспериментальной установке?

### **Список литературы**

- [1] Globus T.R., Woolard D.L., Khromova T. and et.al. THz-spectroscopy of biological molecules // *J. Bio. Phys.* – 2003. – V. 29. №2. – P. 89-100.
- [2] Ольшевская Ю.С., Козлов А.С., Петров А.К. и др. Влияние терагерцевого (субмиллиметрового) лазерного излучения на проницаемость клеточных мембран // *Вестник НГУ.* – 2010. – Т. 5. (4). – С. 177-181.
- [3] Olshevskaya, J. S., Ratushnyak, A. S., Petrov, A. K., Kozlov, A.S., Zapara, T. A. Effect of terahertz electromagnetic waves on neurons systems // *Proceedings of the International Conference in Computational Technologies in Electrical and Electronics Engineering «IEEE Region 8 SIBIRCON 2008»*, – 2008, – P. 210–211.
- [4] Rahman A., Stanley B., Rahman A.K. Ultrasensitive label-free detection and quantitation of DNA hybridization via terahertz spectrometry // *Proceedings of SPIE*, – 2010, – Vol.7568, – P. 756810-1.
- [5] Назаров М.М., Шкуринов А.П., Кулешов Е.А., Тучин В.В. Терагерцевая спектроскопия биологических тканей // *Квантовая электроника*, – 2008, – V. 38 (7), – с. 647-654.
- [6] Son, J. H. *Terahertz biomedical science and technology* - CRC Press, 2014.
- [7] Zhang, X. C., & Xu, J. *Introduction to THz wave photonics* - New York: Springer, 2010.

## Лабораторная работа № 2

# Измерение оптических характеристик биологических тканей с помощью интегрирующей сферы

**Цель работы:** освоение методики измерения оптических характеристик биологических объектов с помощью интегрирующей сферы.

**Объект исследования:** тонкая рассеивающая биологическая ткань.

**Задачи, решаемые в работе:**

1. Ознакомление с краткой теорией спектроскопии рассеивающих сред.
2. Экспериментальное определение оптических характеристик образца.

### Сведения из теории

Биологические ткани являются оптически неоднородными поглощающими средами [1]. За счет многократного рассеяния и поглощения лазерный пучок уширяется и затухает при распространении значительной доли излучения в обратном направлении (обратное рассеяние). Существует много методов определения оптических параметров биотканей. Эти методы можно разделить на два больших класса: прямые и косвенные.

**Прямые методы** имеют строгие ограничения на свойства используемого в эксперименте образца, для того чтобы согласовать условия эксперимента с предположениями, сделанными для получения точного решения. Например, прямой метод, используемый С. Флоком и др. требует очень тонких образцов, в которых многократное рассеяние игнорируется [2]. В прямых методах оптические свойства определяются фактически на основании закона Бугера-Бера. Прямые методы являются, например, измерения пропускания без рассеяния, измерения эффективного коэффициента ослабления и фотометрические измерения фазовой функции однократного рассеяния. Прямые методы не зависят от какой-либо модели вычисления оптических параметров и результатов измерений. Двумя оптическими характеристиками, не зависящими от модели, являются суммарный коэффициент ослабления и эффективный коэффициент ослабления. *Суммарный коэффициент ослабления* получают согласно закону Бугера-Бера из измерений пропускания без рассеяния. Для измерений используют тонкие слои образца. На результаты оказывают сильное влияние следующие факторы: геометрия луча, свойства образца, схема регистрации и многократное отражение на границах. Идея экспериментов проста, но сложна в реализации из-за проблем разделения рассеянного света в направлении распространения светового луча и нерассеянной части излучения. *Эффективный коэффициент ослабления* или эффективная глубина проникновения определяется из измерения интенсивности света внутри ткани. Это самый простой и наиболее часто

измеряемый параметр. При этом используются оптоволоконные детекторы, которые должны располагаться внутри диффузной области облучаемых объемных образцов вдали от источников света и границ. Это важно, так как в противном случае ориентация волокна по отношению к падающему излучению и величина числовой апертуры волокна будут вносить ошибки в результаты измерения.

**Косвенные методы измерения.** Получение оптических параметров рассеивающих образцов основано, как правило, на использовании непрямых методов. При этом параметры рассчитываются из измеряемых величин (например, полного пропускания, отражения и коллимированного пропускания) на основе теоретической модели распространения света. В результате полученные оптические параметры зависят не только от результатов измерения, но и от выбранной модели распространения света в образце. Косвенные (непрямые) методы снижают типовые ограничения, но требуют аппроксимаций, которые часто являются неверными для исследуемых образцов (например, почти изотропное рассеяние или отсутствие внутреннего отражения на границах образца). Непрямые методы требуют использования теоретической модели распространения света в образце, т.е. требуют наличия выражений, связывающих оптические свойства объекта и измеряемые величины пропускания и отражения. Теория, используемая в косвенных методах, обычно попадает в одну из трех категорий: закон Бугера-Бера, Кубелка-Мунка или диффузионное приближение. Непрямые методы можно разделить на *итерационные* и *неитерационные*. Неитерационные методы используют уравнения, в которых оптические свойства явно выражены через измеряемые величины, например модель Кубелки-Мунка. В непрямых итерационных методах оптические свойства не явно связаны с измеряемыми величинами. Значения оптических параметров итерируются до тех пор, пока рассчитанные значения отражения и пропускания не совпадут с результатами измерений. Закон Бугера-Бера используют для получения параметров слабо рассеивающих сред. При этом пренебрегают рассеянием, кроме того, он не подходит для толстослойных образцов тканей. Использование метода Кубелка-Мунка оправдано только в случаях, не требующих высокой точности результатов. Существуют вариации метода Кубелка-Мунка. В одной из них используются расчеты коэффициентов поглощения и рассеяния Кубелки-Мунка из результатов измерений диффузного отражения и пропускания при диффузном освещении. Применение метода довольно ограничено, так как достаточно сложно найти хороший источник диффузного освещения. Второй вариант использует определение коэффициентов поглощения, рассеяния и анизотропии рассеяния из измерений диффузного пропускания и отражения с использованием соотношений, полученных Ван Гемертом. Сначала рассчитывают коэффициенты Кубелки-Мунка, затем переводят их



в транспортные коэффициенты уравнения переноса, далее, объединяя с измерениями пропускания без рассеяния, получают три оптических параметра (коэффициент поглощения  $\mu_a$ , коэффициент рассеяния  $\mu_s$  и фактор анизотропии рассеяния  $g$ ). Именно эта методика расчетов используется в методе измерений с помощью интегрирующей сферы. Ограничения для использования метода те же самые. Существуют выражения, позволяющие учесть несогласования показателя преломления на границах. Методы, основанные на диффузионном приближении или подобной аппроксимации, являются более точными, чем метод Кубелка-Мунка. Методы, основанные на диффузионном приближении, включают в себя импульсную фототепловую радиометрию, спектроскопию с разрешением по времени и т.д. Эти методы остаются популярными, потому что они удобны, имеют относительно малые ограничения на тип образца, и поддаются аналитической обработке. Однако диффузионное приближение предполагает, что внутренняя светимость почти изотропна, и, кроме того, не подходит для тех случаев, когда рассеяние сопоставимо с поглощением. Метод инверсного добавления-удвоения был предложен Ван де Хюлстом для решения уравнения переноса излучения в случае плоской геометрии образца. Преимущества удваивающего метода состоят в том, что требуется только интегрирование по углу, физическая интерпретация результатов может быть выполнена на каждом шаге. Метод эквивалентен для изотропного и анизотропного рассеяния, и результаты получены для всех углов падения, используемых в интегрировании. Недостатки метода заключаются в том, что он является:

- а) относительно медленным для вычисления распределения интенсивности излучения внутри образца;
- б) подходит для многослойной геометрии только при однородном облучении поверхности образца;
- в) необходимо, чтобы каждый слой имел однородные оптические свойства.

Для определения оптических свойств с использованием только отражения и пропускания знание распределения интенсивности излучения внутри образца не нужно, поэтому ограничением (а) можно пренебречь. Ограничения (б) и (в) влияют на геометрию образца, образцы должны быть равномерно освещены и однородны. Движение фотонов в рассеивающем образце определяется его собственными оптическими параметрами: коэффициентом поглощения  $\mu_a$ , коэффициентом рассеяния  $\mu_s$  и фактором анизотропии рассеяния  $g$ . В противоположность собственным параметрам, наблюдаемые параметры, такие как коэффициент отражения  $R$ , пропускание  $T$  и распределение света внутри образца  $\Psi$ , могут изменяться в зависимости от геометрических факторов, таких как толщина, граничные условия поверхностей (например, воздух / ткань, вода / ткань), угол

падения излучения, форма падающего пучка, несмотря на постоянство собственных оптических свойств.

В данной работе используется метод определения оптических характеристик среды с помощью интегрирующей сферы. *Интегрирующей сферой* называется полая внутри сфера достаточно большого диаметра (размер выбирается в зависимости от качества внутреннего покрытия, мощности источника, размеров отверстий для образцов и детектора), покрытая изнутри веществом с альбедо близким к единице. Это означает, что внутренняя поверхность сферы представляет собой практически идеальный диффузный отражатель. Внутри сферы через входное отверстие попадает входной поток излучения, который служит для измерения пропускания рассеивающих образцов, если образец перекрывает входное отверстие. Если образец расположен в том месте поверхности сферы, на которое падает входящий световой поток, то речь идет об измерении спектров диффузного отражения. При помещении образца в центр сферы, на ее поверхность попадает как излучение, рассеянное от передней грани образца, так и прошедшее через образец. В результате суммарная освещенность поверхности образца уменьшается пропорционально излучению, поглощенного в образце, и становится возможным измерение полного поглощения. Таким образом, изменяя положение исследуемого образца, с помощью интегрирующей сферы возможно исследование различных оптических параметров исследуемого объекта. Измерение освещенности внутренней поверхности сферы осуществляется при помощи фотоприемника, помещенного за специальным отверстием на стенке сферы. Данный метод оказался наиболее предпочтительным, так как он не требует дорогостоящего оборудования, сложных расчетов или ресурсоемкого моделирования, но дает удовлетворительную точность измерения рассеивающих свойств образца.

### **Экспериментальная установка**

Целью эксперимента является исследование рассеивающих свойств биологической ткани полупроводниковым лазером с рабочей длиной волны 980 нм. Для этого эксперимента используется интегрирующая сфера (напечатанная на 3D принтере) с внутренним диаметром 190 мм, покрытая изнутри титановыми белилами.

На рис. 1 изображена схема проведения эксперимента. Установка состоит из источника излучения, линзы для фокусировки излучения на образце, интегрирующей сферы и приемника излучения для опытов (а) и (б), и держателя образца для опыта (в).

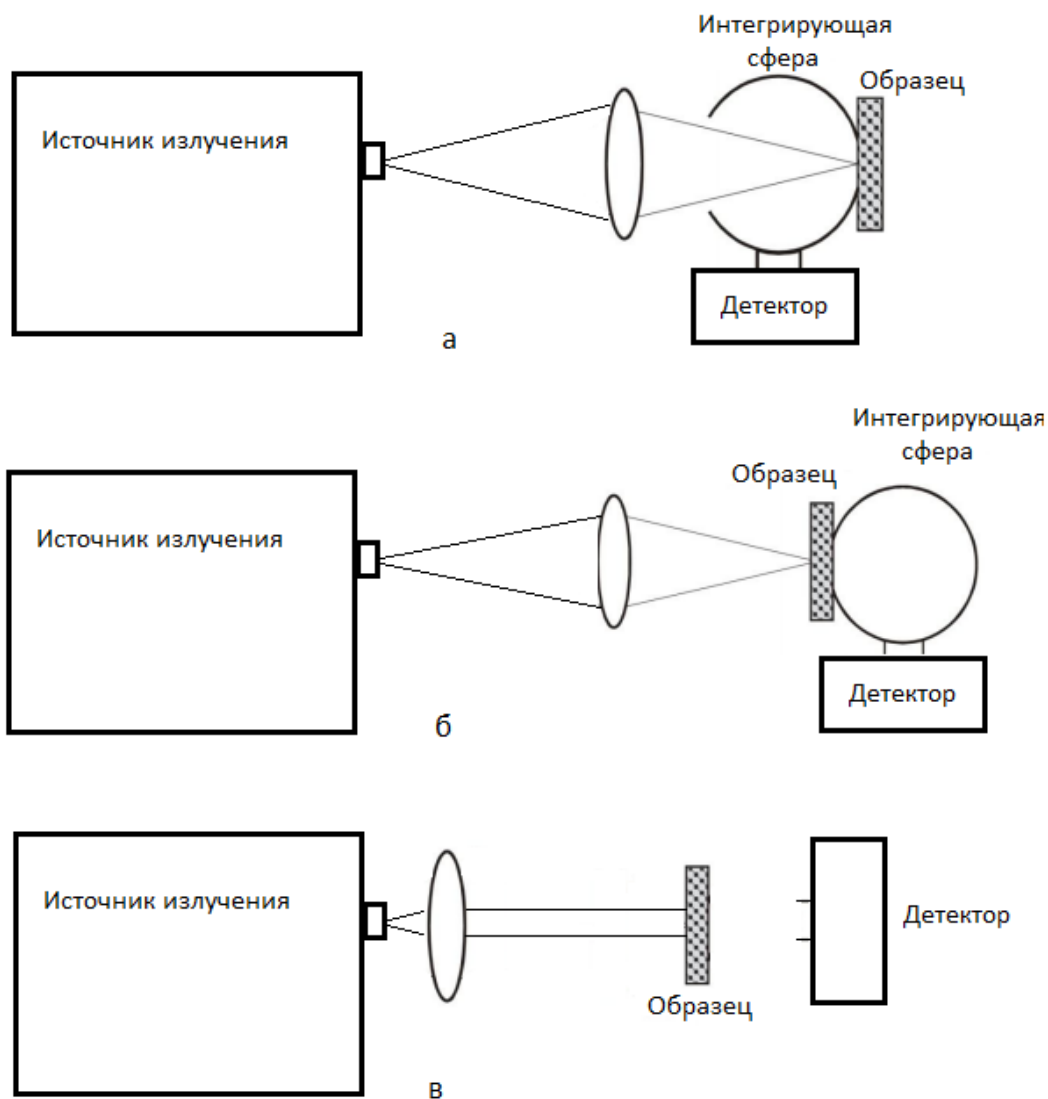


Рисунок 1 – Схема установки для измерения (а) диффузного отражения, (б) диффузного пропускания и (в) коллимированного пропускания.

### Порядок выполнения работы

1. Ознакомиться с методами измерения оптических характеристик рассеивающих сред.
2. Получить данные для вычисления нормировочного коэффициента:
  - 2.1. Включить лазер, дождаться стабилизации выходной мощности.
  - 2.2. Закрывать малое выходное отверстие сферы крышкой, направить излучение на стенку сферы.
  - 2.3. Измерить и записать мощность излучения на входе и выходе из сферы.
3. Измерить диффузное отражение:
  - 3.1. Поместить образец в соответствии с рисунком 1 (а).
  - 3.2. Провести измерения мощности излучения на входе и выходе из сферы и записать данные в соответствующие столбцы таблицы 1.

Измерения повторить 3-5 раз для уменьшения случайной погрешности.

4. Измерить диффузное пропускание:
  - 4.1. Поместить образец в соответствии с рисунком 1 (б).
  - 4.2. Провести измерения мощности излучения на входе и выходе из сферы и записать данные в соответствующие столбцы таблицы 2. Измерения повторить 3-5 раз для уменьшения случайной погрешности.
5. Измерить коллимированное пропускание:
  - 5.1. Собрать установку в соответствии с рисунком 1 (в).
  - 5.2. Провести измерения мощности излучения перед образцом и на некотором расстоянии (не менее ~ 5 см), прошедшее через образец и записать данные в соответствующие столбцы таблицы 3. Измерения повторить 3-5 раз для уменьшения случайной погрешности.
6. Измерить и записать толщину образца микрометром.
7. Провести обработку результатов измерений по формулам 1-13 и занести результаты в соответствующие столбцы таблиц 1-4.

**Таблица 1. Измерение диффузного отражения**

№ образца	$I_{\text{ВХОД}}$ , мВт	$I_{\text{ВЫХОД}}$ , мВт	$R_d$

**Таблица 2. Измерение диффузного пропускания**

№ образца	$I_{\text{ВХОД}}$ , мВт	$I_{\text{ВЫХОД}}$ , мВт	$T_d$

**Таблица 3. Измерение коллимированного пропускания**

№ образца	$I_{\text{ВХОД}}$ , мВт	$I_{\text{ВЫХОД}}$ , мВт	$T_c$

**Таблица 4. Рассчитанные оптические характеристики тканей**

№ образца	$\mu_t$ , см <sup>-1</sup>	$\mu_a$ , см <sup>-1</sup>	$\mu_s$ , см <sup>-1</sup>	$\mu'_s$ , см <sup>-1</sup>	g

### Обработка результатов

Для расчета коэффициента ослабления  $\mu_t$  следует использовать закон Бугера-Бера (1):

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

где  $z$  – толщина образца,  $R$  - коэффициент френелевского отражения,  $I$  – интенсивность излучения после прохождения образца,  $I_0$  – начальная интенсивность излучения.

Для расчета промежуточных переменных (a, b) используются следующие формулы:

$$a = \frac{1 - T_d^2 + R_d^2}{2R_d}, \quad (2)$$

$$b = \sqrt{a^2 - 1}, \quad (3)$$

где  $T_d$  – коэффициент диффузного пропускания,  $R_d$  – коэффициент диффузного отражения.

Формулы, используемые для расчета коэффициента поглощения Кубелки-Мунка (K) и коэффициента рассеяния Кубелки-Мунка (S):

$$S = \frac{1}{bz} \ln \left[ \frac{1 - R_d(a - b)}{T_d} \right], \quad (4)$$

$$K = S(a - 1), \quad (5)$$

где  $a$ ,  $b$  – промежуточные переменные, рассчитанные по формулам (2) и (3),  $z$  – толщина образца,  $T_d$  – коэффициент диффузного пропускания,  $R_d$  – коэффициент диффузного отражения.

Формулы, используемые для расчета коэффициентов поглощения  $\mu_a$ , рассеяния  $\mu_s$ , редуцированного коэффициента рассеяния  $\mu'_s$  и фактора анизотропии рассеяния  $g$ :

$$K = 2\mu_a, \quad (6)$$

$$S = \frac{3}{4}\mu_s(1 - g) - \frac{1}{4}\mu_a, \quad (7)$$

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s, \quad (8)$$

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g), \quad (9)$$

где  $K$  – коэффициент поглощения Кубелки-Мунка,  $S$  – коэффициент рассеяния Кубелки-Мунка,  $\mu_t$  – коэффициент ослабления.

Формула, используемая для расчета нормировочного коэффициента:

$$k = \frac{I_{0 \text{ ВХ}}}{I_{0 \text{ ВЫХ}}}, \quad (10)$$

где  $I_{0 \text{ ВХ}}$  и  $I_{0 \text{ ВЫХ}}$  – интенсивности излучения на входе и выходе, записанные в пункте 3.

Формулы, используемые для расчета коэффициента диффузного отражения ( $R_d$ ), коэффициента диффузного пропускания ( $T_d$ ) и коэффициента колимированного пропускания ( $T_c$ ):

$$R_d = k \frac{I_{\text{ВЫХОД}}}{I_{\text{ВХОД}}}, \quad (11)$$

$$T_d = k \frac{I_{\text{ВЫХОД}}}{I_{\text{ВХОД}}}, \quad (12)$$

$$T_c = \frac{I_{\text{ВЫХОД}}}{I_{\text{ВХОД}}}, \quad (13)$$

где  $I_{\text{ВЫХОД}}$  и  $I_{\text{ВХОД}}$  – интенсивности излучения на входе и выходе,  $k$  – нормировочный коэффициент.

### Список литературы

- [1] Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1998.
- [2] Кочубей В.И., Башкатов А.Н. Спектроскопия рассеивающих сред. Саратов, «Новый ветер», 2014.
- [3] Тучин, В.В. Оптическая биомедицинская диагностика. - М.: ФИЗМАТЛИТ, 2006.

### Вопросы к лабораторной работе

1. В чем заключаются прямые методы определения оптических параметров биотканей?
2. В чем заключаются косвенные методы определения оптических параметров биотканей?
3. Какими собственными оптическими параметрами можно описать движение фотонов в рассеивающем образце?
4. Что такое наблюдаемые оптические параметры и от чего они зависят?
5. Что такое интегрирующая сфера?
6. Из каких элементов состоит интегрирующая сфера и какой принцип ее работы?
7. Какие требования предъявляются к внутреннему покрытию интегрирующей сферы?
8. Какой физический смысл имеет закон Бугера-Бера, привести формулу, уметь объяснить входящие в формулу физические величины?
9. Какой физический смысл имеют диффузное отражение и диффузное пропускание, при каких условиях они возникают?
10. Какой физический смысл имеет коллимированное пропускание, при каких условиях оно возникает?

### Лабораторная работа № 3

## Исследование фотоабляции и эффективности лазерной обработки биологических тканей

**Цель работы:** выполнить абляцию твердой и мягкой биологической ткани при облучении ее лазерным излучением.

**Объекты исследования:** твердая и мягкая биологические ткани; абляция, коагуляция, испарение; непрерывный и импульсный режим работы лазера.

### Задачи, решаемые в работе:

1. Ознакомление с непрерывным и импульсным режимом работы лазера.
2. Изучение фотоабляции и коагуляции биологической ткани.
3. Расчет эффективности лазерной обработки биологических тканей.

### Сведения из теории

Лазер представляется исключительно точным, универсальным и удобным в использовании инструментом и имеет большой потенциал для медицинских применений. Направленность, монохроматичность, когерентность лазерных источников определяют возможность локализации энергии. Поэтому фоторазрушение может быть осуществлено в очень малых объемах (в пределах клетки или даже ее частей). Возможность бесконтактного воздействия обеспечивает стерильность, а коагуляционное действие излучения – бескровность медицинской операции.

В зависимости от временного распределения мощности светового потока выделяют следующие виды лазерного излучения (см. рис. 1):

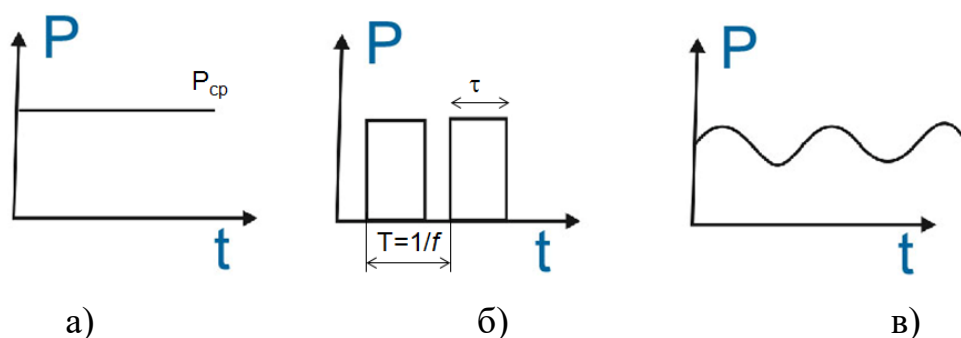
1. непрерывное;
2. импульсное;
3. модулированное.

Мощность импульсного излучения – выходная мощность, определяемая как среднее значение мощности за время излучения импульса.

Средняя мощность импульсного излучения вычисляется по формуле (1):

$$P_{\text{ср}} = P_{\text{и}} \cdot \tau \cdot f \text{ [Вт]}, \quad (1)$$

где  $P_{\text{и}}$  – средняя мощность импульсного излучения [Вт];  $\tau$  – длительность лазерного импульса [сек],  $f$  – частота повторения импульсов [сек<sup>-1</sup>].



**Рисунок 1** – Виды лазерного излучения (а) непрерывное; (б) импульсное и (в) модулированное.

В данной работе исследуется лазер с длиной волны 980 нм и максимальной мощностью  $\sim 9$  Вт. Технические характеристики используемого лазера приведены в таблице 1.

**Таблица 1. Характеристики лазера**

Параметры питания лазерного диода	Модификация		
	10	10M	10N
Максимальный ток питания ЛД, не менее, [А]	8,0	6,0	10,0
Длительность импульса, [мкс]	80 – $9,998 \times 10^6$		
Длительность периода, [мкс]	100 – $9,999 \times 10^6$		
Дискретность установки длительностей, [мкс]	10 или 1000		
Длительность фронта по уровню 0.5, [мкс]	не более 30		
Максимальная частота модуляции, [кГц]	10,0		
Напряжение сигнала, [В]	6 – 12		
Входной ток, [мА]	не более 10		
Нестабильность задержки импульса тока, [мкс]	не более 0,5		

Лазерное излучение может вызвать разные тепловые эффекты в ткани: температурная активация, денатурация белка, коагуляция, испарение и карбонизация. Это зависит от температуры и времени воздействия на ткань излучения. Различные тепловые эффекты воздействия лазера на ткань никогда не наблюдаются по отдельности, а чаще всего одновременно. Излучение, проникая вглубь ткани, частично поглощается и рассеивается, в результате чего образуется температурный градиент и соответствующие термические зоны. Правильно подбирая мощность и длину волны излучения можно добиваться нужного распределения термических зон в ткани для достижения необходимого эффекта.



*Коагуляция* – процесс нарушения нормальных свойств белков, их свертывания под действием различных факторов, при котором нарушается гомеостаз и вследствие этого биоткань теряет свои свойства.

*Денатурация* – процесс, при котором содержащийся в биоткани белок разрушается частично, а гомеостаз не нарушается.

*Абляция* – процесс разрушения биоткани, при котором фронт разрушения движется быстрее фронта распространения тепла.

*Карбонизация* – процесс разрушения ткани, при котором формируется углерод.

*Испарение* – процесс разрушения ткани, при котором структуры последней преобразуются в пар.

В настоящей работе необходимо оценить энергетическую освещенность, энергетическую экспозицию и эффективность удаления ткани лазерным излучением. Освещенность, которая необходима для разрушения данного вида ткани называется *энергетической освещенностью* (плотность потока мощности, интенсивность). Ее можно вычислить по формуле (2):

$$E_e = \frac{P_{cp}}{S} \left[ \frac{\text{Вт}}{\text{см}^2} \right] \quad (2)$$

где  $S = \frac{1}{4} \cdot \pi \cdot d^2 = \pi \cdot r^2$  – обрабатываемая площадь ткани [см<sup>2</sup>] (рис. 2).

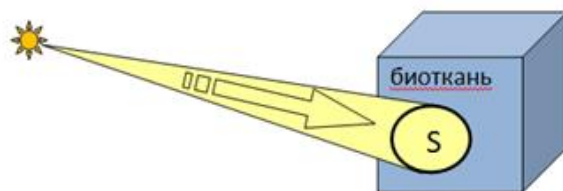


Рисунок 2 – Облучение ткани лазерным излучением.

*Энергетической экспозицией* (плотностью потока энергии) называется отношение энергии падающего на элемент поверхности излучения к площади этого элемента. Также она определяется как произведение энергетической освещенности на длительность облучения. Она вычисляется по формуле (3):

$$H_e = \frac{W}{S} = E_e \cdot t_{обл} \left[ \frac{\text{Дж}}{\text{см}^2} \right], \quad (3)$$

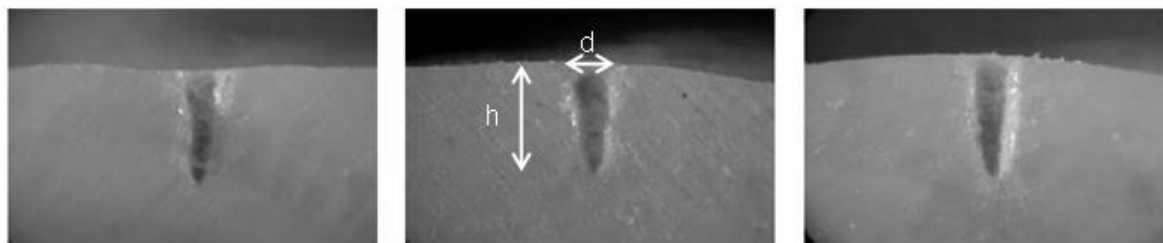
где  $t_{обл}$  – длительность облучения (экспозиция) [сек];  $W$  – энергия (доза) облучения [Дж].  $W_{непр} = P \cdot t_{обл}$ ,  $W_{имп} = P_{cp} \cdot t_{обл}$ .

Под *эффективностью удаления* понимается отношение объема удаленной ткани к затраченной на ее удаление энергии лазерного излучения:

$$K = \frac{V}{W} \left[ \frac{\text{мм}^3}{\text{Дж}} \right], \quad (4)$$

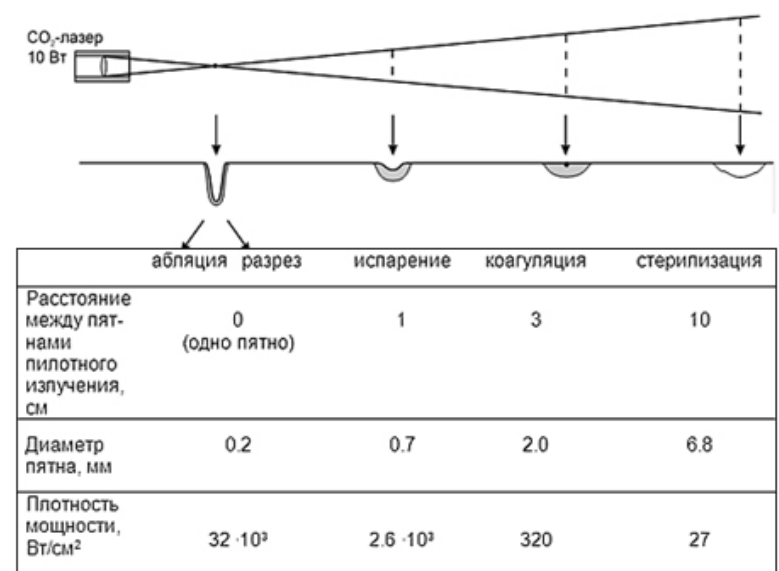
где  $V$  – объем удаленной ткани [мм<sup>3</sup>].

Объем удаленной ткани оценивается с помощью оптической микроскопии по глубине и диаметру полученного отверстия (рис. 3).



**Рисунок 3** – Объем удаленной ткани оценивается с помощью оптической микроскопии.

В работе также необходимо обработать ткани расфокусированным лазерным лучом. Для этого наконечник манипулятора отодвигается от поверхности ткани. При этом следует учитывать, что плотность мощности при расфокусировке уменьшается обратно пропорционально квадрату расстояния от фокальной точки до облучаемой поверхности. На рис. 4 показаны особенности воздействия на ткани сфокусированного и расфокусированного луча CO<sub>2</sub>-лазера (мощностью 10 Вт).

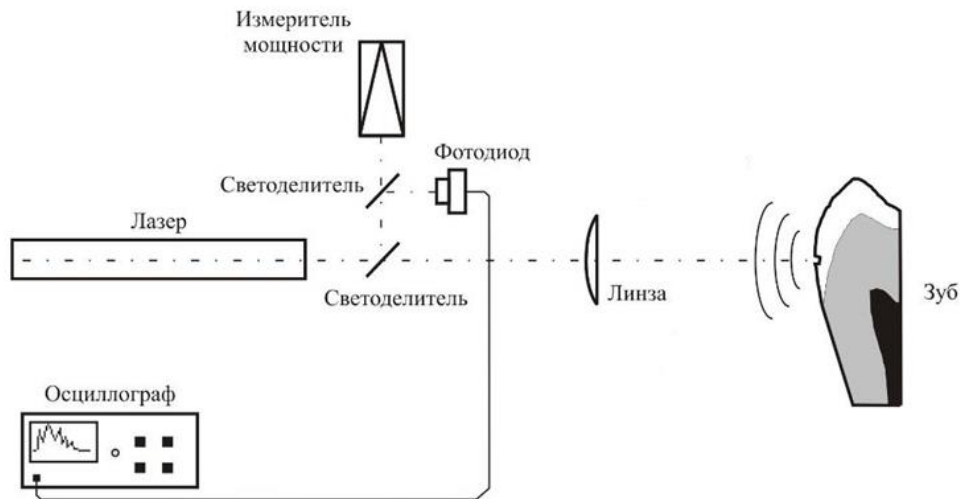


**Рисунок 4** – Воздействие на ткани сфокусированного и расфокусированного луча лазера.

### Экспериментальная установка

Излучение полупроводникового лазера фокусируется с помощью линзы на поверхность исследуемого образца (рис. 5). Часть излучения с помощью светоделителя направляется на измеритель мощности и на

осциллограф. С помощью данных средств детектирования измеряются мощность, форма и частота следования лазерных импульсов. Характерные фотографии областей воздействия лазера на различные биологические объекты приведены на рис. 6.



**Рисунок 5** – Схема облучения биологического объекта и детектирования мощности полупроводникового лазера.



**Рисунок 6** – Характерные фотографии областей воздействия лазера на различные биологические объекты.

## Порядок выполнения работы

1. Перед началом работы построить градуировочный график силы тока от мощности.
2. Денатурация белка.
  - 2.1. Перелить белок куриного яйца в стеклянный стакан.
  - 2.2. Подобрать параметры лазера, достаточные для коагуляции белка.
  - 2.3. Сравнить глубину зоны коагуляции лазера в непрерывном / импульсном режиме.
3. Фотоабляция мягкой ткани.
  - 3.1. Выполнить коагуляцию («побеление») и абляцию («удаление») куриной кожи.
  - 3.2. Оценить особенности воздействия на куриную кожу сфокусированного и расфокусированного луча лазера с увеличенным диаметром светового пятна.
4. Удаление твердых тканей.
  - 4.1. Сравнить характер удаления твердых тканей зуба человека (карбонизация, фотоабляция) при воздействии лазера в непрерывном / импульсном режиме.
  - 4.2. Рассчитать эффективность удаления твердых тканей зуба человека. Для этого вычислить объем удаленной ткани [мм<sup>3</sup>] и энергию (дозу) облучения [Дж].

## Обработка результатов

**Таблица 2. Результаты измерения**

№	Измерить во время эксперимента	Рассчитать	Рассчитать или построить график
1	Измерение мощности лазера		
	сила тока	мощность (по графику)	построить градуировочный график силы тока от мощности
2-4	Фотовоздействие		
	время облучения, длительность импульса, частота повторения импульса	энергия облучения	- эффективность удаления в непрерывном и импульсном режимах, - энергетическая освещенность
	мощность		
	глубину и диаметр полученного отверстия	объем удаленной ткани (мм <sup>3</sup> )	- энергетическая экспозиция

Оформить отчет, добавить фотографии и написать выводы.

## Список литературы

- [1] Лазерные биомедицинские технологии, Часть 1 и 2. Беликов А.В., Скрипник А.В., 2008.
- [2] Тучин, В.В. Оптическая биомедицинская диагностика. - М.: ФИЗМАТЛИТ, 2006.

## Вопросы к лабораторной работе

1. Какими преимуществами обладают лазерные источники по сравнению с обычными световыми источниками для хирургической обработки биологических тканей?
2. Перечислите виды лазерного излучения в зависимости от временного распределения мощности светового потока.
3. Дайте определение мощности импульсного излучения.
4. Какие тепловые эффекты в биологической ткани может вызвать лазерное излучение и от чего зависят данные эффекты?
5. Каким образом можно добиться нужного распределения термических зон в ткани?
6. Дайте определение коагуляции, денатурации, абляции, карбонизации и испарения.
7. Дайте определение энергетической освещенности, экспозиции и эффективности удаления ткани.
8. По какой зависимости меняется плотность мощности при расфокусировке?
9. В каких объектах в данной работе вы наблюдали карбонизацию, а в каких — фотоабляцию?
10. В каком режиме работы лазера наиболее эффективно можно достичь фотоабляции?

#### *Лабораторная работа № 4*

### **Исследование влияния низкоинтенсивного импульсного ТГц излучения на биологические клетки**

**Цель работы:** исследование изменения биологического состояния клеток с помощью терагерцевого излучения.

**Объекты исследования:** культивируемые клетки, индекс роста, апоптоз, некроз.

#### **Задачи, решаемые в работе:**

1. Провести юстировку экспериментальной схемы для облучения клеток терагерцевым излучением.
2. Проанализировать апоптоз и некроз клеток с помощью проточного цитофлуориметра.
3. Рассчитать индекс роста клеток с помощью интерференционной микроскопии.

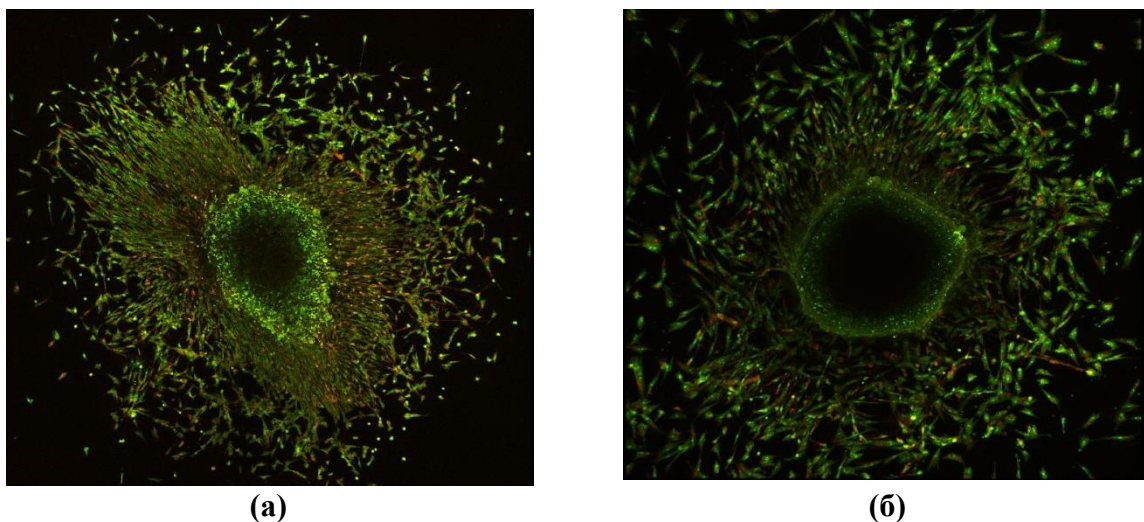
#### **Сведения из теории**

Терагерцевое излучение вызывает разнообразные биологические эффекты, которые проявляются на разных уровнях организации живых систем, в том числе на клеточном уровне [1, 2]. Основные эффекты терагерцевого излучения – изменение проницаемости клеточных мембран и функциональной активности генов. Различными авторами показан эффект повышения проницаемости клеточной мембраны, вызываемый терагерцевым излучением. Эффект демонстрируется проникновением в клетку веществ, для которых мембрана не проницаема.

Безусловно, обнаруженные эффекты имеют непрямой характер, а являются отражением некоторых молекулярных и межмолекулярных мембранных и внутриклеточных процессов, развитие которых инициировано терагерцевым излучением. Этот каскад реакций может менять и активность генов. Пусковым механизмом при этом должно явиться изменение конформации мембранных белков.

В работе [3, 4] исследовалось изменение пролиферативной активности нейритов сенсорных ганглиев под действием широкополосного импульсного терагерцевого излучения. На образцы, находящиеся в закрытой чашке Петри, воздействовали терагерцевым излучением (частотный диапазон: 0,1-2,0 ТГц; длительность ТГц импульса: 2,5 пс). После облучения и инкубирования образцов, проводилась оценка относительного распределения количества клеток по фазе клеточного цикла. Флуоресцентный акридиновый оранжевый краситель проникает в клетки и окрашивает ДНК в зеленый, а РНК – в красный цвет. На рис. 1 приведены результаты окраски контрольных и облученных образцов.

Можно видеть усиление пролиферации нейритов в облученном образце (см. рис.1-б), увеличение их плотности, а также сохранение жизнеспособности клеток в центральной зоне, соответствующей первичному ганглию. В необлученном образце клетки центральной зоны гибнут из-за недостатка питательных веществ и кислорода, что наблюдается на рис. 1-а. Механизм воздействия излучения состоит в образовании пронизывающих мембрану гидрофильных пор, так как иным образом краситель не может проникнуть внутрь нейрона. В течение суток после облучения проницаемость мембраны полностью восстанавливалась. Это доказывается не только нормальной реакцией мембраны на флуоресцентный краситель, но и восстановлением значений мембранного потенциала. Следовательно, терагерцевое излучение вызывает обратимые и регулируемые нарушения проницаемости клеточной мембраны.



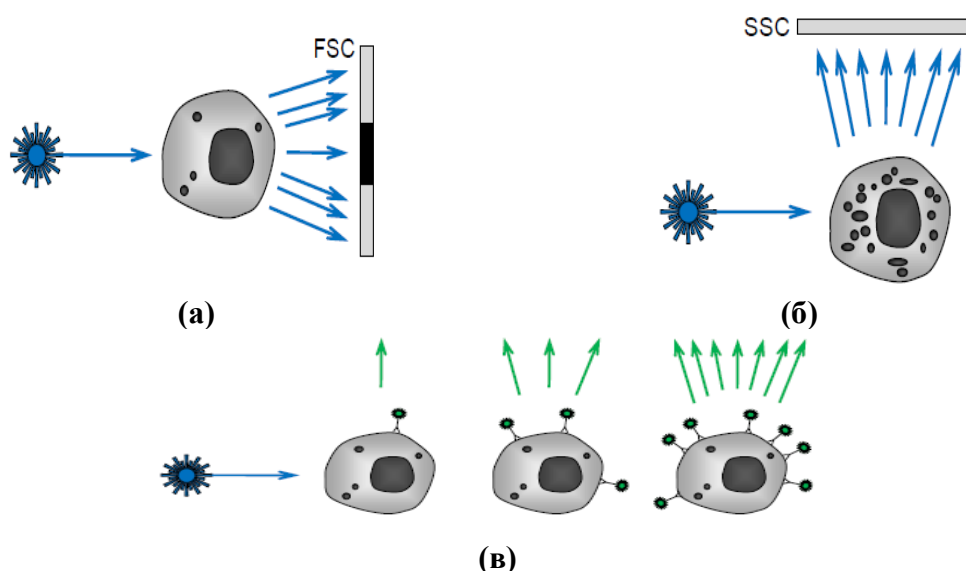
**Рисунок 1** - Фотография клеток после культивирования при окраске акридиновым оранжевым красителем, увеличение  $\times 10$ . Зеленым цветом окрашены ДНК, оранжевым – РНК (а) после облучения, ИП=147% и (б) контрольного образца, ИП=100%.

В настоящей работе исследование культивированных клеток проводится на проточном цитофлуориметре – приборе, позволяющем измерять оптические свойства индивидуальных клеток в суспензии [5]. Использование суспензии клеток является необходимым условием, поскольку измерение производится в токе ламинарной жидкости. Большинство проточных цитофлуориметров измеряют такие параметры клеток, как светорассеяние под разными углами и флуоресценцию в различных диапазонах электромагнитного спектра.

Детектор прямого светорассеяния (FSC, от англ. “forward scatter”) располагается по ходу лазерного луча и собирает излучение, рассеянное в пределах малых углов ( $2-16^\circ$ , значения зависят от модели прибора). Центральная часть FSC-детектора экранирована, поэтому нерассеянное лазерное излучение им не регистрируется. В отсутствие клеток или других частиц лазерный луч попадает на экранированную часть детектора (рис.

2а). Объекты бóльшего размера, как правило, приводят к бóльшей величине малоуглового светорассеяния. В связи с этим, величина FSC-сигнала позволяет косвенно судить о величине объекта.

Детектор бокового светорассеяния (SSC, от англ. “side scatter”) располагается под углом в  $90^\circ$  относительно направления лазерного луча и собирает излучение, рассеянное в пределах больших углов ( $75-105^\circ$ , значения зависят от модели прибора). Рассеяние света под большими углами является следствием многократного преломления и рассеяния луча лазера при прохождении через клетку. Регистрация этого излучения позволяет судить о сложности внутреннего строения клетки, – наличии гранул, везикул, других внутриклеточных включений, соотношении ядро-цитоплазма и т.п. (рис. 2б). Объекты более сложной внутренней структуры, как правило, приводят к бóльшей величине светорассеяния на больших углах. В связи с этим, величина SSC-сигнала позволяет косвенно судить о гранулярности объекта.



**Рисунок 2** – Анализ прямого (а), бокового (б) светорассеяния и флуоресценции (в) в проточном цитофлуориметре.

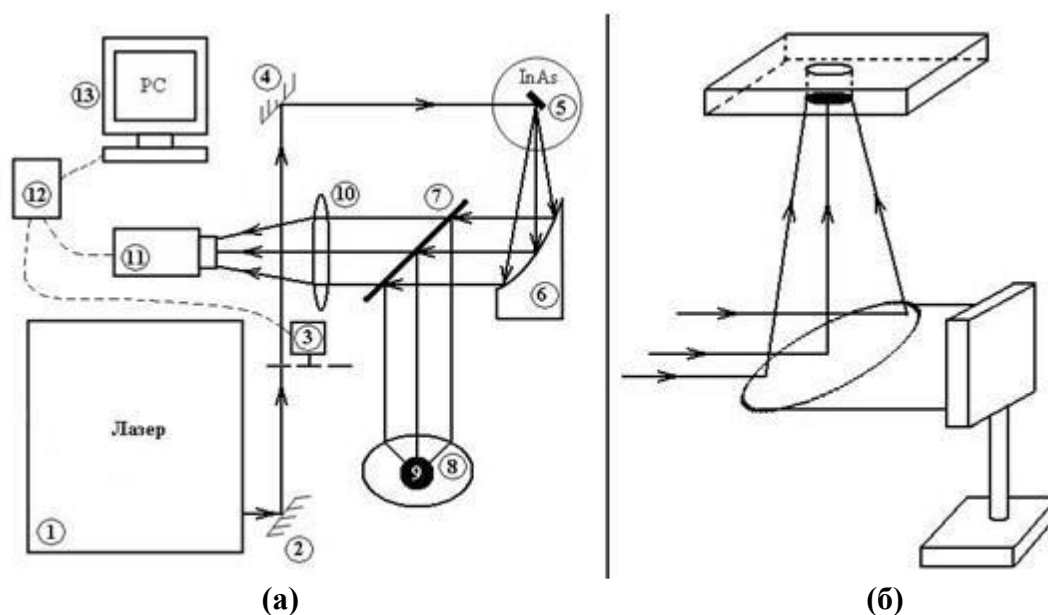
Система для регистрации флуоресценции состоит из комплекса дихроичных зеркал, светофильтров и детекторов флуоресценции (FL, от англ. “fluorescence”), каждый из которых регистрирует излучение в строго определенном диапазоне длин волн. Анализ флуоресценции клеток позволяет получить наибольшее количество информации об исследуемом образце, поскольку даже клетки с идентичной морфологией могут отличаться по составу белков и других макромолекул в зависимости от выполняемой функции, стадии клеточного цикла и т.д. В простейшем случае, при использовании только одного красителя, интенсивность флуоресценции свидетельствует о количестве сайтов связывания красителя с клеткой: в случае ДНК-специфичного красителя – о количестве ДНК в



клетке, в случае антител – об экспрессии соответствующих антигенов на поверхности клетки и т.п. (см. рис. 2в).

### Экспериментальная установка

В настоящей работе используется оптическая схема терагерцевого фотометра (рис. 3). Источником излучения является фемтосекундный волоконный лазер EFOA-SH 1. Лазер работает в импульсно-периодическом режиме с частотой повторения 50 МГц на длине волны  $\lambda = 1,56$  мкм. Типичная длительность одного импульса 125 фс. Мощность излучения 120 мВт. Излучение лазера 1 проходит систему зеркал 2,4, перед тем как попасть на кристалл, оно стробируется механическим модулятором 3 с частотой 13 Гц. Затем направляется на кристалл InAs, помещенный в сильное магнитное поле 5. Мощность фемтосекундного излучения перед кристаллом InAs составляет 120 мВт. Лазерное излучение фемтосекундной длительности создает свободные носители заряда, движение которых в магнитном поле генерирует терагерцевое излучение. Фемтосекундное излучение, отраженное от кристалла, обрезается с помощью фильтра из фторопласта. Расходящееся терагерцевое излучение собирается внеосевым параболическим зеркалом 6 и направляется на чашку Петри с объектом 8. Терагерцевое излучение детектируется неселективным оптико-акустическим приемником 11 (ОАП).



**Рисунок 3** – Блок-схема терагерцевого фотометра, (а) вид сверху, (б) элементы 8 и 9, вид сбоку. На схеме: 1 – фемтосекундный лазер, 2,4 – зеркала, 3 – механический модулятор, 5 – магнитная система с кристаллом InAs (угол падения излучения составляет  $45^\circ$ ), 6, 8 – параболические зеркала, 7 – светоделительная кремниевая пластина, 9 – объект, помещенный в ячейку планшета, 10 – линза, 11 – оптико-акустический приемник, 12 – синхронный усилитель, 13 – персональный компьютер.

Основной диапазон измерений ОАП (ячейка Голея): терагерцевое и инфракрасное излучение. Детектор состоит из небольшого металлического цилиндра, закрытого затемненной металлической пластиной с одной стороны и гибкой металлизированной диафрагмы с другой. Цилиндр заполнен ксеноном и запаян. Как только инфракрасное излучение падает на затемненную металлическую пластину, газ нагревается, и его давление увеличивается. Это приводит к деформации диафрагмы, разделяющей две камеры. Поглощающий элемент ячейки Голея выполнен в виде ультратонкого резонансного поглощающего слоя, содержащего высокоимпедансную поверхность, обращенную к входному окну ячейки.

### **Порядок выполнения работы**

1. Измерить потери терагерцевого излучения на планшете, в котором должны находиться культивированные клетки.
2. Облучение клеток
  - 2.1. Установить фильтры таким образом, чтобы мощность терагерцевого излучения варьировалась и с учетом поглощения планшетом составляла  $2,5 \div 68,8$  нВт. Площадь облучения должна составлять  $3,14 \text{ см}^2$ .
  - 2.2. Облучить клетки в течение 1, 3, 5 минут. Провести три серии экспериментов, в каждой серии облучение на каждой мощности проводить три раза.
  - 2.3. Рассчитать плотность мощности падающего излучения ( $\text{мВт} / \text{см}^2$ ) и энергетическую экспозицию облучения.
3. Анализ данных на проточном цитофлуориметре.
  - 3.1. На приборе проточной цитофлуориметрии построить гистограммы интенсивности флуоресценции DIOC<sub>6</sub>(3), увеличение интенсивности флуоресценции которого зависит от мембранного потенциала митохондрий.
  - 3.2. Полученные из гистограмм данные обработать и свести в таблицу, где в процентном соотношении привести живые и находящиеся на ранних и поздних стадиях апоптоза клетки.
  - 3.3. Данные занести в таблицу 1.
4. Исследование роста клеток в клеточной культуре с помощью светового микроскопа.
  - 4.1. Сделать микрофотографии облученных и необлученных клеток после инкубирования.
  - 4.2. Оценить рост клеток по изменению их площади по микрофотографиям.
  - 4.3. Данные занести в таблицу 2.

## Обработка результатов

**Таблица 1. Количественное соотношение живых и находящихся на разных стадиях апоптоза клеток**

Культура клеток	Мощность облучения, мкВт	Живые клетки, %	Ранний апоптоз, %	Поздний апоптоз / некроз, %
название	контроль			
	Мощность1			
	Мощность2			
	Мощность3			

**Таблица 2. Распределение индекса площади в зависимости от параметров излучения**

Мощность, мкВт	Плотность мощности, мкВт/см <sup>2</sup>	Импульсная плотность мощности, Вт/см <sup>2</sup>	Суммарная энергия, мДж	Время облучения, мин	Индекс площади, %

### Литература

- [1] Sun Y., Sy M.Y., Wang Yi-X. J., Ahuja A.T, Zhang Y-T, and Pickwell-M. E. A promising diagnostic method: Terahertz pulsed imaging and spectroscopy. World J Radiol. 2011 March 28; 3(3): 55–65.
- [2] Weightman P. Prospects for the study of biological systems with high power sources of terahertz radiation – Phys. Biol, 2012, V. 9, P. 053001.
- [3] Sulatsky M.I., Duka M.V., Smolyanskaya O.A. Stimulation of Neurite Growth under Broadband Pulsed THz Radiation // Physics of Wave Phenomena. – 2014. – Vol. 22. – No. 3. – P. 197–201.
- [4] Duka M. V., Dvoretzkaya L.N., Babelkin N. S. et al. Numerical and experimental studies of mechanisms underlying the effect of pulsed broadband terahertz radiation on nerve cell // Quantum Electronics. – 2014. – V. 44 (8). – P. 707–712.
- [5] Балалаева И.В. Проточная цитофлуориметрия: Учебно-методическое пособие, - Н. Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2014. - 75 с.
- [6] Son, J. H. Terahertz biomedical science and technology - CRC Press, 2014.
- [7] Zhang, X. C., & Xu, J. Introduction to THz wave photonics - New York: Springer, 2010.

## Вопросы к лабораторной работе

1. Какие биологические эффекты могут наблюдаться в клетках при воздействии на них терагерцевого излучения?
2. Каковы причины возникновения биологических эффектов в клетках?
3. Какой механизм воздействия терагерцевого излучения на нейриты сенсорного ганглия?
4. Что такое проточный цитофлуориметр?
5. Какие параметры измеряют на проточном цитофлуориметре?
6. Каким образом проводится измерение прямого, бокового светорассеяния и флуоресценции?
7. Какую информацию об объекте можно получить с помощью измерения прямого, бокового светорассеяния и флуоресценции?
8. Объясните принцип работы оптико-акустического приемника терагерцевого излучения.
9. В каких объектах в эксперименте наблюдались рост клеток, апоптоз и некроз?
10. В каком режиме работы терагерцевого генератора наиболее эффективно можно достичь рост клеток, апоптоз или некроз?

## Лабораторная работа № 5

### Экспериментальное наблюдение распространения излучения от непрерывного синусоидально-модулированного источника в сильно рассеивающей среде

**Цель работы:** наблюдать характеристики процесса распространения излучения от непрерывного источника, синусоидально-модулированного по интенсивности.

**Объекты исследования:** средняя траектория движения фотонов, банановидная зона, жировая эмульсия в цилиндрической кювете, неоднородность.

#### **Задачи, решаемые в работе:**

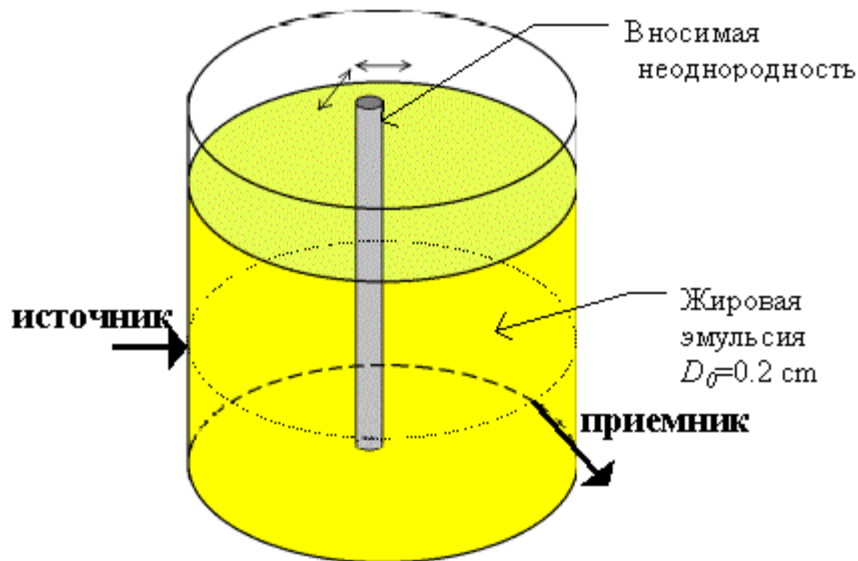
1. Исследовать распространение волн фотонной плотности в объектах в форме полупространства, плоского слоя, прямоугольного сектора и цилиндра.
2. Определить границы «банановидной зоны» и среднюю траекторию излучения.

#### **Сведения из теории**

Главной проблемой медицинской оптической томографии является отсутствие у фотонов регулярных траекторий в большинстве биологических объектов. Обычная томография базируется на прямолинейности траекторий фотонов в исследуемом теле, применение же прямолинейных траекторий для нужд оптической томографии сильнорассеивающих сред приводит к существенным искажениям реконструируемого объекта. Это затруднение можно преодолеть при использовании для построения решения задачи распространения света в сильнорассеивающей среде статистических характеристик траекторий фотонов, таких как средняя траектория фотонов и среднеквадратическое отклонение фотонов от нее. Понятие криволинейных средних траекторий фотонов применимо и в случае просвечивания исследуемого объекта излучением синусоидально-модулированного источника.

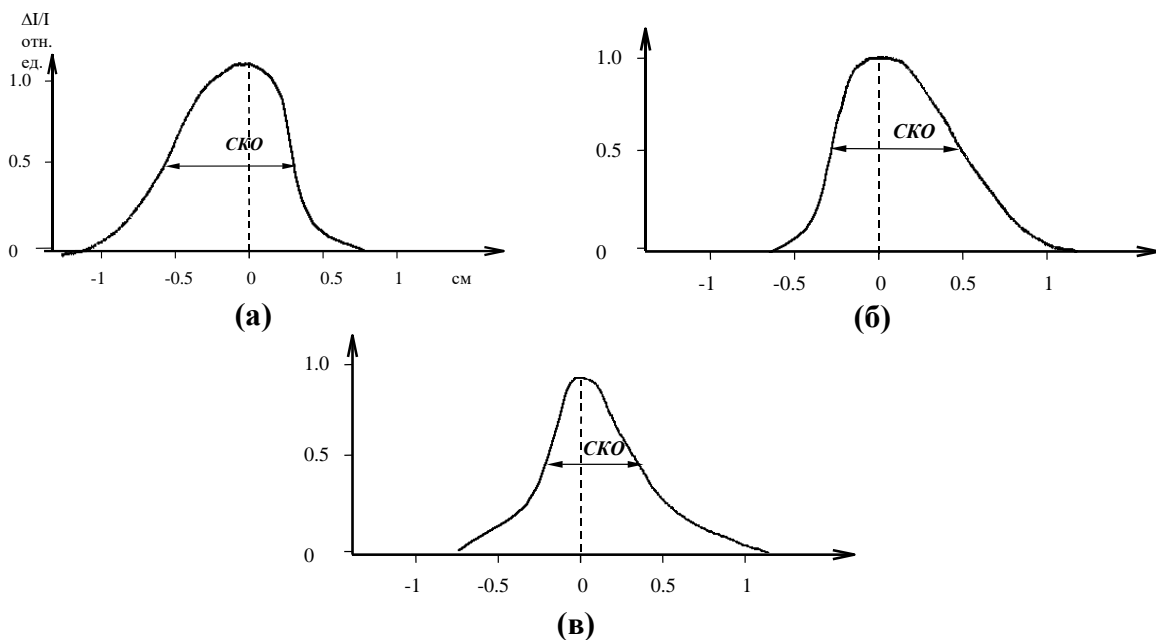
#### **Экспериментальная установка**

В качестве источника излучения используется непрерывный полупроводниковый лазер с длиной волны 0,83 мкм и средней мощностью 30 мВт. Излучение лазера фокусируется на боковую поверхность кюветы. Средние траектории излучения исследуются в стеклянной кювете с формой цилиндра диаметром 120 мм и глубиной 60 мм. Рассеивающей средой служит гомогенный водный раствор жировой эмульсии. Рис. 1 поясняет геометрию исследуемого объекта.



**Рисунок 1** – Определение средних траекторий излучения в цилиндрической кювете.

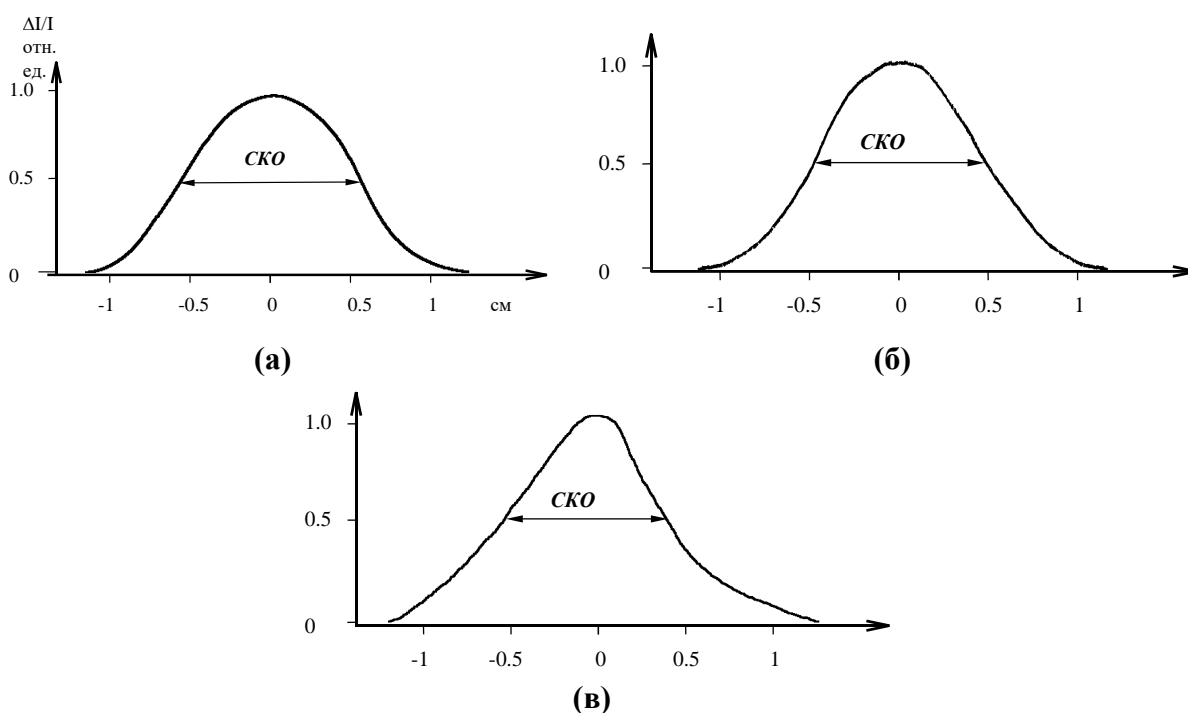
Длина цилиндрической кюветы многократно превышает расстояние между источником и приемником с целью имитации двумерной задачи. Пространственное положение средней траектории фотонов между источником и приемником определяется по максимуму снижения выходного сигнала при введении в сильнорассеивающую среду зонда. Сканирование среды зондом проводится в плоскости, перпендикулярной прямой, соединяющей источник и приемник. Профили чувствительности выходного сигнала к присутствию неоднородности представлены на рис. 2-3.



**Рисунок 2** – Профили чувствительности выходного сигнала к присутствию неоднородности в плоскости, перпендикулярной прямой, соединяющей источник и приемник, в разных точках этой прямой: (а) близко от точки источника, (б) близко от точки приемника, (в) примерно, посередине прямой источник-приемник.

Средняя траектория излучения определяется как траектория, проходящая через точки максимального ослабления сигнала приемника. Затем в окрестностях каждого максимума определяется пространственное распределение чувствительности выходного сигнала к зонду, и строятся профили этого распределения в сечениях, перпендикулярных к средней траектории. Из сравнения рис. 2 и 3 видно, что профиль распределения чувствительности регистрируемого сигнала к зонду имеет более симметричную форму в плоскостях, перпендикулярных средней траектории, что особенно заметно для плоскостей, взятых вблизи границ исследуемого объекта.

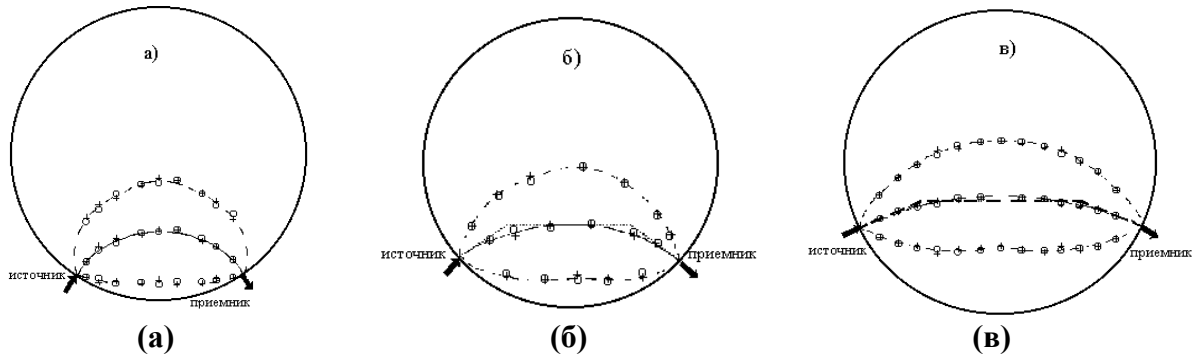
С помощью этих профилей определяются границы зоны двукратного ослабления чувствительности регистрируемого сигнала к присутствию неоднородности относительно максимального значения, наблюдаемого при расположении пробной неоднородности на средней траектории излучения. Эти границы соответствуют границам «банановидной зоны». «Банановидная зона» - это область пространства, внутри которой распространяется излучение, давшее основной вклад, а средняя траектория излучения - траектория максимума распределения фотонной плотности при распространении волны от источника к приемнику.



**Рисунок 3** – Профили распределения чувствительности регистрируемого сигнала к зонду, перпендикулярные средней траектории, в разных точках этой траектории: (а) близко от точки источника, (б) близко от точки приемника, (в) примерно, на равных расстояниях от источника и приемника.

На рис. 4 показаны средние траектории излучения и границы зон чувствительности при различных углах между приемником и источником. Из представленных на рис. 4 экспериментальных результатов следует, что

при отрыве зоны чувствительности к зонду от края среды (рисунок 4б, 4в) трехсегментная ломаная хорошо аппроксимирует среднюю траекторию. В тех случаях, когда зона чувствительности практически соприкасается с краем объекта (рисунок 4а).



**Рисунок 4** – Средние траектории излучения в цилиндре при различных углах  $\alpha$  между источником и приемниками: **(а)**  $\alpha=60^\circ$ , **(б)**  $\alpha=90^\circ$ , **(в)**  $\alpha=135^\circ$ . Средние траектории показаны сплошными линиями, их аппроксимация – точечными линиями, границы зоны чувствительности сигнала к присутствию неоднородности – пунктирными линиями.

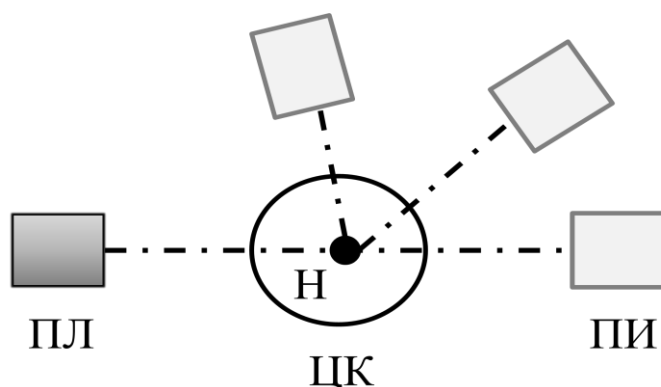
Таким образом, описанный эксперимент наглядно подтверждает возможность описания процесса распространения излучения от непрерывного синусоидально-модулированного источника в сильнорассеивающих объектах при помощи траекторной модели. При исследовании распространения волн фотонной плотности от источника к приемнику в ограниченном объекте, по изменению интенсивности регистрируемого сигнала при внесении в объект макронеоднородности можно определить пространственное распределение части переносимой волной энергии, вносящей основной вклад в регистрируемый сигнал. По положениям максимума этого распределения в плоскостях, перпендикулярных отрезку источник-приемник, можно выявить криволинейную траекторию. Ее можно трактовать как среднюю траекторию излучения, вдоль которой от источника к приемнику перемещается основная часть переносимой волной энергии.

Исследование средних траекторий излучения, а также границ зоны двукратного снижения чувствительности сигнала к наличию неоднородности, произведенное в ходе эксперимента для тел цилиндрической формы может выявить возможность использования трехсегментной аппроксимации средней траектории излучения, аналогично тому, как это было установлено аналитически для мгновенного точечного источника излучения. Это подтверждает возможность использовать быстродействующий траекторный алгоритм томографической реконструкции и при просвечивании объекта синусоидально-модулированным излучением.



## Описание установки

Экспериментальная установка, принципиальная блок-схема которой приведена на рис. 5, состоит из узла источника излучения с полупроводниковым лазером (ПЛ), цилиндрической кюветы (ЦК) с исследуемой неоднородностью (Н) и узла приемника излучения (ПИ). Вращение приемника вокруг цилиндрической кюветы осуществляется на углы  $\pm 165^\circ$  с шагом  $10^\circ$ .



**Рисунок 5** – Принципиальная блок-схема для исследования средних траекторий излучения в цилиндре при различных углах между источником и приемником (вид сверху).

## Порядок выполнения работы

1. Включить полупроводниковый лазер, переключив тумблер Т в положение "Вкл".
2. Включить измерительный прибор приемника излучения.
3. Отъюстировать оптическую схему таким образом, чтобы лазерный пучок попадал в центр приемника излучения.
4. Заполнить цилиндрическую кювету водой и капнуть чайную ложку молочного йогурта, тщательно перемешать.
5. Установить в схему цилиндрическую кювету, как показано на рис. 5.
6. С помощью вращения приемника излучения вокруг цилиндрической кюветы в диапазоне углов от  $0^\circ$  до  $\pm 165^\circ$  с шагом  $10^\circ$  измерить интенсивность падающего излучения.
7. То же самое проделать при добавлении в центр цилиндрической кюветы непрозрачной неоднородности.
8. Выключить лазер, переключив тумблер Т в положение "Выкл".
9. Данные показать преподавателю.

## Обработка результатов измерений

1. Построить средние траектории излучения в цилиндрической кювете без и с неоднородностью при различных углах между источником и приемниками в диапазоне углов от  $0^\circ$  до  $\pm 165^\circ$  с шагом  $10^\circ$ .

2. Построить профили чувствительности выходного сигнала к присутствию неоднородности в плоскости, перпендикулярной прямой, соединяющей источник и приемник.

3. Построить профили распределения чувствительности регистрируемого сигнала к приемнику излучения, перпендикулярные средней траектории.

### **Список литературы**

1. Оптическая биомедицинская диагностика, под редакцией В.В.Тучина, том I и II, Физматлит, 2007.
2. Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях, 2-е издание, Физматлит, 2010.
3. Зимняков Д.А., Тучин В.В. Оптическая томография тканей // «Квантовая электроника» . –32. –№ 10. – 2002.
4. Волконский В.Б., Кравценюк О.В., Любимов В.В., Скотников В.А. Траектории фотонов в сильнорассеивающей среде, облучаемой синусоидально модулированным лазерным излучением // Оптика и спектроскопия. – т.87. –№3. – с. 457-460. – 1999.

### **Вопросы к лабораторной работе**

1. Чем обусловлено поглощение излучения в биообъектах?
2. Чем обусловлено рассеяние излучения в биообъектах?
3. Что такое индикатриса рассеяния?
4. Какие виды рассеяния преобладают в биообъектах?
5. Что такое длина свободного пробега?
6. Чем обусловлен выбор «диагностического окна» для оптических методов исследования биообъектов?
7. Каков критерий применимости диффузионного приближения для описания процесса распространения излучения в биообъекте?
8. Как определить коэффициент диффузии?
9. Почему процесс распространения излучения оптического диапазона в биообъекте сложной формы нельзя описывать физико-математической моделью с применением прямолинейных траекторий источник-приемник?
10. Что такое «банановидная зона»?

## Измерение коэффициента пропускания биотканей с помощью терагерцевого фотометра

**Цель работы:** изучение методики определения коэффициентов пропускания биотканей с помощью импульсного терагерцевого фотометра ТР-1.

**Объекты исследования:** три образца биоткани (выдаются преподавателем).

### *Задачи, решаемые в работе:*

1. Ознакомиться с теорией взаимодействия лазерного излучения и биотканей и методом определения коэффициента пропускания биообразцов.
2. Изучить устройство и принцип работы импульсного ТГц фотометра ТР-1.
3. Измерить с помощью импульсного ТГц фотометра ТР-1 интенсивности опорного и объектных сигналов.
4. Вычислить коэффициенты пропускания, коэффициенты поглощения, среднюю глубину проникновения излучения и мнимую часть показателя преломления исследуемых образцов биотканей.

### Сведения из теории

Характер взаимодействия лазерного излучения с биотканями зависит от оптических свойств и структуры биоматериалов, от физических свойств лазерного излучения, а также от длительности облучения. В зависимости от интенсивности лазерного излучения, воздействующего на биообъекты, выделяют три группы процессов. 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). Таким образом, выбор энергетического, а также временного режимов лазерного воздействия определяется целью исследований. Так, например, при исследовании живых биообъектов интерес представляют малые интенсивности излучения, поскольку они не запускают адаптационные механизмы биосистемы, а значит, не влияют на функционирование живой материи. В области очень высоких интенсивностей имеют место необратимые процессы, в это случае имеет смысл изучать лишь органические материи, состав и свойства которой соответствуют моменту прекращения жизнедеятельности.

Оптические свойства биоматериалов отвечают за распространение лазерного излучения внутри исследуемого объекта и за его пределами, а

также за его ослабление. Первым механизмом, приводящим к ослаблению проходящего через образец излучения, является отражение. В виду того, что средний показатель преломления биоматериала больше, чем у воздуха, на границе раздела биообъект–воздух часть излучения отражается (френелевское отражение, около 5—7% света), а остальная часть проникает в биоткань. Проходя сквозь ткань, излучение претерпевает поглощение, которое, в свою очередь, зависит от исходной интенсивности излучения, толщины слоя вещества, через которое проходит свет, длины волны поглощаемого света и коэффициента поглощения. Если свет не поглощается, следовательно, воздействия на ткань не происходит. Однако когда фотон поглощается молекулой-мишенью (хромофором), вся его энергия передается этой молекуле, в результате чего, преобразуется в тепло и переизлучается в виде флуоресценции и частично тратится на биохимические реакции. Важнейшими эндогенными хромофорами являются меланин, гемоглобин, вода и коллаген.

Еще одним механизмом ослабляющим излучение, проходящее сквозь биоткани, является рассеяние. Этот физический процесс напрямую зависит от размеров и форма клеток, клеточных органелл и разнообразных волокнистых структур тканей. Важность явления рассеивания состоит в том, что оно быстро уменьшает плотность потока энергии, доступной для поглощения хромофором-мишенью. Так, к примеру, в клинической практике эффективность воздействия излучения на биообъект напрямую зависит от степени рассеяния этого излучения. Рассеивание снижается с увеличением длины волны, делая более длинные волны эффективным средством доставки энергии в глубокие кожные структуры.

При прохождении через объект импульс излучения выходит с задержкой и ослабленной интенсивностью. Ослабление коллимированного (лазерного) пучка в биоткани происходит по экспоненциальному закону. Интенсивность прошедшего коллимированного света  $I(v)$  через тонкий образец ткани со значительным поглощением в сравнении с рассеянием может быть оценена, в первом приближении, на основе закона Бугера-Ламберта-Бера:

$$I(v, d) = (1 - R) \cdot I_0(v) \cdot e^{-\mu(v)d}, \quad (1)$$

где  $I_0(v)$  – интенсивность падающего излучения;  $R$  – коэффициент френелевского отражения, при нормальном падении пучка,  $R = \left(\frac{n-1}{n+1}\right)^2$ ;  $n$  – относительный показатель преломления биоткани;  $\mu(v)$  – коэффициент экстинкции (ослабления),  $\mu(v) = \alpha(v) + \sigma(v)$ ;  $\alpha(v)$  – коэффициент поглощения;  $\sigma(v)$  – коэффициент рассеяния;  $l$  – толщина образца биоткани.

Коэффициент френелевского отражения  $R$  можно определить, зарегистрировав интенсивности излучения  $I_1$  и  $I_2$ , прошедшего через два образца исследуемого объекта разных толщин  $d_1$  и  $d_2$ . Далее необходимо решить систему из двух уравнений:

$$\begin{cases} I_1 = (1 - R) \cdot I_0 \cdot e^{-\alpha d_1} \\ I_2 = (1 - R) \cdot I_0 \cdot e^{-\alpha d_2} \end{cases} \quad (2)$$

Из закона (1) несложно определить коэффициент пропускания биоткани, который характеризует способность материала пропускать излучение:

$$T(\nu) = \frac{I(\nu)}{I_0(\nu)}. \quad (3)$$

Информация об амплитудном изменении сигнала, ослабленного исследуемым образцом, позволяет определять такие оптические свойства биоматериала, как коэффициент поглощения  $\alpha(\nu)$ , средняя глубина проникновения  $\delta(\nu)$  и мнимая часть показателя преломления  $n_{im}(\nu)$ .

$$\alpha(\nu) = \frac{1}{d} (\ln \frac{I_0(\nu)}{I(\nu)} + \ln(1 - R)) \quad (4)$$

$$\delta(\nu) = \frac{1}{\alpha(\nu)} \quad (5)$$

$$n_{im}(\nu) = \frac{\lambda \cdot \alpha(\nu)}{4\pi} \quad (6)$$

Данный метод определения оптических свойств биотканей относится к числу «прямых» методов. 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 должен быть расположен вдали от источника света и границ среды.

### Описание установки

Схема фотометра ТР-1 представлена на рис. 1. В качестве источника импульсного излучения используется лазерная система EFOA-SH ( $\lambda = 1560\text{нм}$ ,  $\tau_{\text{имп}} = 120\text{ фс}$ ,  $\nu = 70\text{ МГц}$ ,  $P = 120\text{ мВт}$ ). Импульс накачки проходит через механический модулятор ThorlabsMC 1000A, который работает на частоте 13 Гц, и падает на поверхность полупроводника InAs, помещенного в постоянное магнитное поле. Из-за большого коэффициента поглощения в приповерхностном слое создается большой градиент концентрации фотоносителей. Релаксация фотоносителей за счет движения в магнитном поле приводит к излучению электромагнитной волны терагерцевого диапазона. Генерируемое терагерцевое излучение проходит через белый тефлоновый ИК-фильтр (для селекции от излучения оптической накачки) и коллиматор, в качестве которого используется собирающая линза ( $f = 75\text{ мм}$ ). Далее излучение проходит через образец, падает на фокусирующую линзу ( $f' = 50\text{ мм}$ ) и попадает в оптоакустический

приемник GC-1P (ячейка Голея). Для увеличения отношения сигнал/шум используется синхронный усилитель FEMTOLIA-MV-150, в который поступает объектный сигнал с детектора и опорный сигнал. Далее информация об амплитуде выходного сигнала поступает на АЦП NIUSB-4065 и данные передаются на компьютер. С помощью программы DMM Photometer 2.0 осуществляется обработка данных. Программа рассчитывает усредненную в диапазоне частот от 0.1 до 1 ТГц интенсивность сигнала за время измерения. Результаты измерений сохраняются в Excel файл.

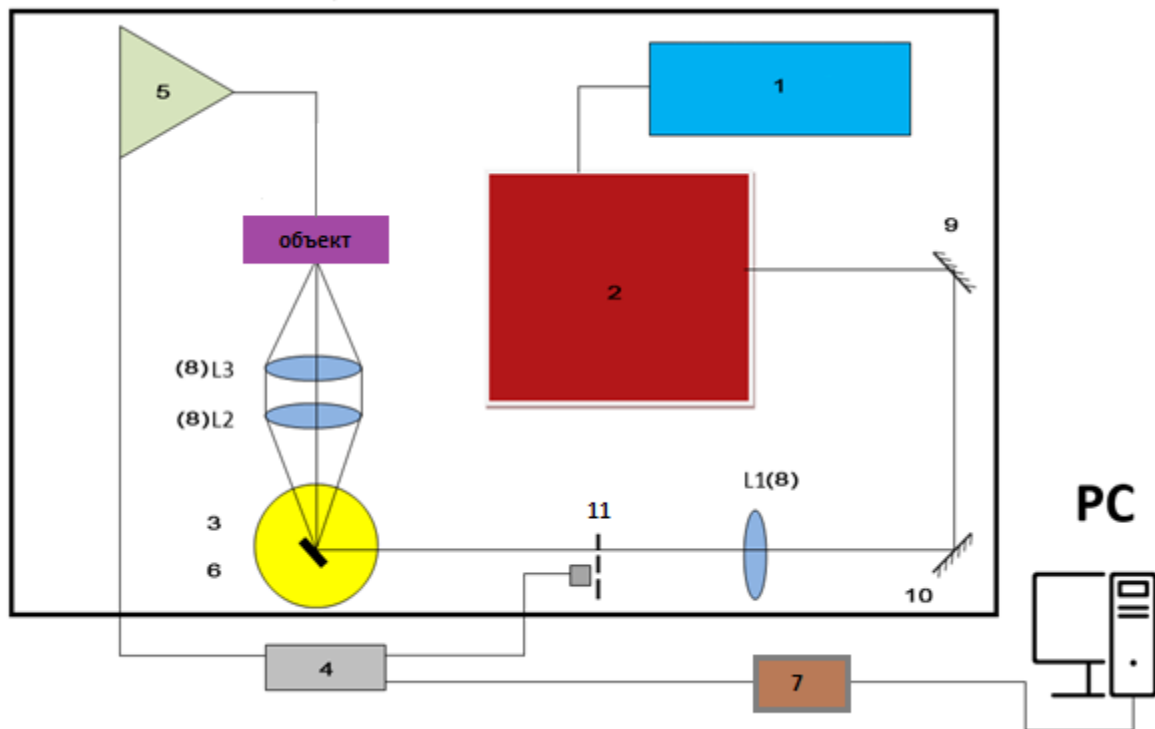


Рисунок 1–Функциональная схема фотометра TP-1.

**Состав терагерцевого фотометра:**

1. Регулятор температуры Thorlabs TC200.
2. Волоконный лазер AVESTA, модель EFOA-SH.
3. Оптомеханический модуляторМС 1000А.
4. Синхронизирующий усилитель LIA-MV-150.
5. Оптикоакустический приемник GC-1P.
6. Нелегированный кристалл InAs в постоянном магнитном поле.
7. Аналоговый цифровой преобразователь NIUSB-4065.
8. Собирающие линзы.
9. Зеркало Thorlabs PF20-03-M01.
- 10.Зеркало Thorlabs.
11. Модулятор частоты.

## Порядок выполнения работы

1. Ознакомиться с Инструкцией по эксплуатации импульсного терагерцевого фотометра ТР-1.
2. Привести измерительную установку в рабочее состояние согласно Инструкции.
3. Запустить программу «Фотометр ТР-1», расположенную на Рабочем столе управляющего компьютера.
4. Измерить интенсивность ТГц излучения при его распространении в воздушном пространстве (опорный сигнал).
5. Измерить толщины исследуемых образцов микрометром.
6. Закрепить исследуемый образец 1 в держателе и установить на пути потока ТГц излучения перед приемником излучения.
7. Измерить интенсивность ТГц излучения, прошедшего через исследуемый образец 1 толщиной  $d_1$  (объектный сигнал).
8. Измерить интенсивность ТГц излучения, прошедшего через исследуемый образец 1 толщиной  $d_2$  (объектный сигнал).
9. Повторить Шаги 6,7, 8 для образцов 2, 3.
10. Выключить измерительную установку согласно Инструкции.
11. Вычислить усредненный коэффициент пропускания  $T$ .
12. Вычислить усредненный коэффициент поглощения  $\alpha$ .
13. Вычислить мнимую часть показателя преломления  $n_{im}(v)$  и среднюю глубину проникновения излучения  $\delta(v)$ .
14. Рассчитать погрешности измерений.
15. Подготовить отчет.

## Обработка результатов

1. Вычислить погрешности для прямых и косвенных измерений.
2. Оформить отчет о проделанной работе в произвольной форме.

## Список литературы

- [1] Тучин В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях, 2010.
- [2] Симоненко Г.В., Тучин В.В.. Оптические свойства биологических тканей, 2007.
- [3] Царев М.В. Генерация и регистрация терагерцевого излучения ультракороткими лазерными импульсами, 2011.
- [4] Son, J. H. Terahertz biomedical science and technology - CRC Press, 2014.
- [5] Zhang, X. C., & Xu, J. Introduction to THz wave photonics - New York: Springer, 2010.

## Вопросы к лабораторной работе

1. Какие факторы влияют на распространение лазерного излучения в образце?
2. Какие механизмы влияют на ослабление лазерного излучения, проходящего через образец?
3. В каких случаях можно пренебрегать рассеянием излучения в законе Бугера-Ламберта-Бера?
4. За какой физический процесс отвечает мнимая часть показателя преломления?
5. За счет какого эффекта происходит генерация терагерцевого излучения на поверхности полупроводника?
6. Почему для определения коэффициента френелевского отражения  $R$  необходимо проводить измерения образцов разных толщин?
7. Решить систему уравнений (2) и определить  $R$ .
8. Рассчитать комплексный показатель преломления, воспользовавшись выражением для коэффициента френелевского отражения  $R$ .
9. Объяснить назначение каждого элемента измерительной установки (развернутый ответ).
10. Рассказать принцип работы импульсного ТГц фотометра TP-1.



**Миссия университета** – генерация передовых знаний, внедрение инновационных разработок и подготовка элитных кадров, способных действовать в условиях быстро меняющегося мира и обеспечивать опережающее развитие науки, технологий и других областей для содействия решению актуальных задач.

---

### **Образовательные программы**

Факультет фотоники и оптоинформатики открывает дорогу в Университет ИТМО абитуриентам, которые увлечены миром голографии и лазеров, оптических компьютеров и квантового шифрования, нанообъектов и живых клеток, физики и биомедицины.

#### **Биофотоника (магистратура)**

Цель программы – подготовка специалистов мирового уровня в области разработки и эксплуатации быстродействующих систем и устройств фотоники, а также лазерно-оптических методов диагностики в медицине, биологии на основе фемтотехнологий. Выпускники востребованы в следующих сферах профессиональной деятельности: создание и эксплуатация биомедицинских комплексов, использующих лазерные системы, в том числе с источниками излучения фемтосекундной длительности; создание и эксплуатация лазеров и лазерных систем различного назначения; разработка и создание устройств и систем фотоники и оптоинформатики для биомедицинских целей.

#### **Квантовые технологии в коммуникациях (магистратура)**

Цель программы – подготовка специалистов мирового уровня в области информационно-телекоммуникационных систем нового поколения. Студенты программы приобретают фундаментальные знания по таким профильным дисциплинам, как: «Оптические линии связи и квантовые коммуникации», «Оптические системы записи, хранения и отображения информации», «Нанофотоника» «Материалы и технологии интегральной и волоконной оптики». Выпускники востребованы в следующих сферах профессиональной деятельности: создание и эксплуатация оптических и квантовых устройств и систем передачи, обработки и записи информации; создание и эксплуатация лазеров и лазерных систем различного назначения; разработка программного обеспечения при создании систем фотоники и оптоинформатики.

Смолянская Ольга Алексеевна  
Возианова Анна Викторовна  
Кравценюк Ольга Вячеславовна  
Ходзицкий Михаил Константинович

**Биофотоника**  
**Методическое пособие по лабораторному практикуму**  
**Учебно-методическое пособие**

В авторской редакции

Редакционно-издательский отдел Университета ИТМО

Зав. РИО

Н.Ф. Гусарова

Подписано к печати

Заказ №

Тираж

Отпечатано на ризографе

**Редакционно-издательский отдел**  
**Университета ИТМО**  
197101, Санкт-Петербург, Кронверкский пр., 49