

Прямое измерение пространственного распределения интенсивности лазерного излучения в биологических средах *in vitro* оптико-акустическим методом

И.М.Пеливанов, С.А.Белов, В.С.Соломатин, Т.Д.Хохлова, А.А.Карабутов

Рассмотрена задача оптико-акустической (ОА) диагностики светорассеяния и светопоглощения биологических сред. В качестве исследуемых объектов использовались молоко, говяжья печень, свиная печень и говяжья мышечная ткань. В экспериментах применялись схемы прямой и косвенной регистрации акустических сигналов. Для каждой биологической среды по временному профилю возбуждаемого ОА импульса измерено пространственное распределение интенсивности света и определены оптические характеристики (коэффициент поглощения и приведенный коэффициент рассеяния). Для возбуждения ОА сигналов использовалось излучение основной гармоники импульсного Nd:YAG-лазера ($\lambda = 1064$ нм), а также излучение перестраиваемого Ti:сапфирового лазера ($\lambda = 779$ нм). Показано, что предложенный метод может быть применен для получения априорной информации о биологической среде в задачах оптической и ОА томографии.

Ключевые слова: оптика биотканей, коэффициент поглощения, коэффициент рассеяния, лазерная оптоакустика.

1. Введение

В последнее десятилетие лазеры находят все большее применение в различных задачах диагностики биологических сред и тканей [1]. Привлекательность оптических методов очевидна ввиду неинвазивного характера проводимых исследований. Важное место среди них занимают методы визуализации поглощающих неоднородностей – томографические методы, такие как оптическая (см., напр., [2–4]) и оптико-акустическая (ОА) [5–11] томография. В обоих случаях контраст получаемых изображений определяется различием в коэффициентах поглощения неоднородности (например, злокачественной или доброкачественной опухоли) и окружающей ее ткани [2, 11].

Биологические ткани в видимом и ближнем ИК диапазонах спектра представляют собой сильно рассеивающие среды [12]. Это обстоятельство существенно снижает возможности томографических систем, ограничивая глубину зондирования (максимальное расстояние от поверхности среды до неоднородности того или иного типа, где она еще может быть обнаружена) и минимальный размер объектов, изображение которых может быть получено. Кроме того, для определения оптимальной длины волны и построения алгоритмов решения обратных задач томографии необходимы априорные данные об оптических свойствах изучаемых тканей.

Таким образом, исследование распределения лазерного излучения в оптически мутных средах остается по-прежнему актуальным. Большой прогресс в измерении оптических характеристик биологических тканей *in vivo* достигнут в последнее время благодаря использованию

методов, основанных на регистрации рассеянного назад средой оптического излучения. Здесь можно выделить спектроскопию с частотным [13–16], пространственным [17, 18] и временным [19–22] разрешением.

Отметим, что среди этих методов метод спектроскопии с временным разрешением является наиболее развитым. Измерения основаны на регистрации временной формы рассеянного средой назад пикосекундного лазерного импульса. Его временная задержка относительно опорного (нерассеянного) импульса определяет коэффициент рассеяния среды, а скорость экспоненциального спада – коэффициент поглощения (см., напр., [19]). Таким образом, вклады поглощения и рассеяния учитываются раздельно. При расчетах в качестве теоретической модели обычно используется диффузионное приближение уравнения переноса излучения. Для измерений наиболее подходящим является излучение импульсного пикосекундного Ti:сапфирового лазера, перестраиваемого в диапазоне длин волн 600–1100 нм, или излучения нескольких диодных лазеров, работающих в этом же диапазоне. В работе [22] показано, что данная техника может быть использована в клинических условиях. Получены спектры поглощения и рассеяния основных тканей человека [21, 23].

Несмотря на многочисленные преимущества вышеуказанных методов, они имеют и недостатки. Основным из них является используемое в расчетах предположение об однородности среды. Уже в случае двухслойной среды при восстановлении ее оптических свойств возникают существенные, практически непреодолимые трудности [24]. Профиль рассеянного средой сигнала не имеет резких искажений, связанных с наличием в ней слоев или неоднородностей. Поэтому рассчитываемые оптические коэффициенты содержат лишь некоторую интегральную информацию о среде.

Таким образом, необходимость локального и прямого измерения распределения интенсивности лазерного излучения в биологических средах по-прежнему остается

И.М.Пеливанов, С.А.Белов, В.С.Соломатин, Т.Д.Хохлова, А.А.Карабутов. Международный учебно-научный лазерный центр МГУ им. М.В.Ломоносова, Россия, 119992 Москва, Воробьевы горы; e-mail: pelivanov@ilc.edu.ru, t_khokhlova@ilc.edu.ru

ся актуальной. Частично данная проблема может быть решена при использовании оптического когерентного томографа [25–27], дающего изображения с пространственным разрешением 5–20 мкм. Однако глубина зондирования при этом ограничена сильным светорассеянием и составляет не более 2–3 мм.

ОА метод основан на локальном термооптическом возбуждении акустических сигналов в среде при поглощении ею импульсного лазерного излучения. При наносекундном лазерном воздействии диффузией тепла за время действия лазерного импульса можно пренебречь. Если ширина лазерного пучка больше характерной глубины проникновения света в среду μ_{eff}^{-1} (где $\mu_{\text{eff}} = (3\mu_a\mu'_s)^{1/2}$ – коэффициент экстинкции, μ_a и μ'_s – коэффициент поглощения и приведенный коэффициент рассеяния соответственно), то профиль ОА импульса повторяет распределение тепловыделения по глубине среды, т.е. пространственное распределение интенсивности поглощенного излучения. На сегодняшний день методы ОА микроскопии [5, 28, 29] и томографии [9, 10, 30] находятся в процессе разработки и совершенствования.

Авторы [31, 32] предложили использовать ОА эффект в задаче прямого измерения пространственного распределения интенсивности лазерного излучения в рассеивающих средах и оптических характеристик таких сред. Было показано, что оптические свойства мутных сред могут быть определены по временной форме возбуждаемого ОА импульса.

Цель настоящей работы заключалась в том, чтобы продемонстрировать возможность применения ранее разработанного ОА метода [32] для прямых измерений *in vitro* пространственного распределения интенсивности света в биологических средах и определения их оптических свойств.

2. Исследуемые среды

При исследовании биологических объектов необходимо помнить, что процедура приготовления образцов и сам процесс диагностики могут приводить к их необратимым изменениям. При измерениях, проводимых с биотканями *in vitro*, такие изменения происходят всегда. Поэтому для адекватности понимания полученных в работе результатов ниже мы опишем процесс приготовления образцов, предшествующий проведению ОА измерений.

Итак, все исследуемые биологические объекты (говяжья и свиная печень, говяжья мышечная ткань) хранились не более 72 ч после извлечения из живого организма и не поддавались глубоким температурным воздействиям (заморозка, высокотемпературный нагрев). Вырезались образцы размером 3 × 3 см и толщиной 2 см, которые затем помещались на некоторое время в сосуд с дистиллированной водой. В сосуде путем частичной откачки воздуха создавалось пониженное давление, составлявшее около 0.5 атм. Данная процедура позволяла извлечь из исследуемых биотканей воздушные пузыри, сильно искажающие временной профиль возбуждаемых в биотканях ОА сигналов. При этом также происходила частичная потеря крови. Эксперименты проводились для нескольких образцов ткани одного вида, но принадлежащих разным животным, а также в пространственно разных частях одного образца. Ниже в табл.1 приведены статистически усредненные результаты измерений.

В процессе измерений плотность энергии лазерного излучения E_0 , падающего на исследуемый объект, была менее 3 и 10 мДж/см² для длин волн $\lambda = 779$ и 1064 нм соответственно, что значительно меньше максимально допустимых норм [33]. Нагрев среды за один лазерный импульс [34]

$$\Delta T \approx \frac{\mu_a E_0}{\rho c_p} \quad (1)$$

(где ρ и c_p – плотность и теплоемкость среды) составлял менее сотой доли градуса, а за весь цикл измерений при усреднении по 128 реализациям – менее одного градуса. Таким образом, изменение оптических и теплофизических свойств сред за счет лазерного воздействия на них можно было не учитывать.

3. Оптико-акустический метод

Геометрия взаимного расположения излучателя и приемника акустических сигналов в задачах ОА диагностики может быть различной. В схеме прямой регистрации возбуждение и регистрация происходят с противоположных сторон исследуемой среды, в схеме косвенной регистрации – с одной стороны. Ниже мы рассмотрим экспериментальные результаты, полученные с использованием обеих схем регистрации, и сравним их.

3.1. Схема прямой регистрации

Схема ОА метода с прямой регистрацией акустических сигналов приведена на рис. 1. Исследуемая среда располагается между прозрачной для лазерного излучения пластиной, через которую она облучается, и поверхностью широкополосного пьезоэлектрического преобразователя. Этим обеспечивается контролируемая толщина среды и гладкость ее поверхностей.

При поглощении в нетеплопроводящей среде (длина диффузии тепла за время действия лазерного импульса τ_L много меньше глубины проникновения света в среду: $V_0\tau_L \gg \mu_{\text{eff}}^{-1}$) короткого лазерного импульса и диаметре

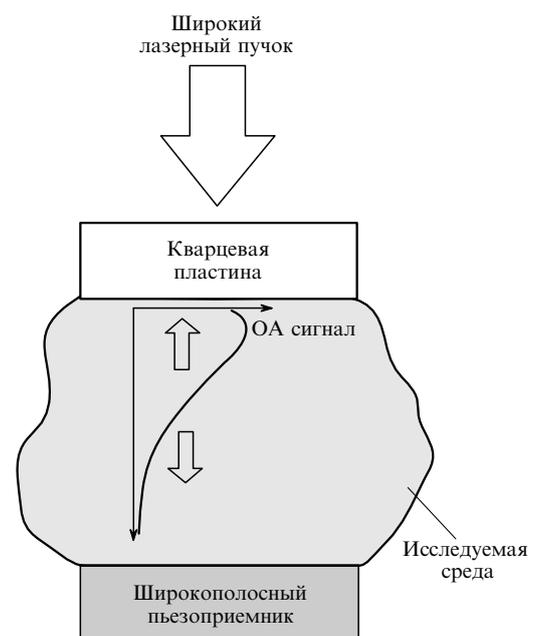


Рис.1. Принципиальная схема ОА метода в режиме прямой регистрации ультразвуковых сигналов.

лазерного пучка $d_0 \gg \mu_{\text{eff}}^{-1}$ выражение для временного профиля ОА сигнала, возбуждаемого в исследуемой среде, можно записать в виде [32, 34]

$$p_0(\tau = t - z/V_0) = \frac{\beta V_0^2}{2c_p} \mu_a E_0 \begin{cases} H(-V_0\tau), & \tau < 0, \\ R_{\text{ac}} H(V_0\tau), & \tau > 0, \end{cases} \quad (2)$$

где ось z направлена от границы в глубь среды; $R_{\text{ac}} = (1 - N)/(1 + N)$ – коэффициент отражения ультразвуковой волны от границы раздела рассеивающая среда – прозрачная среда; N – отношение акустических импедансов поглощающей и прозрачной сред; $H(z)$ – пространственное распределение интенсивности света в среде; V_0 – скорость звука в среде; β – коэффициент теплового расширения.

Передний фронт ОА сигнала $p_0(\tau < 0)$ повторяет пространственное распределение тепловыделения и, как видно из (2), пропорционален распределению интенсивности света в среде $H(z)$, причем временной масштаб изменения $p_0(\tau)$ и пространственный масштаб изменения $H(z)$ связаны через скорость звука в среде: $z = -V_0\tau$.

Характерной особенностью распределения $H(z)$ в мутных средах является то, что вследствие многократного рассеяния в приповерхностном слое на расстояниях $z_{\text{max}} \sim l^*$ (l^* – транспортная длина свободного пробега фотона в среде) появляется максимум интенсивности диффузного света [31]. Амплитуда этого максимума может превышать интенсивность падающего излучения в 4–6 раз.

В случае оптически однородной рассеивающей среды функция $H(z)$ по известным оптическим характеристикам (коэффициенту поглощения μ_a , коэффициенту рассеяния μ_s и фактору анизотропии g) может быть численно рассчитана методом Монте-Карло [35, 36], а на расстояниях $z > (2 \div 3)l^*$ аналитически выражается с помощью простой диффузионной модели [37]. Существуют также более строгие решения, например P_3 - или P_5 -приближение к решению уравнения переноса излучения [32].

Аппроксимируя фронт ОА импульса на расстояниях $z > (2 \div 3)l^*$ в исследуемой рассеивающей среде теоретической зависимостью, можно восстановить искомые оптические характеристики [31]. Например, коэффициент экстинкции $\mu_{\text{eff}} = (3\mu_a\mu_s')^{1/2}$ находится из экспоненциальной аппроксимации переднего фронта ОА импульса. Положение максимума $z_{\text{max}} = -\tau_{\text{max}}V_0$ пространственного распределения интенсивности света может быть также определено только из формы ОА сигнала [31], т. е. без абсолютной калибровки датчика давления. Как было показано нами в работе [32], зависимость $z_{\text{max}}\mu_{\text{eff}}$ от μ_a/μ_{eff} в диапазоне $0.05 < \mu_a/\mu_{\text{eff}} < 0.35$, типичном для биологических сред и тканей, является универсальной и позволяет получить эмпирическое выражение для определения коэффициента поглощения по экспериментально измеренным величинам μ_{eff} и z_{max} :

$$\mu_a = -0.074\mu_{\text{eff}} \ln(1 - 3.62z_{\text{max}}\mu_{\text{eff}}). \quad (3)$$

Затем, используя формулу $\mu_s' = \mu_{\text{eff}}^2/(3\mu_a)$, можно рассчитать значение приведенного коэффициента рассеяния μ_s' в исследуемой среде. Следует отметить, что данная методика определения z_{max} и μ_{eff} по временному профилю ОА сигнала возможна лишь при реализации схемы с прямой регистрацией ОА импульсов.

Таким образом, в [31, 32] был предложен и апробирован метод изучения пространственного распределения

интенсивности света и определения оптических коэффициентов в оптически однородных мутных средах на примерах модельной среды (взвеси частиц оксида титана TiO_2 в воде) и молока. В настоящей работе данный метод применялся для измерений в реальных биологических средах.

Для возбуждения ОА сигналов использовались излучение основной гармоники ($\lambda = 1064$ нм) импульсного Nd:YAG-лазера с модуляцией добротности и частотой следования импульсов 2 Гц (характерная длительность импульса $\tau_L = 10 - 12$ нс), а также излучение импульсного Ti:сапфирового лазера на $\lambda = 779$ нм с частотой следования импульсов 50 Гц ($\tau_L \approx 30$ нс). Основная часть излучения проходила через систему светорассеиватель – линза. Это позволяло получать близкий к коллимированному пучок с равномерным распределением интенсивности по его сечению, что обеспечивало одномерную геометрию измерений. Диаметр лазерного пучка на поверхности среды составлял около 3 см. Кювета с исследуемой средой накрывалась сверху кварцевым стеклом. Регистрация ОА сигналов осуществлялась широкополосным нерезонансным пьезоэлектрическим преобразователем, работающим в режиме холостого хода. Материалом пьезоэлемента служила полимерная пленка из поливинилденфторида (ПВДФ) толщиной 110 мкм, наклеенная на демпфирующую поверхность. Диаметр пьезоэлемента составлял 8 мм. Это обеспечивало практически равномерную в диапазоне частот 0.05–2 МГц чувствительность, равную при пятидесятикратном усилении 845 мкВ/Па. Минимальное давление регистрируемых ультразвуковых сигналов составляло единицы паскалей, динамический диапазон приемного тракта превышал 40 дБ. Преобразованный пьезоприемником акустический сигнал регистрировался цифровым осциллографом Tektronics TDS-220.

На рис.2,а и в приведены характерные зарегистрированные ОА сигналы. Например, экспериментально полученный сигнал в молоке имеет биполярную временную форму, тогда как в соответствии с (1) он должен был иметь однополярный профиль. На самом деле при распространении в среде широкополосный акустический сигнал испытывает дифракционную трансформацию [34, 38]. Низкие частоты подвержены ей сильнее, нежели высокие, что и приводит к искажению формы импульса. Устранить влияние дифракционных искажений можно аналитически следующим образом [38]:

$$p_0(\tau) = p_{\text{exp}}(\tau) + f_d \int_{-\infty}^{\tau} p_{\text{exp}}(t) dt, \quad (4)$$

где $p_{\text{exp}}(\tau)$ – зарегистрированный сигнал; $f_d = 2V_0L/r^2$; r – радиус лазерного пучка на поверхности среды; L – толщина среды. Другим фактором, влияющим на временную форму зарегистрированного сигнала, является неравномерность частотной характеристики приемника при частотах менее 50 кГц.

В настоящей работе для восстановления исходной формы возбуждаемого в исследуемой среде ОА импульса использовалась процедура обратной свертки. Суть ее заключается в следующем. Каждый раз перед проведением измерений в рассеивающей среде регистрируется отклик системы на сигнал от сильно поглощающей, нерассеивающей пробной среды (спектральную амплитуду которого в диапазоне 0–2 МГц можно считать постоян-

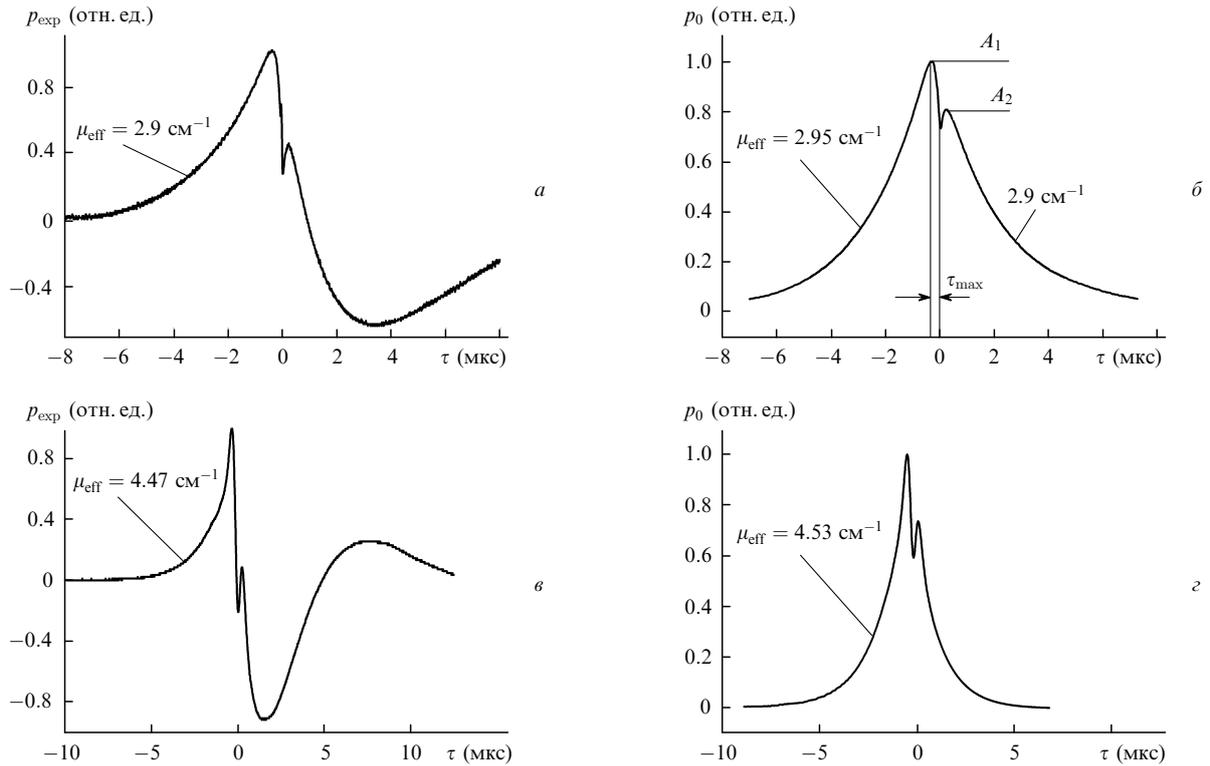


Рис.2. Характерные временные профили ОА импульсов, зарегистрированных в молоке (а) и свиной печени (в), а также профили соответствующих восстановленных сигналов (б и г) в этих же средах после процедуры обратной свертки.

ной), причем условия облучения, акустические свойства и толщина пробной среды должны быть такими же, как и для рассеивающей. Поскольку искажающие профиль импульса давления факторы являются «линейными», их влияние на спектр пробного сигнала будет точно таким же, как и на спектр сигнала в рассеивающей среде. Таким образом, при обратной свертке с пробным сигналом влияние этих факторов будет устранено.

Восстановленный исходный профиль ОА импульса в рассеивающей среде приведен на рис.2,б. ОА сигнал до процедуры обратной свертки показан на рис.2,а. Для получения пробного сигнала от сильно поглощающей среды использовался водный раствор черной туши. Коэффициент поглощения света в нем μ_a измерялся по фронту ОА импульса и составлял 320 cm^{-1} . Для сравнения, коэффициент поглощения в молоке на $\lambda = 1064 \text{ nm}$ равен 0.17 cm^{-1} , что более чем в тысячу раз меньше μ_a в растворе черной туши, соответственно шире и диапазон возбуждаемых ультразвуковых частот.

Как видно из рис.2,а и б, после проведения процедуры обратной свертки сигнал становится однополярным, причем отношение амплитуд A_2/A_1 , равное 0.76, совпадает с теоретическим значением коэффициента отражения ультра-

звуковой волны от границы раздела прозрачная среда – рассеивающая среда (см. формулу (1)). Коэффициенты экстинкции μ_{eff} , определенные из аппроксимации переднего и заднего фронтов восстановленного импульса, в пределах погрешностей совпадают. Величина $z_{\text{max}} = V_0 \tau_{\text{max}} = 0.052 \text{ cm}$, определенная по временному профилю сигнала, представленного на рис.2,б, использовалась для расчета коэффициента поглощения света по формуле (3). Полученное значение $\mu_a = 0.17 \pm 0.01 \text{ cm}^{-1}$ хорошо согласуется с результатами нашей предыдущей работы [31]. Это позволяет считать, что восстановление временного профиля ОА сигнала методом обратной свертки является корректным.

На рис.2,в и г показаны временные профили ОА сигналов в свиной печени (зарегистрированного и после процедуры обратной свертки соответственно) при их возбуждении на $\lambda = 779 \text{ nm}$. Видно, что восстановление временного профиля также происходит корректно. Аналогичным образом были измерены и обработаны ОА сигналы в говяжьей печени и говяжьей мышечной ткани для длин волн возбуждающего излучения 779 и 1064 nm. Результаты расчета оптических характеристик исследуемых сред приведены в табл.1.

Табл.1.

Исследуемая среда	Схема прямой регистрации						Схема косвенной регистрации	
	$\mu_a (\text{cm}^{-1})$		$\mu'_s (\text{cm}^{-1})$		$\mu_{\text{eff}} (\text{cm}^{-1})$		$\mu_a (\text{cm}^{-1})$	
	1064 nm	779 nm	1064 nm	779 nm	1064 nm	779 nm	1064 nm	779 nm
Молоко	0.17 ± 0.01	0.041 ± 0.002	17 ± 1	24 ± 1	2.90 ± 0.03	1.71 ± 0.03	–	–
Свиная печень	0.17 ± 0.05	0.36 ± 0.04	5 ± 5	18 ± 2	2.8 ± 0.2	4.4 ± 0.3	0.14 ± 0.02	0.44 ± 0.07
Говяжья печень	0.11 ± 0.02	0.63 ± 0.07	23 ± 3	16 ± 2	2.7 ± 0.2	5.5 ± 0.3	0.13 ± 0.02	0.55 ± 0.09
Говяжья мышечная ткань	0.15 ± 0.03	0.08 ± 0.01	12 ± 2	20 ± 3	2.3 ± 0.3	2.2 ± 0.2	0.15 ± 0.03	0.06 ± 0.01

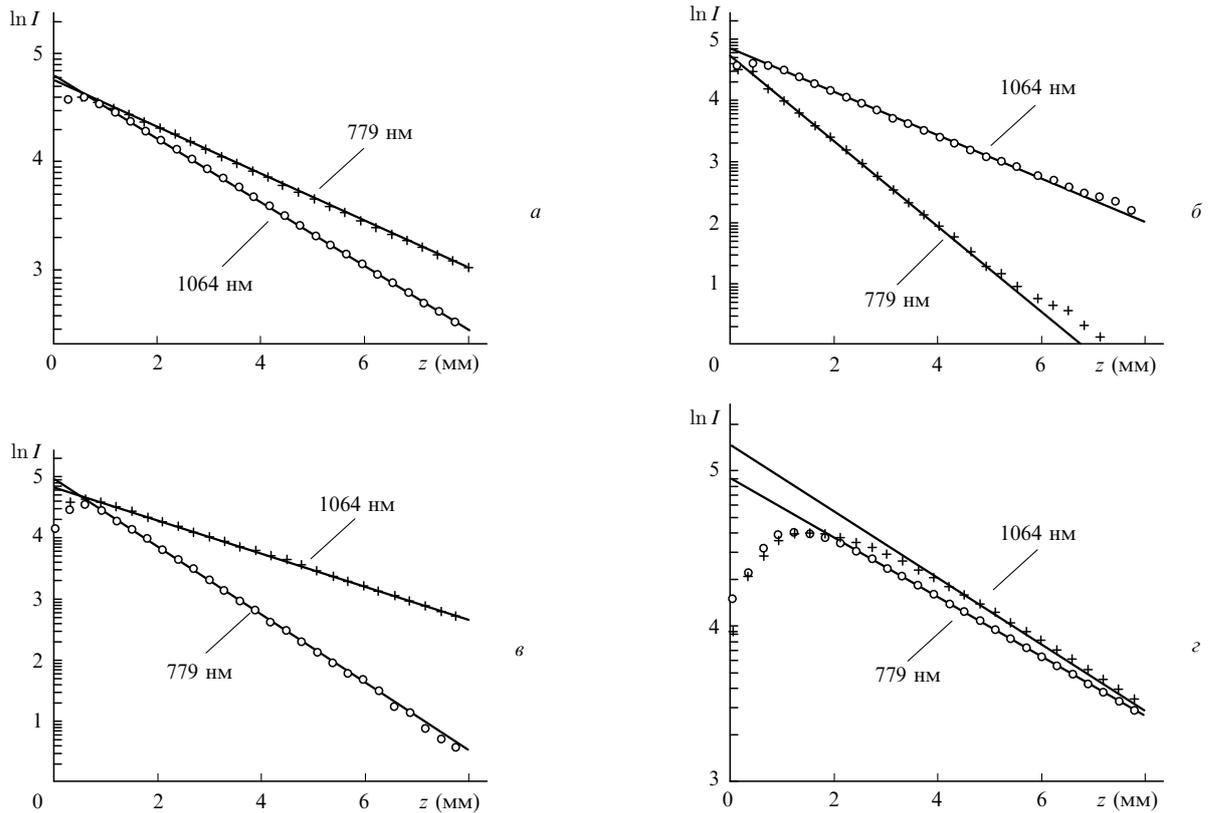


Рис.3. Распределение интенсивности (в отн. ед.) лазерного излучения по глубине в молоке (а), свиной печени (б), говяжьей печени (в) и говяжьей мышечной ткани (г). Точки – экспериментальные данные, сплошные линии – экспоненциальные аппроксимации.

Важной характеристикой биологических объектов с точки зрения их оптической диагностики является пространственное распределение интенсивности проникающего в среду лазерного излучения. Как уже отмечалось выше, фронт ОА сигнала повторяет пространственное распределение тепловыделения в среде, что позволяет измерять локальное распределение интенсивности лазерного излучения по глубине.

На рис.3 в логарифмическом масштабе приведены пространственные распределения интенсивности лазерного излучения в исследуемых средах, построенные с использованием временных профилей ОА сигналов $p_0(\tau < 0)$ (см. формулу (2)). Сплошные линии – экспоненциальные аппроксимации экспериментальных данных, полученные по методу наименьших квадратов.

3.2. Схема косвенной регистрации

Прямая схема регистрации ОА сигналов, описанная выше, имеет существенный недостаток – она требует двустороннего доступа к объекту исследования. Поэтому ее использование при измерениях *in vivo* в реальных биологических тканях затруднено и возможно только в редких случаях. Гораздо более удобной и перспективной является схема косвенной регистрации ОА импульсов [39], возможность применения которой в задаче диагностики светорассеяния в биологических объектах обсуждается ниже.

Схема ОА метода с косвенной регистрацией акустических импульсов приведена на рис.4. Коллимированное лазерное излучение направлялось сбоку на делительный кубик, который изменял направление распространения излучения на 90° . Сверху кубик соприкасался с исследуемой средой, снизу – с широкополосным пьезоприемником.

Кубик изготавливался из двух находящихся в оптическом контакте кварцевых призм треугольного сечения, где на одну из соприкасающихся поверхностей нанесен тонкий металлический слой. Возбуждаемый в исследуемой среде ОА сигнал проходил через этот слой, не испытывая потерь на отражение, и затем попадал на приемник.

При поглощении лазерного импульса в образце возникают две одинаковые акустические волны: первая распространяется в глубь среды, вторая – в противоположную сторону [34]. Временной профиль ОА сигнала, рас-

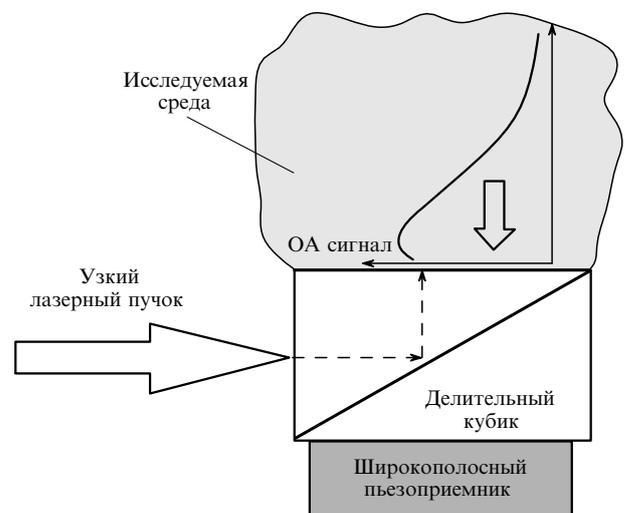


Рис.4. Принципиальная схема ОА метода в режиме косвенной регистрации ультразвуковых сигналов.

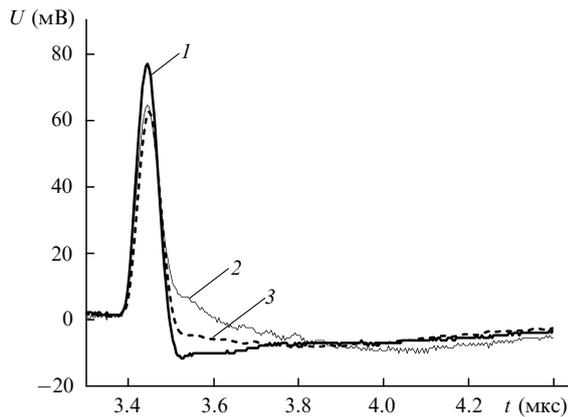


Рис.5. Характерные временные профили ОА сигналов, зарегистрированных с помощью пьезокерамики в молоке (1), свиной печени (2) и говяжьей мышечной ткани (3) в режиме косвенной регистрации ультразвуковых сигналов при $\lambda = 1064$ нм.

пространяющегося по направлению к приемнику (без учета влияния конечной длительности лазерного импульса и импульсной переходной характеристики датчика), можно представить в виде

$$p_0(\tau = t - z/V_0) = \frac{\beta V_0^2}{2c_p} \mu_a E_0 \begin{cases} 0, & \tau < 0, \\ R_{ac} H(V_0 \tau), & \tau > 0. \end{cases} \quad (5)$$

При конечной длительности лазерного импульса профиль возбуждаемого ОА сигнала определяется сверткой (5) с профилем временной огибающей интенсивности лазерного импульса и импульсным откликом пьезоприемника. Если регистрация акустического сигнала происходит в дальней дифракционной зоне, то его временной профиль будет соответствовать производной от временной формы возбуждаемого на границе $z = 0$ сигнала [34].

На рис.5 приведены некоторые ОА сигналы от исследуемых сред, полученные в режиме косвенной регистрации. Измерения проводились в дальней волновой зоне, диаметр лазерного пучка на поверхности среды составлял 4 мм. Поэтому ширина узкого положительного пика в сигналах определяется шириной импульсной переходной характеристики датчика, а амплитуда (согласно формуле (5)) пропорциональна коэффициенту поглощения света в среде.

Таким образом, сравнивая амплитуду ОА сигнала, возбуждаемого в исследуемой среде, с амплитудой сигнала от среды с известным поглощением света (например, от молока), можно определить неизвестный коэффициент поглощения.

Результаты диагностики поглощения биотканей, полученные в режиме косвенной регистрации акустических импульсов, приведены в табл.1.

4. Обсуждение результатов

Остановимся теперь подробнее на анализе полученных в настоящей работе результатов. Мы рассмотрели две основные схемы ОА диагностики биологических объектов. Проведем сначала их сравнение.

Как показано в п.3.1, при использовании схемы прямой регистрации ОА сигналов фронт импульса давления повторяет пространственное распределение интенсивности рассеянного в среде лазерного излучения. Это являет-

ся чрезвычайно важным, т. к. позволяет судить об оптической однородности или неоднородности диагностируемого объекта и рассчитывать оптические коэффициенты непосредственно по профилю интенсивности. Действительно, описание среды с помощью набора оптических коэффициентов возможно только в случае ее однородности, что далеко не всегда имеет место в реальных биологических тканях. Любая находящаяся в среде оптическая неоднородность может внести существенные ошибки в расчет «средних» по объему оптических коэффициентов.

Распределения интенсивности, представленные на рис.3, получены для относительно однородных тканей. В молоке вдали от границы (рис.3,а) распределение имеет универсальный экспоненциальный характер. Отметим, что в каждом типе ткани ОА измерения проводились на разных образцах более десяти раз. На рис.3,б–г приведены распределения для образцов говяжьей и свиной печени, а также говяжьей мышечной ткани, обладающих наилучшей степенью однородности. Однако для всех образцов наблюдаются некоторые отклонения от экспоненциальной аппроксимации, связанные с неоднородностью структуры исследуемых биотканей. Оптические характеристики (коэффициенты поглощения, рассеяния и экстинкции), рассчитанные из распределений интенсивности (см. табл.1), представляют собой результат статистического усреднения по набору из более чем десяти образцов. Несмотря на большие возможности рассмотренного метода при диагностике *in vitro*, прямая схема измерений обладает существенными недостатками. Основным из них является требование двустороннего доступа к объекту исследования. Образцы также должны иметь относительно большую толщину (~ 2 см), чтобы не происходила засветка пьезоприемника, а их поверхности должны быть ровными и плоскопараллельными. Это делает данный метод пригодным при измерениях *in vivo* на живых объектах только в редких случаях.

Как было показано в п.3.2, схема косвенной регистрации ОА импульсов позволяет проводить исследования при одностороннем доступе к объекту. Она является гораздо более удобной и может быть использована при диагностике живых объектов *in vivo*. Однако прямое измерение пространственного распределения интенсивности лазерного излучения при косвенной регистрации ОА сигналов сопряжено с серьезными трудностями. В отличие от схемы прямой регистрации, где фронт ОА сигнала повторяет пространственное распределение тепловыделения (см. выражение (2)), в данном случае согласно (5) информативным является задний фронт импульса. Однако он подвержен сильной дифракционной трансформации [34, 38], а восстановление неискаженного профиля с помощью обратной свертки с сигналом от сильно поглощающей свет среды не приводит к хорошему результату из-за малой амплитуды спектральных компонент, содержащих эту информацию. Тем не менее амплитуда возбуждаемого в рассеивающей среде и зарегистрированного в дальней дифракционной зоне ОА импульса пропорциональна коэффициенту поглощения света. Поэтому для его измерения в сильно рассеивающих средах можно использовать ОА метод с косвенной регистрацией акустических импульсов.

Рассчитанные из экспериментальных данных оптические характеристики исследуемых биологических тканей приведены в табл.1. Заметим сначала, что коэффициенты поглощения исследуемых сред, определенные при раз-

личных геометриях экспериментах, совпадают в пределах статистического разброса, подтверждая этим адекватность полученных результатов.

На длине волны основной гармоники Nd:YAG-лазера (1064 нм) коэффициент поглощения света в исследуемых биотканях оказался близким к коэффициенту поглощения в воде. Различия в их значениях обусловлены, скорее всего, процентным содержанием в этих средах воды. Действительно, спектр поглощения биологической среды может быть рассчитан из линейной комбинации спектров ее компонентов: жиров, белков, крови и воды [19, 20, 22]. Белки в видимом и ближнем ИК диапазонах практически не поглощают свет [19]. Игнорирование в расчетах поглощения света жировой тканью может приводить к ошибкам, однако основными поглотителями в биологической среде являются вода и кровь. Их процентное содержание в биологической ткани в наибольшей степени определяет поглощение света в ней.

На $\lambda = 779$ нм ситуация несколько иная: в печени поглощение света резко возрастает, а в молоке и говяжьем мясе – убывает почти в три раза. В самом деле, мышечная ткань насыщена водой, а поглощение света жировой тканью на этой длине волны минимально [19]. Поэтому, так же как и в молоке, поглощение света в мышечной ткани определяется свойствами воды. Говяжья и свиная печень, наоборот, насыщены кровью. Спектр поглощения деоксигенированной крови имеет локальный максимум вблизи рассматриваемой длины волны [19], который по большей части определяет резкое увеличение поглощения света в печени.

Глубина проникновения света в среду определяется не только поглощением, но и рассеянием. Коэффициент рассеяния зависит от размера частиц, их формы и концентрации в среде. С увеличением длины волны эффективность рассеяния падает. В работах [19, 20, 39, 40] отмечено, что спектры рассеяния биотканей человека можно аппроксимировать эмпирической зависимостью

$$\mu'_s = a\lambda^{-b}, \quad (6)$$

где a и b – константы, причем $0.5 < b < 1.8$; диапазон изменения приведенного коэффициента рассеяния $6 < \mu'_s < 20$ см⁻¹ с уменьшением длины волны от 1064 до 779 нм меняется слабо. Наши измерения дают схожие результаты.

Отметим, что рассчитанные в настоящей работе коэффициенты поглощения в говяжьей мышечной ткани в пределах погрешности совпадают с данными, представленными в [19] для мышечной ткани человека. При этом на $\lambda = 1064$ нм поглощение также было почти вдвое больше, чем на $\lambda = 779$ нм. Провести сравнение коэффициентов поглощения в печени с литературными данными достаточно трудно, т. к. печень сильно насыщена кровью и результат измерений будет зависеть от процедуры приготовления образцов. Например, в [41] на $\lambda = 1064$ нм коэффициент поглощения в свиной печени равен 0.1 см⁻¹, тогда как согласно [42] он составляет 2 см⁻¹.

Одним из важных вопросов в задачах оптической и ОА томографии биологических сред является выбор длины волны лазерного излучения. С одной стороны, свет должен максимально глубоко проникать в среду, а с другой – различие в его поглощении здоровой и пораженной тканями должно быть наибольшим. Проведенные нами

измерения еще раз подтверждают, что оптимальным для томографических задач, по-видимому, является диапазон длин волн 750–800 нм.

5. Выводы

В настоящей работе ОА методом проведены прямые измерения *in vitro* распределения интенсивности лазерного излучения по глубине в различных биологических средах: молоке, говяжьей и свиной печени, говяжьей мышечной ткани. Исследования проводились с использованием основной гармоники Nd:YAG-лазера ($\lambda = 1064$ нм) и излучения Ti:сапфирового лазера ($\lambda = 779$ нм). Рассмотрены две геометрии возбуждения и регистрации ОА сигналов. Показано, что прямая схема измерений позволяет определять полный набор оптических характеристик биотканей, а также диагностировать степень их однородности. В схеме косвенной регистрации возможно только измерение коэффициента поглощения света, однако она является гораздо более удобной и пригодной для диагностики биологических объектов *in vivo*. Полученные экспериментальные результаты демонстрируют возможность применения ОА метода для измерения распределения лазерного излучения в биологических средах и определения их оптических характеристик.

1. Berlien H.P., Mueller G.J. (Eds) *Applied Laser Medicine* (Berlin: Springer-Verlag, 2003).
2. Müller G., Chance B., Alfano R. (Eds) *Medical Optical Tomography: Functional Imaging and Monitoring* (Bellingham: SPIE Press, 1993, Vol. IS11).
3. Tromberg B.J., Cerussi A., Shah N., Compton M., Fedyk A. *Breast Cancer Res.*, **7**, 279 (2005).
4. Gibson A.P., Hebden J.C., Arridge S.R. *Phys. Med. Biol.*, **50**, R1 (2005).
5. Kolkman R., Klaessens J., Hondebrink E., Hopman J., de Mul F., Steenbergen W., Thijssen J., van Leeuwen T. *Phys. Med. Biol.*, **49**, 4745 (2004).
6. Karabutov A.A., Savateeva E.V., Oraevsky A.A. *Laser Phys.*, **13**, 713 (2003).
7. Hamilton J., Buma T., Spisar M., O'Donnell M. *IEEE UFFC Trans.*, **47**, 160 (2000).
8. Paltauf G. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **5143**, 41 (2003).
9. Kruger R.A., Kiser W.L., Reinecke D.R., Kruger G.A. *Med. Phys.*, **30**, 856 (2003).
10. Oraevsky A.A., Andreev V.G., Karabutov A.A., Esenaliev R.O. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **3601**, 256 (1999).
11. Kozhushko V.V., Khokhlova T.D., Zharinov A.N., Pelivanov I.M., Solomatin V.S., Karabutov A.A. *J. Acoust. Soc. Am.*, **116**, 1498 (2004).
12. Tuchin V.V. *Tissue Optics: Light Scattering Methods and Instruments for Medical Diagnosis* (Bellingham, WA: SPIE Press, 2000, Vol. TT38).
13. Pham T.H., Coquoz O., Fishkin J.B., Anderson E., Tromberg B.J. *Rev. Sci. Instr.*, **71**, 2500 (2000).
14. Bevilacqua F., Berger A.J., Cerussi A.E., Jakubowski D., Tromberg B.J. *Appl. Opt.*, **39**, 6498 (2000).
15. Yang Y., Liu H., Chance B., Li X. *Opt. Eng.*, **36**, 1562 (1997).
16. Bevilacqua F., Piguet D., Marquet P., Gross J.D., Tromberg B.J., Depeursinge C. *Appl. Opt.*, **38**, 4939 (1999).
17. Kienle L., Lilge M., Patterson S., Hibst R., Steiner R., Wilson C. *Appl. Opt.*, **35**, 2304 (1996).
18. Wang R.K., Wikramasinghe Y.A. *Appl. Opt.*, **37**, 7342 (1998).
19. Pifferi A., Swartling J., Chikoidze E., Torricelli A., Taroni P., Bassi A., Andersson-Engels S., Cubeddu R. *J. Biomed. Opt.*, **9**, 1143 (2004).
20. Taroni P., Pifferi A., Torricelli A., Comelli D., Cubeddu R. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2**, 124 (2003).
21. Abrahamsson C., Svensson T., Svanberg S., Anderson-Engels S. *Opt. Express*, **12**, 4103 (2004).

22. Spinelli L., Torricelli A., Pifferi A., Taroni P., Danesini G.M., Cubeddu R. *J. Biomedical Opt.*, **9**, 1137 (2004).
23. Kienle A., Patterson M.S., Dognitz N., Bays R., Wagnieres G., van de Bergh H. *Appl. Opt.*, **37**, 779 (1998).
24. Wang X.J., Milner T.E., de Boer J.F., Zhang Y., Pashley D.H., Nelson J.S. *Appl. Opt.*, **38**, 2092 (1999).
25. Tearney G.J., Brezinski M.E., Southern J.F., Bouma V.E., Hee M.R., Fujimoto J.G. *Opt. Lett.*, **20**, 2258 (1995).
26. Зимняков Д.А., Тучин В.В. *Квантовая электроника*, **32**, 849 (2002).
27. Maslov K., Stoica G., Wang L. *Opt. Lett.*, **30**, 625 (2005).
28. Savateeva E.V., Karabutov A.A., Bell B., Johnigan R., Motamedi M., Oraevsky A.A. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **3916**, 55 (2000).
29. Viator J.A., Paltauf G., Jaques S.L., Prael S.A. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **4256**, 16 (2001).
30. Khokhlova T.D., Pelivanov I.M., Kozhushko V.V., Zharinov A.N., Solomatina V.S., Karabutov A.A. *Appl. Opt.* (2006) (in press).
31. Карабутов А.А., Пеливанов И.М., Подымова Н.Б., Скипетров С.Е. *Квантовая электроника*, **29**, 215 (1999).
32. Грашин П.С., Карабутов А.А., Ораевский А.А., Пеливанов И.М., Подымова Н.Б., Саватеева Е.В., Соломатин В.С. *Квантовая электроника*, **32**, 868 (2002).
33. *Safe Use of Lasers in Health Care Facilities*. ANSI Standard Z136.3-2005.
34. Гусев В.Э., Карабутов А.А. *Лазерная оптоакустика* (М.: Наука, 1991).
35. Wang L.-H., Jacques S.L., Zheng L.-Q. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, **47**, 131 (1995).
36. Gardner C.M., Jacques S.L., Welch A.J. *Lasers in Surgery and Medicine*, **18**, 129 (1996).
37. Исимару А. *Распространение и рассеяние волн в случайно-неоднородных средах* (М.: Наука, 1981).
38. Karabutov A.A., Podymova N.B., Letokhov V.S. *Appl. Phys. B*, **63**, 545 (1996).
39. Karabutov A.A., Savateeva E.V., Oraevsky A.A., Podymova N.B. *J. Appl. Phys.*, **87**, 2003 (2000).
40. Durduran T., Choe R., Culver J.P., Zubkov L., Holboke M.J., Giammarco J., Chance B., Yodanis A.J. *Phys. Med. Biol.*, **47**, 2847 (2002).
41. Cheong W.F., Prael S.A., Welch A.J. *IEEE J. Quantum Electron.*, **26**, 2166 (1990).
42. Beeky J.F., Blokland P., Posthumus P., Aalders M., Pickering J.W., Sterenborg H.J.C.M., van Gemert M.J.C. *Phys. Med. Biol.*, **42**, 2255 (1997).