

В. А. СЕРЕБРЯКОВ

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЛАЗЕРНОГО ИК-ИЗЛУЧЕНИЯ С БИОЛОГИЧЕСКИМИ ТКАНЯМИ. ЛАЗЕРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЗАБОЛЕВАНИЙ

Рассматриваются вопросы взаимодействия лазерного излучения с биотканями. Обсуждаются перспективы использования диагностических лазеров: газоанализаторов на основе перестраиваемых в среднем ИК-диапазоне спектра диодных лазеров, когерентных томографов с ультравысоким разрешением на базе широкополосных источников света и терагерцовых томографов.

Ключевые слова: газоанализатор, когерентная томография, фемтосекундный лазер, фоновно-кристаллические волокна, терагерцовый диапазон.

Введение. Квантовая электроника в последние десятилетия стала одним из ведущих направлений науки и техники. Для лазерного излучения характерны: монохроматичность, острая направленность, когерентность и поляризация. Уникальное сочетание этих свойств позволяет реализовать различные механизмы взаимодействия — как тепловые (плазмообразование, абляция, испарение, плавление, нагрев), так и не тепловые (спектрально-резонансные) воздействия на вещество, оказывающие влияние на сложные атомные и молекулярные системы.

Естественно, что одной из первых возникла идея о применении лазерного излучения в медицине. Вместе с тем сложилось понимание того, что каждый вид лазерной операции и каждая лазерная методика требуют специфического сочетания основных параметров лазерного излучения и знания механизмов его взаимодействия с различными тканями [1].

Сегодня достаточно условно можно выделить три основные области применения лазеров в медицине:

— низкоинтенсивная лазеротерапия — облучение низкоинтенсивными лазерами крови человека или плохо заживающих ран, а в сочетании с фотосенсибилизаторами (фотодинамическая терапия) избирательное разрушение клеток раковой опухоли, лечение дегенерации макулы (желтое пятно на сетчатке глаза);

— лазерная термотерапия и хирургия — использование мощных (высокоэнергетических) лазеров в качестве хирургического инструмента в офтальмологии, косметологии, оториноларингологии, урологии: световой скальпель вызывает необратимые изменения в тканях — коагуляцию, испарение или абляцию ткани;

— методы неинвазивной диагностики — лазерный спектральный анализ молекул-биомаркеров в выдыхаемом воздухе при заболеваниях желудочно-кишечного тракта; оптическая томография, в том числе в терагерцовом (ТГц) диапазоне, — перспективный метод диагностики офтальмологических и раковых заболеваний.

Именно в диагностиках используются такие уникальные свойства лазерного излучения, как высокая *когерентность и поляризация*, отличающие его от обычного, пусть даже монохроматического света.

В настоящее время сектор продаж диагностических лазеров и, в первую очередь, оптических когерентных томографов показывает (по данным “Laser Focus World”, 2008 г.) ежегодный прирост в 25 % (более 15 % от полной суммы продаж медицинских лазеров).

Лазерный газоанализатор. Мысль о том, что некоторые заболевания можно обнаружить по запаху изо рта, высказал еще Гиппократ. Сегодня проведение тестов выдыхаемого воздуха на алкоголь или наличие специфических продуктов расщепления питательных веществ, свидетельствующих о присутствии в организме тех или иных бактерий (например, отвечающих за развитие язвенной болезни), получило широкое распространение [2].

Состав выдыхаемого воздуха, в котором содержатся следы около 600 летучих соединений, образуемых в организме, напрямую связан с биохимическими и физиологическими процессами, что позволяет использовать некоторые молекулы, имеющие высокую специфичность образования, в качестве биомаркеров (см. таблицу).

Молекула-биомаркер	Заболевание или стрессорная нагрузка
Оксид азота (NO)	Хронические инфекционные воспаления (гастрит, колит, язвенная болезнь)
Аммиак (NH ₃)	Острая и хроническая лучевая болезнь
Ацетон	Сахарный диабет
Метанол, этанол	Алкоголизм
Оксид углерода (CO)	Инфекция дыхательных путей, астма

Газоаналитический метод является альтернативой методам диагностики, основанным на анализе крови, или изотопной масс-спектрометрии в гастроэнтерологии. Реализация газоаналитического метода осуществляется в реальном масштабе времени, что в перспективе позволит диагностировать развитие заболеваний (таких, как диабет, рак внутренних органов, цирроз печени и др.) на более ранних стадиях.

В дальнем и среднем ИК-диапазонах излучения (2—40 мкм) расположены колебательно-вращательные (КВ) спектры поглощения большого числа молекул. КВ-спектры определяются симметрией и химическим составом молекул, что позволяет с высокой точностью отнести отдельные спектральные линии к поглощающему химическому соединению [3].

Детектирование следов молекул в выдыхаемом воздухе — одна из наиболее сложных задач газового анализа, что связано, с одной стороны, с очень низкими концентрациями исследуемых соединений (1—100 млн⁻¹), а с другой — с высоким содержанием CO₂ и H₂O, на несколько порядков превышающим концентрации исследуемых молекул. Это заставляет выбирать для анализа наиболее интенсивные линии поглощения молекул, располагающиеся в „окнах прозрачности“ в спектрах пропускания H₂O и CO₂.

В начале 80-х гг. прошлого века создание лазерного ИК-газоанализатора базировалось на достаточно сложной схеме с использованием нелинейных преобразований частоты излучения твердотельных лазеров. Сегодня наиболее эффективным методом газового анализа является диодная лазерная ИК-спектроскопия, что обусловлено сочетанием узкой линии спектра ($\Delta\lambda/\lambda < 10^{-7}$) и широкодиапазонной перестройки частоты генерации узкозонных полупроводников (тройные и четверные соединения PbS_nTe, PbSSe, PbE_nS_eTe) в диапазоне 2—40 мкм.

Низкий уровень амплитудных и частотных шумов полупроводниковых диодных лазеров позволяет регистрировать резонансное поглощение в отдельных линиях КВ-спектров исследуемых молекул с чувствительностью к изменению оптической плотности вплоть до 10⁻⁷ и спектральным разрешением примерно 3·10⁻⁴ см⁻¹. Метод вычисления концентрации эндогенного газа основан на сравнении контуров линий поглощения в аналитическом и реперном ка-

налах, с учетом столкновительного и доплеровского уширения, и близок по своей сути к критерию Рэлея, который применяется для оценки разрешающей способности спектральных приборов.

Газоанализатор (рис. 1) функционально включает в себя диодный лазер *1* в качестве источника излучения с системой стабилизации температуры; две оптические кюветы: одна *7* — многопроходная с перестраиваемой длиной оптического пути (от 1 до 100 м), другая *6* — реперная, короткая — длиной 5 см; два приемника излучения *2* соответственно в аналитическом и реперном каналах и оптическую систему *3—5* [4].

Например, величина резонансного поглощения аммиака $^{14}\text{NH}_3$ даже для самых интенсивных линий основной изотопической модификации NH_3 на порядки меньше, чем для линий H_2O или CO_2 . Обнаружение следов аммиака в выдыхаемом воздухе ($^{14}\text{NH}_3$ — 10^{-7}) требует чувствительности анализа, превышающей 10^{-7} . Такую чувствительность можно реализовать при использовании КВ-полосы поглощения $\nu_2(0100a — 0000c)$, линии которой расположены в диапазоне 9—11 мкм. Снижение общего давления анализируемой газовой смеси является высокоэффективным в целях улучшения условий детектирования слабого резонансного поглощения при интерференции спектров поглощения. При прямом детектировании переход от атмосферного давления к давлению около 50 мм рт.ст. обеспечивает обнаружение $^{14}\text{NH}_3$ с концентрацией на три порядка меньшей.

Однако ни методика диагностики, ни лабораторная установка по количественному определению ацетона в выдохе диабетиков пока не разработаны.

Лазерная томография как метод диагностики заболеваний. Томография — метод неразрушающего послойного исследования внутренней структуры объекта посредством многократного его просвечивания в различных пересекающихся направлениях (так называемое сканирующее просвечивание). Различают методы томографии *с облучением* пациентов (обычная рентгеновская, появившаяся в конце 1960-х гг., или так называемая классическая; компьютерная рентгеновская 1963 г.; радионуклидная, или эмиссионная), и *не связанные с облучением* (ультразвуковая и магнитно-резонансная).

В настоящее время внутренние органы диагностируют, в первую очередь, рентгеновским и ультразвуковым методами. Эти методы обладают высоким пространственным разрешением, давая точную структурную информацию. Однако они имеют один общий недостаток: не всегда позволяют определить, является ли исследуемое пятно опухолью, и если является, то доброкачественная она или злокачественная.

Лазерная томография и, прежде всего, оптическая когерентная томография (ОКТ) позволяет в реальном времени создавать изображение поперечных сечений ткани, полученных при лазерном облучении с различных направлений, с разрешением в несколько микрометров на глубине до нескольких миллиметров. Метод ОКТ используется при изучении патологии глаза, перфузии крови, оксигенации тканей, неоваскуляризации в мозгу и груди.

Оптическая когерентная томография позволяет получить изображение в сильно рассеивающих средах. Принцип действия когерентного томографа (КТ) представлен на рис. 2 [5]. Рассеянный объектом пучок в интерферометре Майкельсона (одно зеркало интерферометра заменяется биотканью, а второе плечо имеет прецизионно перемещаемое зеркало) интерферирует с опорным. Изменяя задержку между ними, можно получить интерференционный сигнал с разной глубины (z) биоткани. Задержка непрерывно изменяется, благодаря чему

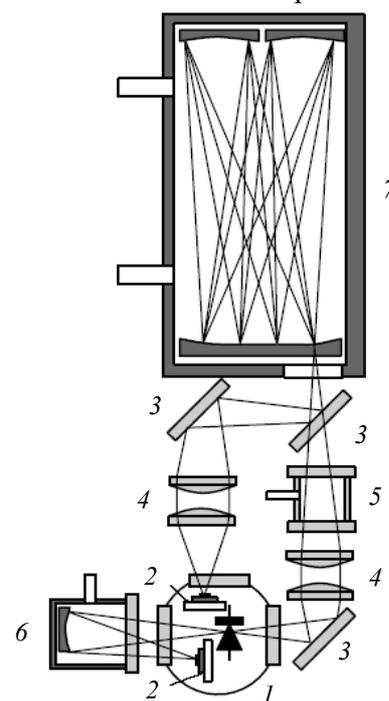


Рис. 1

частота света в одном из пучков смещается вследствие эффекта Доплера. Это позволяет выделить сигнал интерференции на сильном фоне, обусловленном рассеянием. С помощью сканирования и обработки сигналов строятся изображения разных исследуемых слоев биологической ткани в реальном масштабе времени.

Пространственное (аксиальное) разрешение по глубине $\Delta z = l_k/2 = 0,44\lambda^2/\Delta\lambda$ определяется временной когерентностью светового источника (l_k — длина когерентности): чем меньше когерентность, тем меньше минимальная толщина среза изображения исследуемого объекта.

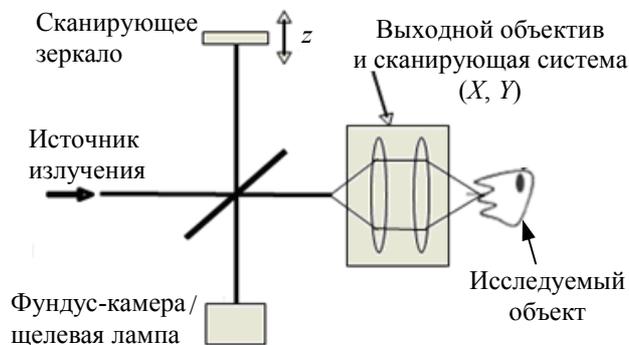


Рис. 2

Оптические когерентные томографы на основе суперлюминесцентных диодов (СЛД) имеют аксиальное разрешение $\Delta z = 10...15$ мкм (ограничено шириной полосы излучения диодов $\Delta\lambda \approx 32$ нм) и обеспечивают более детальную структурную информацию по сравнению с другими неинвазивными методами формирования изображения (правда, сильное рассеяние света в биотканях не позволяет получать изображение при $z > 2...3$ мм). Так как когерентный

томограф основан на волоконной оптике, то, в частности, офтальмологический КТ легко встраивается в щелевую лампу или фундус-камеру (предназначена для исследования глазного дна).

Когерентная ИК-томография с ультравысоким осевым разрешением. Разработка нового поколения оптических КТ осуществляется как путем повышения аксиального разрешения Δz посредством расширения спектральной полосы излучения $\Delta\lambda$ (рис. 3), так и путем увеличения глубины проникновения излучения в ткань. На основе широкополосного $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$ -лазера ($\lambda = 800$ нм, длительность импульса $\tau = 5,4$ фс, $\Delta\lambda = 350$ нм) был разработан когерентный томограф с ультравысоким (около 1 мкм) осевым разрешением, на порядок превосходящим уровень разрешения стандартного КТ, использующего суперлюминесцентные диоды. В результате удалось получить *in vivo** с глубины сильно рассеивающей ткани изображение биологических клеток с пространственным разрешением, близким к дифракционному пределу оптической микроскопии, что позволяет проводить биопсию ткани непосредственно во время операции.

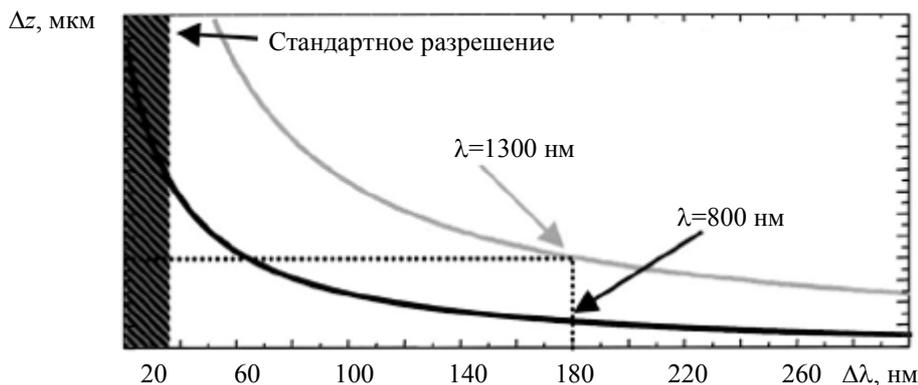


Рис. 3

Так как рассеяние сильно зависит от длины волны, уменьшаясь с ее увеличением, то большая глубина проникновения в непрозрачную ткань может быть достигнута при значении $\lambda > 0,8$ мкм. Для получения изображения структуры непрозрачных биотканей оптимальное значение $\lambda = 1,3...1,5$ мкм. Широкополосный фемтосекундный Cr:форстеритовый лазер ($\lambda = 1250$ нм) позволяет получить ОКТ-изображение с аксиальным разрешением $\Delta z \approx 6$ мкм при $z \leq 2...3$ мм.

* *in vivo* — букв.: на живом организме.

Фононно-кристаллические волокна (ФКВ) с высокой нелинейностью используются для генерации в еще более широком спектре. Фемтосекундные $\text{Ti}:\text{Al}_2\text{O}_3$ -лазеры с ФКВ генерируют на выходе низкокогерентные импульсы с ультраширокой полосой ($\lambda=500\dots1600$ нм). При использовании безаберрационного объектива аксиальное разрешение КТ достигает 1,1—3 мкм.

Графики зависимости $S(\lambda)$ спектральной плотности излучения широкополосных лазеров представлены на рис. 4.

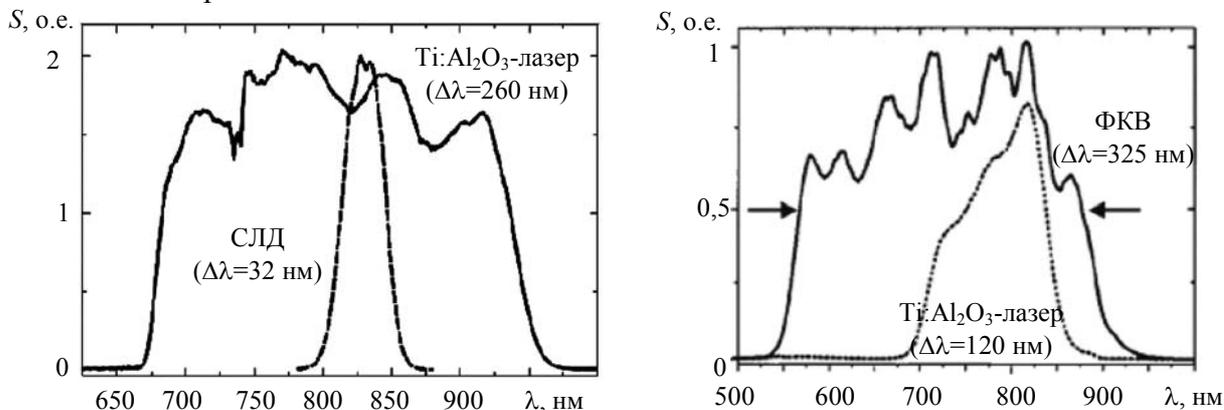


Рис. 4

Следует отметить, что при ультраширокой полосе излучения возникают новые проблемы, такие как хроматическая aberrация оптики и дисперсия групповой скорости света.

Аксиальная разрешающая способность ОКТ на 2 порядка величины превышает разрешающую способность УЗИ-томографии при неинвазивном исследовании внутренней структуры ткани. Максимальная глубина формируемого изображения в большинстве тканей (кроме глаза) ограничена оптическим поглощением и рассеянием ($z_{\max} \approx 1\dots2$ мм). Однако благодаря субклеточному внутритканевому разрешению *in vivo*, значение которого стремится к предельному разрешению *in vitro** конфокального микроскопа, эта методика расширяет возможности диагностики заболеваний: в частности, ранней диагностики рака, а также обнаружения различных глазных патологий, ведущих к слепоте.

Маловероятно, что ОКТ заменит инвазивную биопсию или гистологию, однако она позволит существенно расширить понимание патогенеза и терапии ряда тяжелых заболеваний [6].

Спектроскопическая оптическая когерентная томография. Спектроскопическая ОКТ — новая диагностическая методика, использующая фемтосекундные $\text{Ti}:\text{Al}_2\text{O}_3$ -лазеры с широкой полосой спектра при $\lambda=800$ нм, не только обладает субклеточным разрешением ОКТ, которое недоступно для источников непрерывного излучения, но и обеспечивает также получение спектроскопической информации по всей ширине спектральной полосы излучения, перекрывающей спектр поглощения ряда биологических хромофоров. А использование внешних контрастных компаундов, меняющих специфические параметры молекул, таких как время люминесценции или эмиссионный спектр, делает ОКТ потенциальной альтернативой *in vivo* диагностическим методам — позитронно-эмиссионной и магнитно-резонансной томографии.

Концептуально получение спектроскопической информации заключается в использовании нескольких широкополосных источников света с различными центральными длинами волн. Томограммы одной и той же пространственной области, но формируемые разными световыми источниками, сравниваются для извлечения спектроскопической информации. Спектр излучения фемтосекундных лазеров или широкополосных источников для увеличения осевой разрешающей способности томограмм разбивается на ряд поддиапазонов, каждый из которых детектируется как отдельный канал.

* *in vitro* — букв.: вне живого организма.

В стандартном ОКТ-изображении детектируется только огибающая интерференционного сигнала. Спектральная информация может быть получена путем измерения полного интерференционного ОКТ-сигнала с использованием числовой постобработки, например солитоноподобного (вейвлет) преобразования Морле.

Разделение спектральной полосы излучения на ряд каналов реализуется на выходе интерферометра после облучения образца полным спектром.

Например, болезнь Альцгеймера характеризуется образованием в мозгу бляшек размером 10—100 мкм. В сильно рассеивающей ткани мозга стандартная томографическая техника не позволяет получить разрешение, превышающее 0,5—1 мм. Экспериментально показано, что бляшки могут быть обнаружены люминесцентной ОКТ *in vivo*, без предварительного просвечивания мозга другими методами, и измерены с прецизионным пространственным разрешением [7—9].

Терагерцовая томография. Попытка увеличить глубину регистрации изображения в ткани была предпринята с помощью ТГц-лазеров. Область электромагнитного спектра от 0,1 до 10 ТГц ($\lambda=3$ мм...30 мкм) — пограничная область для исследования в физике, химии, биологии и медицине. В ТГц-диапазоне находятся биологически важные коллективные колебания белков.

Метод терагерцовой времяпролетной спектроскопии позволяет получить информацию при $z \leq 1...2$ см (в зависимости от содержания в ткани воды) и высокое разрешение (около 100 мкм) изображения биологических объектов. Этот метод получил быстрое развитие в основном вследствие коммерциализации ИК-лазеров с длительностью импульса $\tau \approx 100$ фс и мощностью, достаточной для возбуждения ТГц-излучения [10—11].

Компьютерная ТГц-томография позволяет реконструировать трехмерный профиль показателя преломления слабо рассеивающих объектов (типичное изображение размером 100×100 пикселей, измеренное под 18 проекционными углами может быть получено в течение 1 ч).

Светоделитель разделяет 100 фс-импульсы излучения ($\lambda = 800$ нм) на два пучка: пучок накачки, используемый для ТГц-генерации (0,1—2,7 ТГц, 1 мВт) на GaAs-широкоапертурной антенне (напряжение смещения более 1 кВ), и пробный пучок для детектирования. Излучаемые ТГц-импульсы коллимируются серией параболических внеосевых зеркал и фокусируются на образец с одновременным растровым сканированием в плоскости x , y для получения изображения. Отраженные от ткани ТГц-импульсы повторно коллимируются другой серией параболических зеркал и фокусируются на ZnTe-детектор.

Детектирование достигается за счет линейного электрооптического эффекта Погкельса. ТГц-излучение вызывает в кристалле ZnTe двойное лучепреломление. Оно фиксируется пробным лучом, поляризация которого меняется от круговой до эллиптической. Изменения, пропорциональные терагерцовому электрическому полю, детектируются балансными фотодиодами, создавая ТГц-изображение образца.

Вследствие ограниченной глубины проникновения ТГц-излучения в ткань основными областями применения этого метода являются дерматология и стоматология. Один из примеров применения ТГц-излучения — возможность определения размеров и глубины злокачественной опухоли: см., например, рис. 5, где представлено изображение меланомы, изменяющееся в зависимости от длины волны ТГц-излучения.

Другим примером может служить возможность обнаружения зубного кариеса, который не детектируется рентгеновским изображением (рис. 6).

Наряду с проблемой получения изображения при $z > 1...2$ мм в гидратированных тканях, другой фундаментальной проблемой ТГц-измерений является низкая разрешающая способность изображений. Решением этой проблемы может стать известный метод „сканирующей ближнепольной микроскопии“. Это решение сопровождается новой проблемой, а именно,

длительной записью изображения. Другой недостаток метода — трудность реализации *in vivo*, однако он может быть использован *in vitro* для получения изображения с высоким разрешением на препарированных образцах [12].

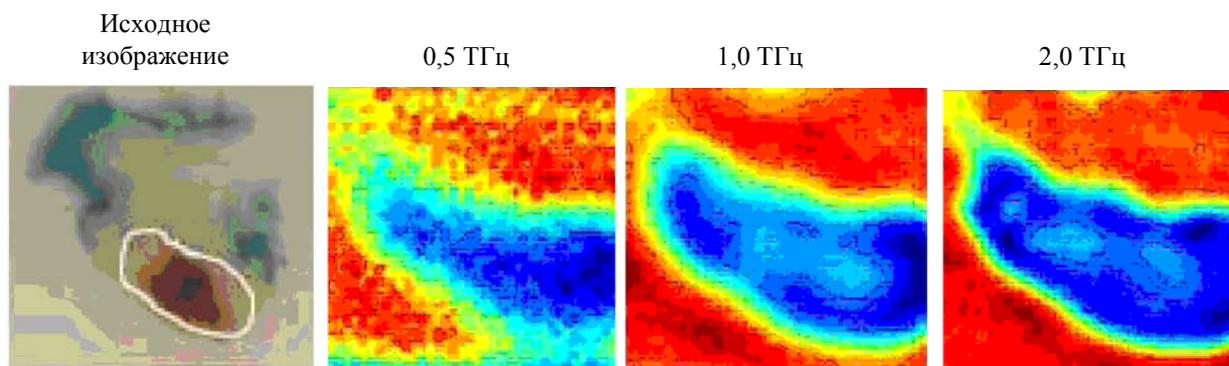


Рис. 5

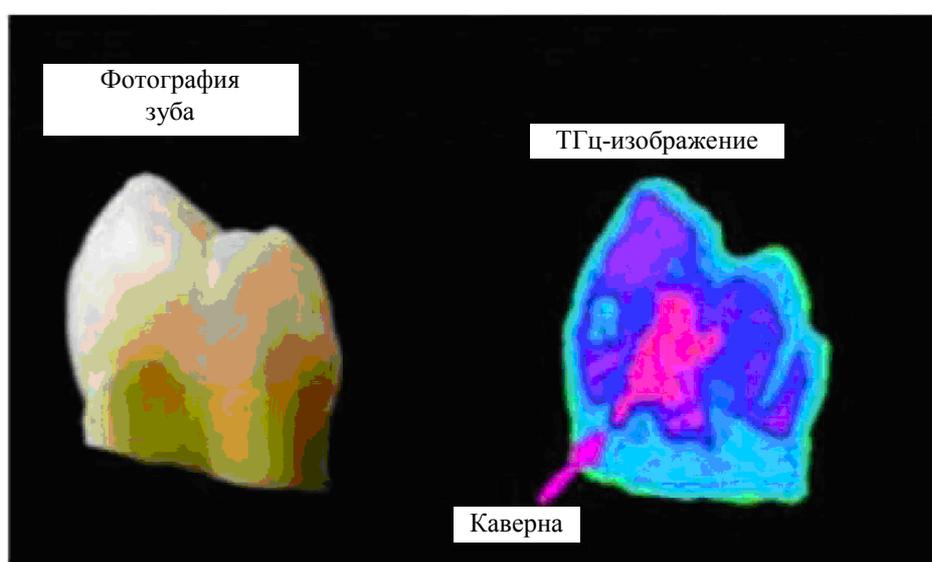


Рис. 6

Просвечивающая импульсная ТГц-спектроскопия также позволяет изучать изменение структуры (эффекты ион-ионной свертки белков) и гидратацию ферментных белков в водной среде, поскольку колебания молекул белков изменяются не только в зависимости от ее температуры, но также и в ответ на близость молекул воды. Низкочастотные коллективные моды колебаний молекул белков связаны, по-видимому, с колебаниями окружающих их молекул воды. Однако прямое измерение этих низкочастотных движений затруднено стандартными методиками типа нейтронного рассеивания [13].

Заключение. Лазеры заняли уже весьма заметную нишу в диагностике заболеваний. Это касается, в первую очередь, оптической когерентной томографии, без использования которой сегодня нельзя представить лечение ретинопатии, глаукомы и других серьезных глазных болезней. Однако поглощение и сильное рассеяние ткани и относительно небольшое поле зрения КТ ограничивает применение этого метода при исследовании патологий в плотных тканях. В настоящее время разрабатывается новый перспективный метод спектроскопической ОКТ, который может быть применен не только в офтальмологии, но и при томографии мозга или маммографии.

Терагерцовая томография, похоже, ограничена применением только *in vitro* вследствие сильного поглощения воды в ТГц-диапазоне. Тем не менее, уже разрабатываются предложения

по использованию ТГц-излучения в фармацевтической промышленности для прецизионного контроля качества (состава) лекарств, которые выпускаются в виде таблеток [14].

Продолжаются работы над лазерным газоанализатором (здесь очевидны проблемы повышения чувствительности и контраста детектируемых линий молекул-биомаркеров, т.е. проблемы приемного тракта), а также по лазерной диагностике вирусов и живых клеток при изучении патологических состояний тканей, кинетики роста и рецидива опухолей и т.д.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Прикладная лазерная медицина: Сб. М.—Берлин: Центр лазерной и медицинской технологии, 1997.
2. Бритов А. Д. и др. Медицинский газоанализатор на лазерах и фотоприемниках ближнего ИК-диапазона // Прикладная физика. 1999. № 2.
3. Степанов Е. В., Миляев В. А. Применение перестраиваемых диодных лазеров для высокочувствительного анализа газообразных биомаркеров в выдыхаемом воздухе // Квантовая электроника. 2002. Т. 32, № 11.
4. Wallace J. Analysis of human breath holds key to disease // Proc. of CDT. 2008.
5. Drexler W. Ultrahigh-resolution and functional OCT // Light Source Technology & Applications / Med. Univ. Vienna, 2005.
6. Drexler W. Ultrahigh-resolution optical coherence tomography // J. of Biomedical Optics. 2004. N 9(1).
7. Wolbarst A. B., Hendee W. R. Evolving and experimental technologies in medical imaging // Radiology. 2006. Vol. 238(1).
8. Zawadzki R. J., Cense B. et al. Medical OCT: Ultrahigh-resolution optical coherence tomography gets adaptive-optic 'glasses' // Proc. of CST. 2008. Dec.
9. Kumar A. T. N. et al. Time Domain Fluorescence Diffuse Optical Tomography: Application to Non-Invasive Diagnosis of Alzheimer's Pathologies in Mice Brain. MA: Harvard Medical School, 2006.
10. Woodward R. M. Terahertz pulse imaging in reflection geometry of human skin cancer and skin tissue // Phys. Med. Biol. 2002. N 47. P. 3853—3863.
11. Wang S. T-ray imaging and tomography // Biol. Phys. 2003. N 29. P. 247—256.
12. Opportunities in THz science // DOE-NSF-NIH Workshop. Arlington, VA, 2004.
13. Xu J., Galan J., Savvidis P. et al. Terahertz circular dichroism spectroscopy of biomolecules // SPIE. 2004. Vol. 5268. P. 19—26.
14. Назаров М. М., Манькова А. М., Черкасова О. П. и др. Применение терагерцовой спектроскопии для исследования биологических молекул // Тр. VI Междунар. конф. молодых ученых и специалистов „Оптика — 2009“. СПб: СПбГУ ИТМО, 2009. С. 136—138.

Сведения об авторе

Виктор Анатольевич Серебряков — д-р физ.-мат. наук, профессор; Санкт-Петербургский государственный университет информационных технологий, механики и оптики, кафедра лазерных технологий и экологического приборостроения;
E-mail: serebryakov@hotmail.ru

Рекомендована кафедрой
лазерных технологий
и экологического приборостроения

Поступила в редакцию
07.12.09 г.