

# Отпечатки излучения непрерывного лазера малой мощности на коже человека

А.Лихачёв, Я.Лесиньш, Д.Яковелс, Я.Спигулис

*Изучено воздействие непрерывного лазерного излучения малой мощности на автофлуоресцентные свойства кожи человека. Используются два метода детектирования автофлуоресценции: спектральный метод с применением оптоволоконного зонда и спектрометра для определения кинетики восстановления автофлуоресценции на фиксированном участке кожи площадью  $\sim 12$  мм<sup>2</sup> и мультиспектральный метод с использованием камеры мультиспектрального изображения для визуализации долгосрочных изменений автофлуоресценции на участке кожи площадью  $\sim 4$  см<sup>2</sup>. Определена кинетика восстановления автофлуоресценции после предварительного облучения. Получены снимки кожи с видимыми долгосрочными изменениями автофлуоресценции – «отпечатками» воздействия излучения маломощных лазеров.*

**Ключевые слова:** автофлуоресценция, кожа, фотообесцвечивание, лазер.

## 1. Введение

Лазерное излучение широко применяется в дерматологии для диагностики состояния кожи и лечения кожных заболеваний. Для этого используют лазеры, обладающие широким спектром как длин волн, так и мощностей излучения. Облучение кожи лазером высокой мощности с целью изменения её структурных свойств широко распространено в хирургии, дерматологии и косметологии [1]. При этом предполагается, что в случае низких плотностей мощности (менее 200 мВт/см<sup>2</sup>, время экспозиции до 103 с) лазерное излучение безопасно для кожи [2].

Фотообесцвечивание (photo-bleaching) – процесс снижения интенсивности флуоресценции при длительном оптическом возбуждении – может применяться для контроля концентрации активных фотосенсибилизаторов (экзогенные флуорофоры) в фотодинамической терапии. Снижение интенсивности флуоресценции говорит об уменьшении концентрации фотосенсибилизаторов, способных производить синглетный кислород, что очень важно для удачного проведения терапии. В фотодинамической терапии обесцвечивание является результатом разрушения молекул фотосенсибилизатора в процессе оксидации: фотосенсибилизатор в возбуждённом состоянии производит синглетный кислород, который его же и разрушает. Такое разрушение приводит к резкому снижению эффективности терапии [3–5]. Известно также целенаправленное применение эффекта фотообесцвечивания в неинвазивной комбинационной спектроскопии для улучшения точности измерения концентрации кератиноидов в коже человека [6].

Фотообесцвечивание автофлуоресценции (АФ) кожи изучалось на протяжении многих лет. Опубликован ряд

статей, описывающих фотообесцвечивание АФ в широком спектральном диапазоне при ультрафиолетовом (337 нм), фиолетовом (405 нм), синем (442 нм), зелёном (532 нм) и красном (632 нм) облучении в случае импульсного и непрерывного возбуждения в диапазоне плотностей мощности 1–500 мВт/см<sup>2</sup> [6–10].

Процесс фотообесцвечивания АФ кожи часто описывается двойным экспоненциальным уравнением [6–10]. При непрерывном возбуждении в первые 10–15 с происходит стремительное снижение интенсивности  $I$ , которое затем постепенно замедляется. При этом существует остаточная интенсивность, асимптотически стремящаяся к постоянному уровню  $A$ :

$$I(t) = a \exp(-t/\tau_1) + b \exp(-t/\tau_2) + A. \quad (1)$$

Здесь параметры  $\tau_1$  и  $\tau_2$  характеризуют быструю и медленную фазы фотообесцвечивания. Экспериментальные подтверждения данной аппроксимации более детально описаны в работах [11, 12].

Предыдущие исследования фотообесцвечивания (при возбуждении на длинах волн 405 и 532 нм) показали, что изменение мощности возбуждения в основном влияет на значение уровня  $A$ . Также установлено, что параметры фотообесцвечивания АФ в разных участках кожи различны и однородность в распределении быстрой и медленной фаз по поверхности кожи отсутствует [12]. Особый интерес вызывает возможность применения оценки степени фотообесцвечивания в клинической диагностике. Ранее проведённые исследования показали, что наиболее чувствительным с точки зрения диагностики является параметр быстрого фотообесцвечивания  $\tau_1$ . Результаты клинического тестирования выявили, что для здоровой и патологически изменённой кожи значения  $\tau_1$  различаются. В отдельных случаях это различие было пятикратным, а в случае гиперпигментированных патологий фотообесцвечивание вообще не наблюдалось [11].

Фотообесцвечивание кожи происходит вследствие деградации входящих в её состав флуорофоров. В синезеленой области спектра такими флуорофорами являются

A.Lihachev, J.Lesins, D.Yakovels, J.Spigulis. Institute of Atomic Physics and Spectroscopy, University of Latvia, Raina Blvd. 19, Riga, LV-1586, Latvia; e-mail: lihachov@inbox.lv, janis.lesins@gmail.com, janispi@latnet.lv

ся локализованные в эпидермисе формы кофермента НАД и кератин, а также дермальные коллаген и эластин. Восстановленная (НАД-Н) и связанная (НАД+) формы кофермента НАД различаются спектральными областями флуоресценции (максимумы флуоресценции на 460 и 435 нм соответственно), квантовыми выходами (для НАД-Н он существенно выше) и временами затухания флуоресценции (для НАД-Н оно меньше) [6, 13].

Однако механизм фотообесцвечивания АФ кожи пока не до конца изучен. Также не ясно, как непрерывное возбуждение влияет на эндогенные флуорофоры кожи. Можно предположить, что непрерывное облучение кожи вызывает фотохимический процесс, при котором происходит деградация эндогенных флуорофоров.

В настоящей работе исследуется влияние непрерывного лазерного облучения малой мощности на свойства АФ здоровой кожи человека. Обнаружен и изучен эффект «фотопамяти» кожи.

## 2. Эксперимент

Цель проведенного эксперимента – определить кинетику восстановления АФ кожи и отобразить долгосрочные изменения свойств автофлуоресценции облучённых секторов кожи. Использовались два метода регистрации автофлуоресценции: спектральный метод локальной регистрации и мультиспектральный метод визуализации (описаны ниже).

### 2.1. Спектральный метод регистрации

Для реализации поставленной цели использовалась установка (рис. 1), которая состоит из коммерческого лазера BWT-532-15-SMA (B&WTeK, США) с длиной волны излучения 532 нм, оптоволоконного датчика, содержащего семь световодов ( $6 \times 400$  мкм для доставки излучения,  $1 \times 400$  мкм для регистрации), спектрометра AvaSpec-2048 (Avantes, Нидерланды) и компьютера.

На здоровой коже руки было выбрано десять областей диаметром 4 мм, которые в течение 3 мин предварительно облучались лазером при плотности мощности 85 мВт/см<sup>2</sup>. Интенсивность возбуждённой флуоресценции регистрировалась в начале и в конце облучения. Так как при непрерывном возбуждении интенсивность флуорес-

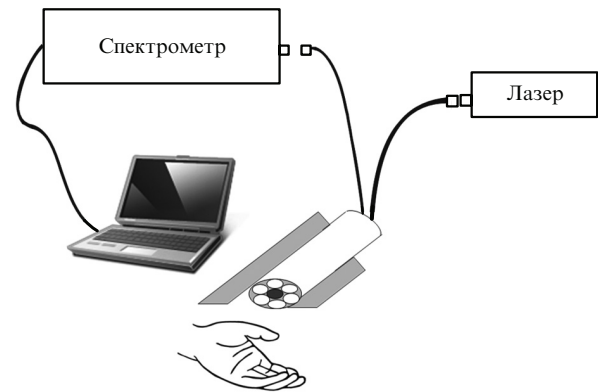


Рис.1. Схема установки для детектирования обесцвечивания АФ спектральным методом регистрации.

ценции падает, то в начале облучения она была выше, чем спустя 3 мин. Возбуждение и регистрация АФ осуществлялись на расстоянии 3 мм от поверхности кожи. Для расчёта кинетики восстановления АФ использовалось максимальное значение интенсивности АФ, соответствующее сигналу на длине волны 600 нм.

Таким образом, на коже имелось десять областей с пониженной интенсивностью флуоресценции. В контрольное время в одной из десяти областей снова возбуждалась флуоресценция с той же плотностью мощности, что и при предварительном облучении, и регистрировалась интенсивность возбуждённой флуоресценции. Поскольку при каждом возбуждении флуоресценции происходит обесцвечивание, контрольные измерения в каждой из десяти областей проводились только один раз. В результате было получено десять средних значений интенсивности флуоресценции в зависимости от времени. В исследовании принимали участие три добровольца, представленные результаты являются средней арифметической величиной.

### 2.2. Мультиспектральный метод визуализации

Для визуализации изменений АФ после предварительного облучения использовалась система мультиспектрального изображения (рис.2), состоящая из мультиспектральной камеры Nuance 2.4 (Cambridge Research and

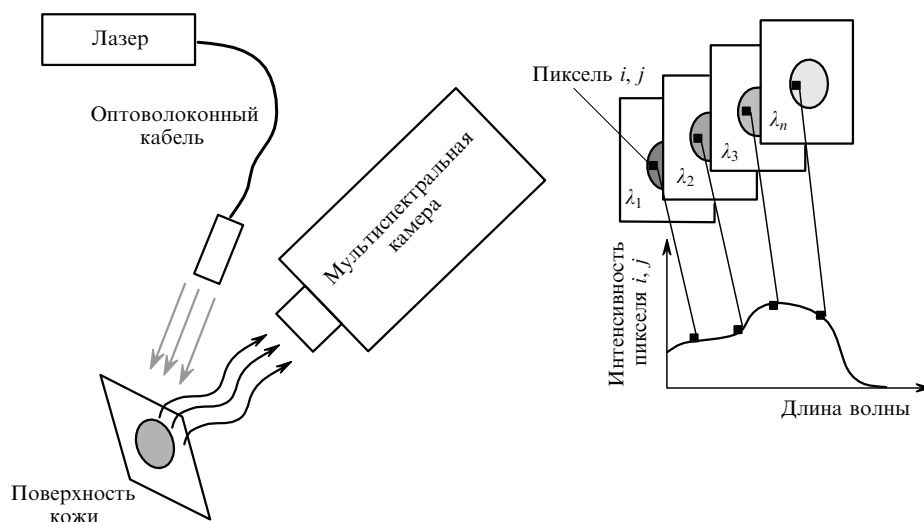


Рис.2. Схема установки для мультиспектрального изображения АФ кожи.

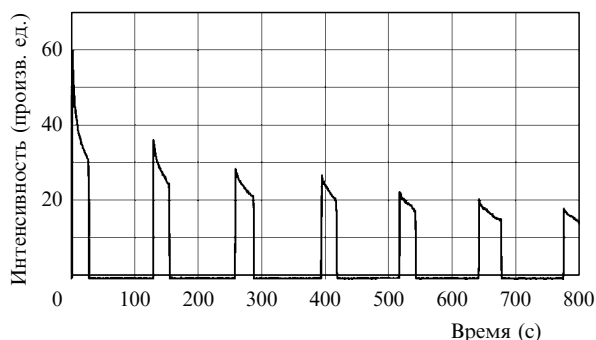


Рис. 3. Изменение интенсивности АФ кожи при повторных возбуждениях с интервалом 2 мин. Плотность мощности излучения 85 мВт/см<sup>2</sup>, длина волны 532 нм, длина волны регистрации 600 нм.

Instrumentation, США), двух лазеров, BWB-405-40-PIG-200-0.22-SMA ( $\lambda = 405$  нм) и BWT-532-15-SMA ( $\lambda = 532$  нм) (оба – B&W Tek, США), а также оптоволоконного кабеля для доставки излучения к поверхности кожи. На коже были выбраны две области площадью по 4 см<sup>2</sup>, на которые накладывалась маска из материала, не пропускающего лазерное излучение. В случае возбуждения на  $\lambda = 405$  нм маска имела крестообразное отверстие, а при возбуждении на  $\lambda = 532$  нм она представляла собой непрозрачный крест. Далее каждую область облучали излучением лазера в течение 2 мин при плотности мощности 35 мВт/см<sup>2</sup>. В результате были получены два участка кожи: один – облученный излучением на  $\lambda = 405$  нм, второй – на  $\lambda = 532$  нм. Далее с поверхности кожи был снят экранирующий материал, и через сутки области вновь облучили, получив флуоресцентные изображения. Для этого использовались два фильтра с пропусканиями, соответствующими максимумам АФ: фильтр с пропусканием в диапазоне длин волн 500–520 нм для регистрации флуоресценции, возбужденной на  $\lambda = 405$  нм, и фильтр с пропусканием на 600–620 нм для регистрации флуоресценции, возбужденной на  $\lambda = 532$  нм.

### 3. Результаты

На рис. 3 представлено изменение интенсивности АФ кожи при повторных возбуждениях. Видно, что каждое возбуждение приводит к ее снижению, причем интервала в 2 мин между возбуждениями недостаточно для восстановления интенсивности до начального уровня. Каждое последующее возбуждение приводит к более сильному снижению АФ.

На рис. 4 показана кинетика восстановления АФ при возбуждении излучением на  $\lambda = 532$  нм. Видно, что за 125 ч релаксации интенсивность АФ кожи восстановилась только примерно на 80 % от первоначального значения.

Представленные на рис. 5 флуоресцентные снимки здоровой кожи демонстрируют «отпечатки» излучения лазера: на фоне общей АФ просматриваются очертания экранирующего материала. Участки кожи, подвергнутые предварительному облучению, флуоресцируют с меньшей интенсивностью.

### 4. Обсуждение

Полученные результаты свидетельствуют о значительно более низкой интенсивности флуоресценции на участках предварительно облученной кожи, что говорит

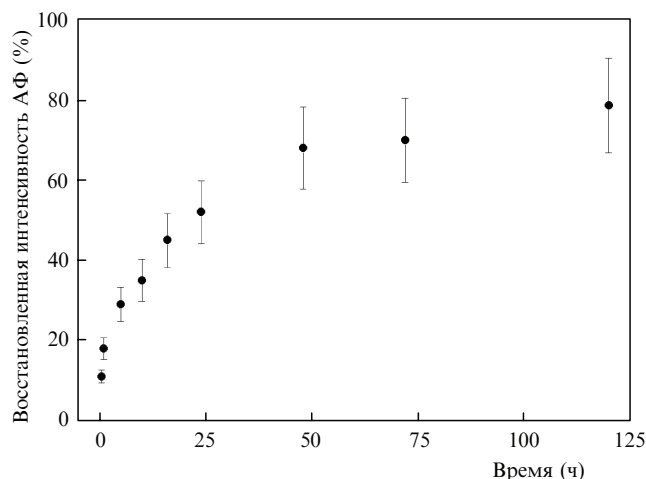


Рис. 4. Кинетика восстановления интенсивности АФ. Точки соответствуют среднеарифметическим значениям контрольных измерений, вертикальные отрезки – отклонениям от них. Кинетика получена на длине волны 600 нм.

о долгосрочном изменении её поверхностной структуры. Это интересное свойство кожи можно назвать «фотопамятью»: кожа «запоминает» полученное маломощное облучение подобно фоточувствительному материалу, например фотоплёнке. Восстановление интенсивности АФ происходит сравнительно медленно – по всей видимости, это указывает на долгосрочное изменение состава (концентрации) флуорофоров кожи или на снижение поглощающей способности хромофоров кожи под влиянием лазерного облучения. Механизм этих процессов нужно изучить более подробно. Заслуживают внимания следующие факты: фотообесцвечивание кожи не наблюдается при плотном контакте оптоволоконного зонда с кожей,

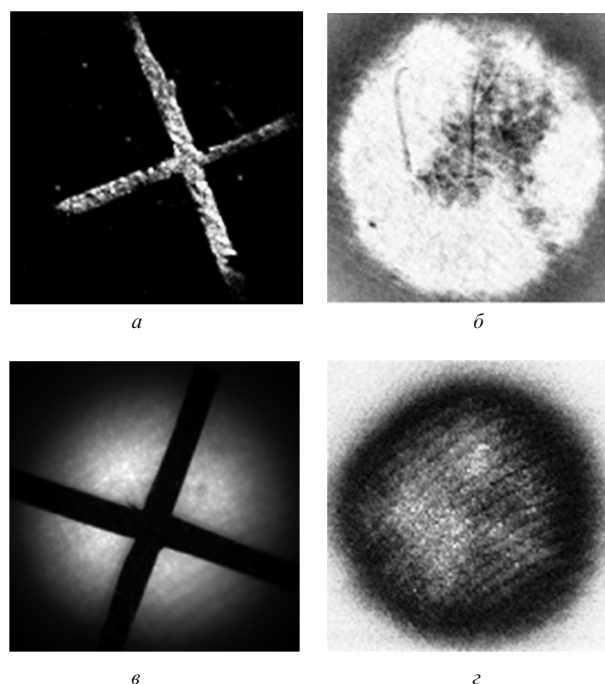


Рис. 5. Флуоресцентные изображения участка кожи, частично подвергнутого облучению лазером с  $\lambda = 405$  нм (а), и то же спустя сутки после облучения (б), а также участка кожи, частично подвергнутого облучению лазером с  $\lambda = 532$  нм (в), и то же спустя сутки после облучения (г) (в случаях а и в светлые области – кожа, подвергнутая облучению).

при облучении неживой кожи интенсивность АФ тоже затухает, но не восстанавливается.

Представленные результаты могут побудить к дальнейшему пересмотру стандартов лазерной безопасности кожи. В настоящей работе экспозиция лазерного излучения (15.3 Дж при точечном и 4.2 Дж при поверхностном облучении) не превышает установленную минимально допустимую (менее 200 мВт/см<sup>2</sup>, время экспозиции до 103 с, т.е. доза 20.6 Дж) экспозицию, заявленную в европейском стандарте лазерной безопасности [2].

## 5. Заключение

Экспериментально продемонстрирован эффект фотопамяти кожи, полученный при маломощном (менее 100 мВт/см<sup>2</sup>) непрерывном лазерном облучении. Эффект проявляется в понижении интенсивности автофлуоресценции предварительно облучённых участков здоровой кожи. Механизм данного явления связан, скорее всего, с уменьшением концентрации эндогенных флуорофоров в поверхностных слоях кожи, не исключено также снижение поглощающей способности хромофоров кожи под влиянием лазерного облучения. Эффект фотопамяти требует дополнительных исследований для определения точного механизма фотообесцвечивания и его влияния на структуру и физиологию кожи.

Работа выполнена при поддержке двух проектов Ев-

ропейских социальных фондов (No. 009.0211/1DP/1.1.1.1.2.0/09/APIA/VIAA/077 и DP/1.1.2.1.2./09/APIA/VIAA/004).

1. *Laser Surgery and Medicine*. Ed. by A.Carmen, M.D.Puliafito (New York: John Wiley & Sons Inc., 1996).
2. *Safety of Laser Products – Part 1: Equipment Classification and Requirements* (IEC 60825-1, 2007).
3. Johansson A., Johansson T., Thompson M.S., Bendsoe N., Svanberg K., Svanberg S., Andersson-Engels S. *J. Biomed. Opt.*, **11** (3), 034029 (2006).
4. Palsson S. *Method, instrumentation and mechanism for tissue and treatment of malignant tumors*. PhD Thesis, Lund University. KFS AB, Lund (2003).
5. Рябова А.В., Стратонников А.А., Лощенов В.Б. *Квантовая электроника*, **36** (6), 562 (2006).
6. Darvin M.E., Brandt N.N., Lademann J. *Opt. Spectrosc.*, **109** (2), 205 (2010).
7. Finlay J.C., Mitra S., Patterson M.S., Foster T.H. *Phys. Med. Biol.*, **49**, 4837 (2004).
8. Zeng H., MacAulay C.E., Palcic B., McLean D.I. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **1882**, 278 (1993).
9. Salomatina E.V., Pravdin A.B. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **5068**, 405 (2003).
10. Strattonnikov A.A., Polikarpov V.S., Loschenov V.B. *Proc. SPIE Int. Soc. Opt. Eng.*, **4241**, 13 (2001).
11. Lihachev A., Spigulis J. *IEEE Xplore*, 10.1109/NO, 63 (2007).
12. Spigulis J., Lihachev A., Ertis R. *Appl. Opt.*, **48** (10), D163-D168 (2009).
13. Тучин В.В. *Оптическая биомедицинская диагностика* (М.: Физматлит, 2007, т. 2. с. 77).