ЛАЗЕРНАЯ БИОФОТОНИКА

Оценка теплового воздействия лазерных импульсов фемто- и миллисекундной длительности при выполнении микрохирургических процедур на эмбрионах млекопитающих

Д.С.Ситников, И.В.Ильина, А.А.Пронкин

Проведено сравнение теплового воздействия, оказываемого импульсами фемто- и миллисекундной длительности при выполнении микрохирургических процедур на эмбрионах. Рассмотрено линейное и нелинейное поглощение лазерных импульсов в водной среде, а также теплоперенос из области фокусировки лазерного пучка в прилегающие области.

Ключевые слова: *фемосекундные импульсы, многофотонное поглощение, лавинная ионизация, водная среда, миллисекундные импульсы, диссектор, тепловое воздействие, эмбрион.*

1. Введение

Современные источники лазерного излучения ультракороткой длительности (здесь и далее имеется в виду длительность $\tau_L < 10$ пс) получили широкое распространение в приложениях, основанных на лазерно-индуцированных процессах формирования плазмы, в том числе для фотомодификации биомолекул [1, 2] и в лазерной хирургии [3–5]. Появление фемтосекундных лазеров открыло новые возможности в области рефракционной кератопластики [4, 6] и способствовало разработке технологии Femto-LASIK, позволившей исключить применение механических инструментов. Однако в области вспомогательных репродуктивных технологий (ВРТ) источники излучения ультракороткой длительности еще не получили заслуженного признания. В настоящий момент для эмбриональной микрохирургии (в основном для воздействия на прозрачную оболочку эмбриона, называемую zona pellucida) широко используются миллисекундные лазерные диссекторы [7]. Арсенал коммерчески доступных систем включает в себя модели ZILOS-tk® (Hamilton Thorne), Saturn 5™ (CooperSurgical®) и OCTAX Laser Shot™ (MTG). Они различаются разной степенью автоматизации и постепенно замещают в клинической практике механические инструменты и химические методики. Вместе с тем их применение имеет определенные риски, связанные с термическим повреждением клеток эмбриона, тесно прилегающих к прозрачной оболочке эмбриона изнутри. В исследованиях [7, 8], посвященных поиску безопасных режимов лазерного воздействия, было показано, что температура в центре пучка достигает нескольких сотен градусов и даже на расстоянии 10 мкм сохраняется на уровне ~100 °C. Таким образом, при использовании миллисекундных диссекторов для эмбриональной микрохирургии необходимо соблюдать ряд жестких требований безопасности для исключения риска повреждения клеток эмбриона [9].

Д.С.Ситников, И.В.Ильина, А.А.Пронкин. Объединенный институт высоких температур РАН, Россия, 125412 Москва, ул. Ижорская, 13, стр.2; e-mail: Sitnik.ds@gmail.com

Поступила в редакцию 29 ноября 2021 г., после доработки – 20 марта 2022 г.

Фемтосекундные лазерные диссекторы представляют собой перспективную альтернативу миллисекундным, поскольку нелинейные механизмы поглощения фемтосекундного лазерного излучения в водной среде позволяют локализовать область взаимодействия, значительно увеличив точность микрохирургических процедур. Это, в свою очередь, позволит повысить безопасность лазерной микрохирургии эмбрионов и расширить область применения лазеров в востребованных задачах ВРТ. Так, недавно на базе фемтосекундного лазерного диссектора были реализованы технология бесконтактной лазерной маркировки преимплантационных эмбрионов для их идентификации и исключения риска перепутывания [10], а также технология управляемого лазерного хэтчинга на поздних сроках преимплантационного развития [11].

Описанию взаимодействия фемтосекундных лазерных импульсов с диэлектрическими средами, включая вопросы формирования электрон-дырочной плазмы, оптического пробоя и ударных волн, посвящено большое число исследований (см., напр., [12–17]). Однако оценка теплового воздействия фемтосекундных лазерных импульсов с параметрами, соответствующими оптимальным для выполнения эмбриомикрохирургических процедур параметрам, ранее не проводилась. В настоящей работе получены данные о пространственном и временном распределениях температуры в области воздействия фемтосекундного лазерного импульса и проведено сравнение с результатом воздействия импульса миллисекундной длительности. Для этого использовалась ранее разработанная и подробно описанная группой авторов в серии статей за 2003–2019 гг. [18–21] модель для расчета плотности энергии лазерно-индуцированных электронов в области фокусировки, которая определяет пространственно-временной профиль теплового источника при решении задачи теплопереноса.

2. Моделирование процесса взаимодействия

2.1. Ионизация воды

В 1986 г. экспериментально было показано [22], что пороги пробоя в воде и в биологических тканях очень близки, что обусловило в дальнейшем использование параметров воды при моделировании процессов воздей-

ствия УКИ на биологические ткани. В работе [23] было предложено рассматривать воду как аморфный полупроводник. Данные спектроскопии воды, полученные за последние два десятилетия, позволили уточнить представления о ее зонной структуре. Согласно современным представлениям прямой переход электрона из валентной зоны (ВЗ) в зону проводимости (ЗП) (ионизация) возможен при энергиях электрона не менее 9.5 эВ [24, 25], а то, что ранее считалось энергией ионизации, равной 6.5 эВ, является минимальной энергией, необходимой для прямого возбуждения электрона из ВЗ в сольватированное состояние [26]. При этом ионизация может рассматриваться как двухступенчатый процесс, включающий в себя создание сольватированных электронов e^-_{aq} с их последующим переходом в ЗП (рис.1). Данный промежуточный уровень, расположенный на 6.6 эВ выше верхней границы ВЗ, имеет конечную емкость $\chi_{trap} \approx 10^{19}$ см$^{-3}$, что составляет примерно три ловушки на 1000 молекул воды [27]. Сольватированные электроны e^-_{aq} легко перевести в ЗП, поскольку разность энергий составляет всего 3 эВ. В случае ИК лазерных импульсов процесс происходит либо вследствие многофотонного поглощения, либо ступенчато, через промежуточные p-состояния [28].

Таким образом, возбуждение электрона с его переходом из ВЗ в ЗП происходит через ионизацию сильным полем (strong field ionization, SFI) и может быть как прямым, так и через промежуточный уровень с энергией E_{ini} (называемый в работах [20, 27] «канал инициации»). Здесь и далее мы будем придерживаться той же терминологии. Скорость SFI определяется при этом выражением

$$\frac{d\rho_{SFI}}{dt} = \frac{d\rho_{ini}}{dt} + \frac{d\rho_{E_{gap}}}{dt}, \tag{1}$$

где

$$\frac{d\rho_{E_{gap}}}{dt} = \eta_{SFI}(\tilde{\Delta}); \tag{2}$$

$$\frac{d\rho_{ini}}{dt} = \eta_{SFI}(E_{ini})\left(1 - \frac{\rho_{ini}}{\rho_{ini}^{max}}\right); \tag{3}$$

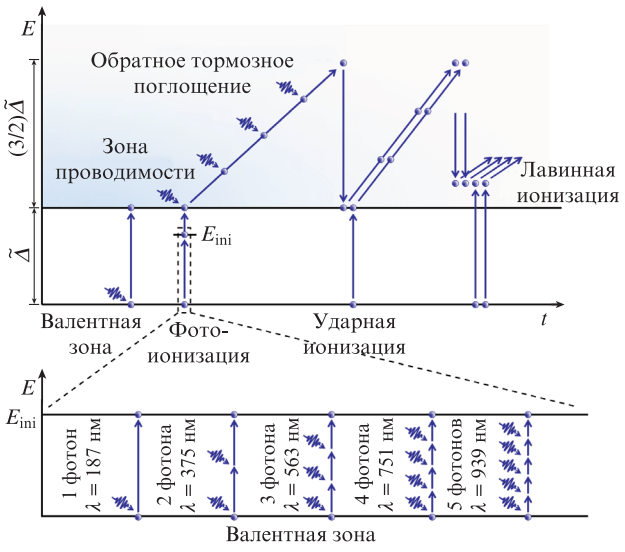

Рис.1. Схема ионизации воды при воздействии импульсов лазерного излучения.

ρ_{ini}, $\rho_{E_{gap}}$ и ρ_{SFI} – концентрации электронов, достигаемые в ЗП через канал инициации или прямым возбуждением из ВЗ в ЗП через запрещенную зону шириной E_{gap}, и суммарное значение, получаемое в результате SFI (т.е. без учета лавинной ионизации) соответственно; ρ_{ini}^{max} – максимальное значение концентрации для канала инициации, принимаемой в [20] равной $\sim 10^{19}$ см$^{-3}$. Функция $\eta_{SFI}(\ldots)$ представляет собой совокупность выражений Келдыша [19, 29]. Полная энергия, необходимая для перехода электрона из ВЗ в ЗП, задается ионизационным потенциалом $\tilde{\Delta}$, учитывающим как ширину самой запрещенной зоны, так и энергию колебаний свободных электронов в сильных электромагнитных полях [20, 29]:

$$\tilde{\Delta} = \frac{2}{\pi} E_{gap} \frac{\sqrt{1+\gamma^2}}{\gamma} E\left(\frac{1}{\sqrt{1+\gamma^2}}\right), \tag{4}$$

где

$$\gamma = \frac{\omega}{e}\sqrt{\frac{m' c n_0 \varepsilon_0 E_{gap}}{I}}$$

– параметр Келдыша, определяющий режим SFI: туннельный при $\gamma \ll 1$ и многофотонный при $\gamma \gg 1$; ω – круговая частота электрического поля лазерного импульса; e – заряд электрона; n_0 – показатель преломления среды на частоте ω; c – скорость света в вакууме; ε_0 – диэлектрическая проницаемость; I – интенсивность лазерного импульса; m' – приведенная масса экситона (берется равной половине массы электрона) [30, 31]; функция $E(\ldots)$ – эллиптический интеграл второго рода.

Из рис.1 видно, что для излучения УФ диапазона требуется существенно меньшее число фотонов, участвующих в процессе ионизации, чем для излучения видимого или ИК диапазона. В результате при одинаковой интенсивности для УФ лазерного импульса процесс многофотонного поглощения на переднем фронте лазерного импульса «включается» раньше, чем для излучения видимого и ИК диапазонов. С учетом указанных различий в работе [27] была предложена аппроксимация, обеспечивающая хорошее согласие пороговых интенсивностей пробоя воды $I_{th}(\lambda)$ для наносекундных лазерных импульсов, которая впоследствии была использована в [20] для фемтосекундных импульсов:

$$E_{ini}(\lambda) = \begin{cases} -(27/22400)\lambda + 7.59 \text{ для } \lambda \leqslant 990 \text{ нм}, \\ 6.4 \text{ для } \lambda > 990 \text{ нм}, \end{cases} \tag{5}$$

где энергия E_{ini} выражена в эВ. Для оценки концентрации электронов, достигаемой через канал инициации, выражение (5) подставлялось в (3).

Электроны в ЗП, получив через обратное тормозное поглощение (inverse Bremsstrahlung absorption, IBA) достаточную для ударной ионизации энергию E_{crit}, способствуют дальнейшей генерации свободных электронов. Для выполнения законов сохранения энергии и импульса энергия набегающего электрона должна быть больше эффективного потенциала ионизации $\tilde{\Delta}$. Для параболической запрещенной зоны минимальная энергия $E_{crit} = (3/2)\tilde{\Delta}$ [13, 19, 32]. Распределение избытка энергии электрона, оставшегося после ударной ионизации, подробно рассмотрено в [21].

Для отслеживания динамики распределения энергии электронов в ЗП при фемтосекундном пробое в 2004 г.

было предложено использовать многоскоростное уравнение (МСУ; multi-rate equation, MRE) [13], позволяющее учитывать вклады SFI и лавинной ионизации (avalanche ionization, AI). В рамках данного подхода в ЗП вводится совокупность энергетических уровней и отслеживается динамика населенности на каждом из них. Для импульсов большой длительности (критерий, касающийся длительности импульса, приведен ниже) было найдено асимптотическое решение, при котором лавинная ионизация описывалась односкоростным уравнением (ОСУ; single-rate equation, SRE), не позволяющим получить информацию об энергетическом спектре и объемной плотности энергии в диэлектрике. Решение проблемы было предложено в работе [31] в виде учета распределений остаточной энергии после ударной ионизации по уровням, введенных в классическую модель, описываемую МСУ. Однако такой подход оказался чрезвычайно ресурсоемким и требовательным к вычислительной мощности компьютера. Поэтому в работе [21] была дана оценка границ применимости всех трех упомянутых моделей с точки зрения интенсивности и длины волны лазерного излучения. Использование ОСУ допустимо при выполнении следующих условий:

$$\tau_{\rm L} \gg t_{\rm asymp}, \quad \alpha_{\rm imp} \gg W_{\rm 1pt}, \tag{6}$$

где $\tau_{\rm L}$ – длительность лазерного импульса по полувысоте; $t_{\rm asymp}$ – время выхода процесса в стационарный режим с постоянной скоростью ионизации; $\alpha_{\rm imp}$ – скорость ионизации, принятая в [21] равной 10^{15} 1/с; $W_{\rm 1pt}$ – скорость однофотонного возбуждения в модели Друде, являющаяся функцией интенсивности и несущей частоты лазерного импульса. Было показано, что условие (6) выполняется для импульса длительностью $\tau_{\rm L}$ = 250 фс с интенсивностью $I = 8.3 \times 10^{12}$ Вт/см^2, соответствующей пороговой интенсивности пробоя воды как на основной частоте (λ = 1028 нм), так и на частоте второй гармоники (λ = 514 нм). При этом ОСУ дает чуть завышенные значения концентрации электронов в ЗП по сравнению с МСУ, что, впрочем, легко компенсируется увеличением эффективного времени столкновений в модели Друде: $\tau_{\rm coll}$ = 1 фс для ОСУ и $\tau_{\rm coll}$ = 0.9 фс для МСУ [20].

В настоящей работе в расчетах использовалась асимптотическая модель лавинной ионизации в совокупности с двухканальной моделью SFI, а общее уравнение для оценки динамики электронов в ЗП имело вид

$$\frac{{\rm d}\rho_{\rm c}}{{\rm d}t} = \frac{{\rm d}\rho_{\rm SFI}}{{\rm d}t} + \eta_{\rm AI}^{\rm asymp}\rho_{\rm c} - \eta_{\rm rec}\rho_{\rm c}^2, \tag{7}$$

где $\eta_{\rm rec}$ – скорость рекомбинации, которая в расчетах берется равной 1.8×10^{12} см^3/с и является средним значением скоростей, полученных в [33] (2×10^{12} см^3/с) и в [34] (1.6×10^{12} см^3/с); $\rho_{\rm c}$ – концентрация электронов. Для оценки скорости лавинной ионизации в асимптотическом приближении можно воспользоваться соотношением [20]

$$\eta_{\rm AI}^{\rm asymp} \approx \ln 2 \frac{\tau_{\rm coll}}{\omega^2\tau_{\rm coll}^2 + 1}\left[\frac{e^2 I}{cn_0\varepsilon_0 m'(3/2)\tilde{\Delta}}\right], \tag{8}$$

где временной профиль лазерного импульса аппроксимируется функцией Гаусса

$$I(t) = I_0 \exp[-4\ln 2(t/\tau_{\rm L})^2], \tag{9}$$

а пиковое значение интенсивности импульса

$$I_0 = 2(\ln 2/\pi)^{1/2} F_0/\tau_{\rm L}. \tag{10}$$

Здесь F_0 – плотность энергии лазерного пучка. Пространственное распределение интенсивности в фокусе лазерного пучка по аналогии с [19] определяется выражением

$$I(r,z) = I_0 \exp\left[-2\left(\frac{r^2}{a^2} + \frac{z^2}{b^2}\right)\right], \tag{11}$$

где r – радиальная координата, соответствующая расстоянию от оси лазерного пучка; a и b – длины малой и большой осей эллипсоида, задающего область фокусировки лазерного пучка (поперечное сечение имеет гауссову форму, значения берутся по уровню $1/e^2$) с интенсивностью в центре пучка $I(0,0) = I_0$. Ось z совпадает с осью лазерного пучка и ориентирована в направлении его распространения. Плоскость перетяжки пучка имеет координату $z = 0$.

2.2. Динамика теплового воздействия

Оценка теплового воздействия фемтосекундного импульса была приведена ранее в работах [19, 20], где увеличение температуры в области фокусировки лазерного излучения ΔT оценивалось через плотность энергии электронов

$$U = \rho_{\rm c}(\tilde{\Delta} + \bar{E}_{\rm kin}), \tag{12}$$

где $\bar{E}_{\rm kin}$ – средняя кинетическая энергия электронов, которая в предположении о равномерном распределении последних по уровням в ЗП равна $(5/4)\tilde{\Delta}$ [20]. Тогда с учетом плотности ρ_0 и удельной теплоемкости C_p воды увеличение температуры может быть оценено как

$$\Delta T = \frac{U}{\rho_0 C_p} = \frac{9}{4}\frac{\rho_{\rm c}\tilde{\Delta}}{\rho_0 C_p}. \tag{13}$$

Данный подход позволяет оценить максимальную температуру в области воздействия, однако для исследования динамики температуры требуется решение задачи теплопроводности.

2.2.1. Область моделирования: геометрия и граничные условия. Рассмотрим процедуру лазерной микрохирургии эмбриона более подробно. Типичный вид преимплантационного эмбриона млекопитающих на ранних стадиях развития представлен на рис.2. Как и яйцеклетка, эмбрион в первые пять-семь дней своего развития окружен защитной гликопротеиновой оболочкой (zona pellucida). Наиболее востребованные эмбриомикрохирургические процедуры как раз и заключаются в лазерном воздействии на прозрачную оболочку [35]. Лазерные УКИ успешно применялись для диссекции прозрачной оболочки и формирования в ней отверстия [36] для дальнейшего забора клеточного материала и проведения преимплантационной генетической диагностики (так называемая биопсия полярного тельца [37]), а также для биопсии клеток трофэктодермы [38] и слияния бластомеров [39,40]. Воздействие фемтосекудных лазерных импульсов с целью частичного или полного нарушения целостности прозрачной оболочки на различных стадиях преимплантационного развития эмбрионов для стимулирования их вылупления из оболочки и повышения шансов на успешную

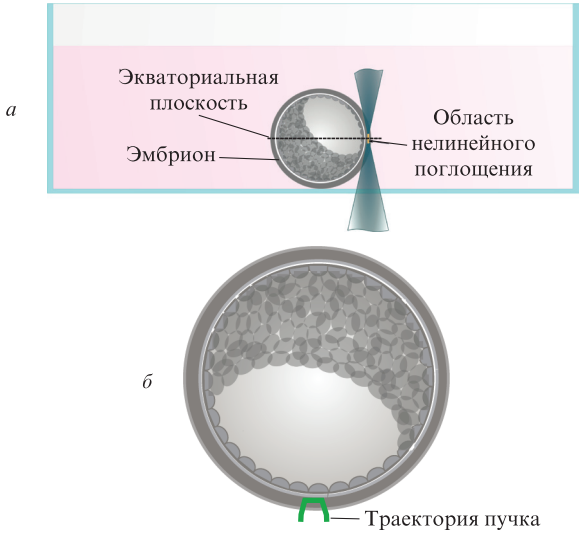

Рис.2. Пояснения к процедуре микрохирургии эмбриона фемтосекундными лазерными импульсами: вид сбоку (*а*) и траектория движения пучка в экваториальной плоскости (*б*).

имплантацию в полости матки также было продемонстрировано в недавних работах [11, 41]. С использованием фемтосекундных лазерных импульсов стала возможной разработка технологии, заключающейся в нанесении на прозрачную оболочку эмбрионов уникального буквенно-цифрового кода для идентификации эмбрионов на всех этапах преимплантационного развития и исключения риска их «перепутывания» [42, 43].

Вкратце, процедура лазерной микрохирургии оболочки эмбрионов с применением фемтосекундных лазерных импульсов выполняется следующим образом. Эмбрионы, полученные в соответствии с четкими протоколами [44], культивируются до требуемого срока развития в инкубаторе при оптимальных условиях (37 °C, 5% CO_2). Перед проведением микрохирургических процедур их извлекают из инкубатора и перемещают в специализированную среду для манипуляций в чашку Петри со стеклянным дном. Затем чашку Петри закрепляют на моторизованном предметном столике инвертированного микроскопа, входящего в состав установки фемтосекундный скальпель–оптический пинцет [45]. Далее оператор находит выбранный эмбрион в чашке, размечает область воздействия в специализированном программном обеспечении и запускает автоматизированную процедуру лазерного воздействия. Микрохирургическое воздействие осуществляется последовательностью лазерных импульсов при одновременном перемещении объекта относительно неподвижного пучка. Длительность процедуры составляет несколько секунд. После этого оператор убирает чашку Петри в инкубатор. Поскольку суммарное время нахождения чашки вне инкубатора не превышает 5 мин, начальная температура T_0 среды (воды) при моделировании берется равной 37 °C.

Нами рассматривается случай фокусировки лазерного пучка сквозь стеклянное дно чашки Петри в экваториальной плоскости эмбриона (плоскость наибольшего сечения). Последняя находится на расстоянии ~75 мкм над поверхностью дна чашки (рис.2). Таким образом, при моделировании лазерного воздействия среда имеет форму цилиндра с радиусом b_c и высотой h_c, ось которого совпадает с осью лазерного пучка (рис.3). Температура стенок

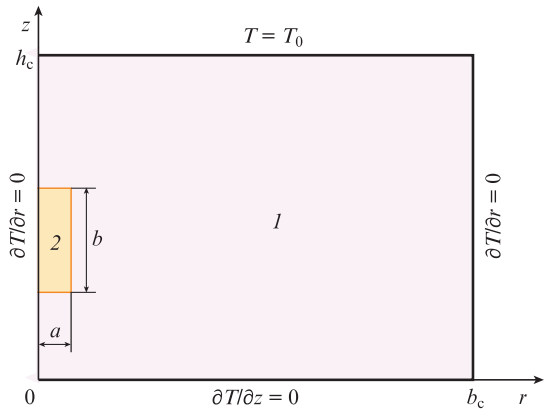

Рис.3. Граничные условия для задачи теплопереноса:
1 – среда при температуре $T = T_0$; *2* – область перетяжки лазерного пучка.

цилиндра берется равной константе ($T = T_0$), а граничные условия соответствуют условиям Дирихле. Верхняя поверхность цилиндра представляет собой границу раздела вода–воздух, температура которого под крышкой чашки Петри считается постоянной ($T_0 = 37$ °C).

2.2.2. Задача теплопереноса. Следует отметить, что задача оценки теплового воздействия лазерных импульсов на эмбрион рассматривалась ранее в работах [7, 8] для длительностей импульсов $\tau_L = 0.6$ и 3 мс на длине волны излучения 1480 нм, типичных для коммерчески доступных лазерных диссекторов в клиниках экстракорпорального оплодотворения (ЭКО). Сравнение результатов решения задачи для импульсов миллисекундной и фемтосекундной длительности представляет интерес с точки зрения оценки оказываемого теплового воздействия на эмбрион. Поэтому моделирование воздействия фемтосекундного импульса проведено нами с использованием геометрии задачи, решенной ранее в указанных работах [7, 8].

Уравнение теплопроводности в цилиндрических координатах может быть записано в виде

$$\rho_0 C_p \frac{\partial T}{\partial t} = k(T)\left[\frac{1}{r}\frac{\partial}{\partial r}\left(r\frac{\partial T}{\partial r}\right) + \frac{\partial^2 T}{\partial z^2}\right] + S, \qquad (14)$$

где плотность воды ρ_0 взята в кг/м^3, а ее удельная теплоемкость C_p – в Дж·К$^{-1}$·кг$^{-1}$; S – плотность мощности источника. Зависимость теплопроводности воды $k(T)$ (в Вт·м$^{-1}$·К$^{-1}$) от температуры в диапазоне 0–100 °C была представлена ранее в [46]:

$$k(T) = 0.6065\left(-1.48445 + \frac{4.12292}{298.15}T - \frac{1.63866}{298.15^2}T^2\right). \qquad (15)$$

2.2.3. Функция теплового источника. При использовании импульсов миллисекундной длительности ключевую роль играет процесс линейного поглощения, поскольку лазерный импульс нагревает среду по мере его распространения. В этом случае функция теплового источника может быть представлена отдельно для области перетяжки радиусом $r_0 = a$ [8]:

$$S_0 = \frac{\alpha P}{\pi a^2}\exp\left[-2\left(\frac{r}{a}\right)^2\right], \qquad (16)$$

а также для сходящейся и расходящейся областей фокусируемого лазерного пучка:

$$S_{\pm} = \frac{\alpha P}{2\pi(1-\cos\theta)}\frac{1}{r^2+z^2}\exp\left\{-2\left[\frac{\arctan(r/z)}{\theta}\right]^2\right\}$$

$$\times\exp[\pm\alpha(r^2+z^2)^{1/2}], \qquad (17)$$

где P – мощность источника; θ – угол конуса для сходящейся и расходящейся областей лазерного пучка; α – коэффициент поглощения, который на длине волны излучения миллисекундного лазерного диссектора (как и в [8]) принимается равным 21 см$^{-1}$ [47]. Угол θ определяется числовой апертурой фокусирующего микрообъектива NA и показателем преломления среды: $\theta = \arcsin(\mathrm{NA}/n_0)$.

При воздействии импульса миллисекундной длительности в работах [7, 8] временной профиль плотности мощности теплового источника имел ступенчатый вид и задавался условием

$$S = \begin{cases} S_\Sigma, & t \leqslant \tau_\mathrm{L}, \\ 0, & t > \tau_\mathrm{L}, \end{cases} \qquad (18)$$

где .

При воздействии фемтосекундного лазерного импульса временной профиль плотности мощности теплового источника определяется динамикой концентрации электронов в ЗП и плотности их энергии U:

$$S = \frac{\mathrm{d}U}{\mathrm{d}t} = \frac{9}{4}\left(\frac{\mathrm{d}\rho_\mathrm{c}}{\mathrm{d}t}\right)\tilde{\Delta}. \qquad (19)$$

Поскольку передача электроном накопленной в области фокусировки энергии в уравнении (7) определяется членом, описывающим рекомбинацию, то выражение (19) можно записать в виде

$$S \approx \frac{9}{4}\left(\frac{\mathrm{d}\rho_\mathrm{c}}{\mathrm{d}t}\right)_\mathrm{rec}\tilde{\Delta}. \qquad (20)$$

Для исследования динамики температуры решение дифференциальных уравнений (14)–(20) осуществлялось методом конечных элементов (finite element analysis, FEA) по аналогии с работой [7].

3. Результаты моделирования

Для оценки теплового воздействия фемтосекундного лазерного импульса необходимо решить две задачи: расчет динамики концентрации свободных электронов, определяющих временной профиль теплового источника в области фокусировки, и расчет температурного поля $T(r,z)$ после окончания действия лазерного импульса в различные моменты времени. Для проверки правильности решения соответствующих задач значения исходных параметров модели были взяты из ранее опубликованных работ, затем было проведено сравнение полученных зависимостей. В конце настоящего раздела представлены результаты расчета для параметров лазерного импульса, используемого для микрохирургии эмбриона.

3.1. Оценка концентрации свободных электронов в области фокусировки

Для расчета динамики концентрации электронов ρ_c уравнение (7) с учетом выражений (1)–(5) и (8)–(10) решалось численно методом Рунге–Кутты с адаптивным шагом. Полученные результаты (рис.4–6) сопоставлены с приведенными в работе [20], в которой в модель был впервые введен дополнительный канал инициации. В указанной работе интенсивность излучения I_0 лазерного импульса длительностью τ_L = 250 фс составила 8.25×10^{12} Вт/см^2 (выбрана как среднее значение, соответствующее экспериментально измеренной интенсивности порога пробоя воды в диапазоне длин волн 330–1090 нм). На рис.4 представлены скорости многофотонной ионизации η_SFI в зависимости от длины волны лазерного излучения. Скорости снижаются с ростом длины волны и числа фотонов, необходимых для преодоления запрещенной зоны. Последним обстоятельством объясняется и ступенчатый профиль кривой. Полученные значения (точки на рис.4) демонстрируют хорошее согласие с результатами расчета [20].

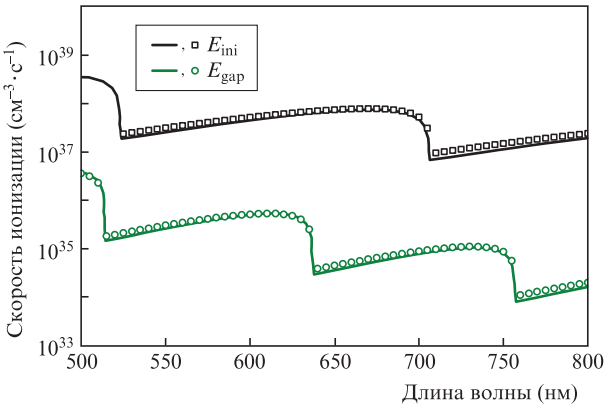

Рис.4. Зависимости скорости многофотонной ионизации для уровней с энергиями E_ini и E_gap от длины волны излучения. Расчеты проведены для интенсивности $I_0 = 8.25\times10^{12}$ Вт/см^2. Кривые – данные из [20], точки – настоящая работа.

Вклад каждого из каналов ионизации хорошо прослеживается по динамике концентрации свободных электронов (рис.5), рассчитанной для длины волны λ = 520 нм. Концентрация в канале инициации быстро насыщается и к моменту времени, соответствующему максимуму интенсивности лазерного импульса (t = 0), уже достигает своего максимального значения $\rho_\mathrm{ini}^\mathrm{max} = 10^{19}$ см$^{-3}$ [20]. Лавинная

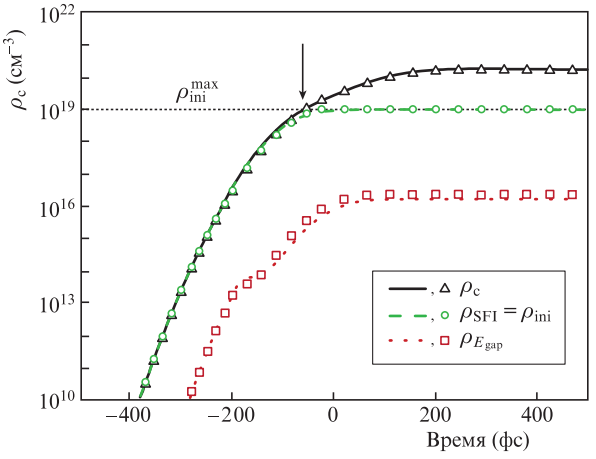

Рис.5. Динамика концентрации электронов для фемтосекундного импульса длительностью τ_L = 250 фс с интенсивностью $I_0 = 8.25\times10^{12}$ Вт/см^2 на длине волны излучения λ = 520 нм. Кривые – данные из [20], точки – настоящая работа.

ионизация ($\rho_{AI} = \rho_c - \rho_{SFI}$) начинает проявляться также ближе к максимуму интенсивности (показано стрелкой), когда накоплено достаточное число свободных электронов, и ее вклад составляет $\rho_{AI}/\rho_{SFI} = 17$. В общем случае вклады многофотонной и лавинной ионизации зависят от длительности лазерного импульса, ширины запрещенной зоны и параметров среды, определяющих столкновительные процессы. Любые промежуточные энергетические уровни между ВЗ и ЗП, существующие в прозрачных диэлектриках, тоже оказывают большое влияние. Как отмечалось ранее, в воде наличие промежуточного уровня с энергией E_{ini} обусловлено особой геометрией расположения молекул, поддерживаемой слабыми водородными связями. Последние могут быть разрушены электрическим полем электронов ЗП при их накоплении в достаточном количестве. Значение $\rho_{ini}^{max} = 10^{19}$ см$^{-3}$, совпадающее с емкостью χ_{trap} канала инициации, является эмпирическим параметром, полученным в [20] при подгонке расчетного значения интенсивности порога пробоя воды $I_{th}(\lambda)$ к экспериментальному в широком диапазоне длин волн: $\lambda = 330–1100$ нм. В соответствии с наблюдениями авторов указанной работы насыщение происходит только для длин волн $\lambda < 530$ нм. Для более длинноволнового излучения число фотонов, необходимых для перехода электрона на уровень с энергией E_{ini}, меняется с 3 на 4, а значение $\rho_{ini}^{max}/\chi_{trap}$ становится меньше 60%.

На рис.6 представлены оценки объемной плотности энергии U электронов в зависимости от интенсивности лазерного импульса, полученные в работе [21] для импульса длительностью $\tau_L = 250$ фс на длине волны излучения $\lambda = 515$ нм. Приращение температуры рассчитывалось по формуле (13). Результаты расчетов, выполненных в настоящей работе (точки на рис.6), демонстрируют хорошее согласие с результатами, полученными в [21] с применением ОСУ. Найденная зависимость позволяет оценить приращение температуры в диапазоне интенсивностей лазерного импульса, используемых для микрохирургии эмбриона. Так, при типичном значении $I_0 = 2.5 \times 10^{12}$ Вт/см^2 ожидаемое увеличение температуры составляет единицы градусов. В то же время значение $I_0 = 7.5 \times 10^{12}$ Вт/см^2, являющееся предельным [43] для микрохирургии на длине волны $\lambda = 515$ нм вследствие начала формирования кавитационных пузырей, соответствует приросту температуры $\Delta T \approx 100$ °C.

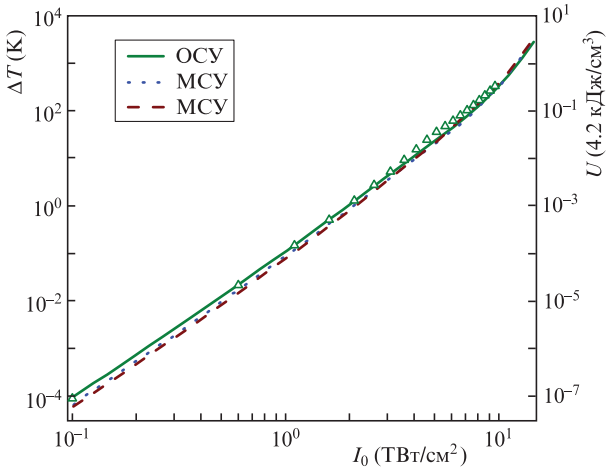

Рис.6. Зависимости объемной плотности энергии U от интенсивности лазерного импульса I_0 для фемтосекундного импульса длительностью $\tau_L = 250$ фс на длине волны излучения $\lambda = 515$ нм. Приращение температуры ΔT вследствие вклада энергии определяется по формуле (13). Кривые – данные из [21] (использовались две модели для МСУ), точки – настоящая работа.

3.2. Расчет температурного поля после окончания действия лазерного импульса

Для оценки динамики пространственного распределения температуры требуется решение уравнений (15)–(17), приведенных в п.2.2. Для оценки точности решения задачи теплопереноса выполнено сравнение результатов оценки температур, полученных в настоящей работе, с результатами оценки в [8] для импульса субмиллисекундной длительности.

В применяемых в клинической практике лазерных диссекторах мощность источника излучения является постоянной, а энергия импульса регулируется изменением его длительности. Очевидно, что с ростом последней нагрев в области воздействия будет только увеличиваться, поэтому для оценки минимально возможного теплового воздействия на эмбрион в расчетах использовалась минимально достижимая длительность лазерного импульса $\tau_L = 0.6$ мс. Вместе с тем следует отметить, что в работе [8] есть ссылка на протоколы по микрохирургии эмбрионов человека для клиник ЭКО, в которых типичное значение длительности составляет 0.8 мс.

Оценка точности решения задачи теплопроводности осуществлялась путем сравнения результатов расчета с данными, полученными в работе [8] для $P = 245$ мВт и $\tau_L = 0.6$ мс. Угол θ в уравнении (17) определяется числовой апертурой микрообъектива и, с учетом показателя преломления воды для входящего в объектив коллимированного пучка диаметром 1.3 мм, составляет 12.6°; радиус перетяжки $a = 2$ мкм [8], а ее длина $b = 2a\cot\theta \approx 18$ мкм (см. рис.3).

Динамика температуры в плоскости перетяжки $T(r, z = 0)$ представлена на рис.7. Показана серия кривых для различных значений r, позволяющих оценить температуру нагрева на заданном расстоянии от оси лазерного пучка. Вследствие малого размера теплового источника наблюдается быстрое остывание области нагрева после окончания действия лазерного импульса – температура снижается в два раза от максимального значения ~370 °C за время ~6 мкс. Можно отметить хорошее согласие полученных значений температур (точки на рис.7) с резуль-

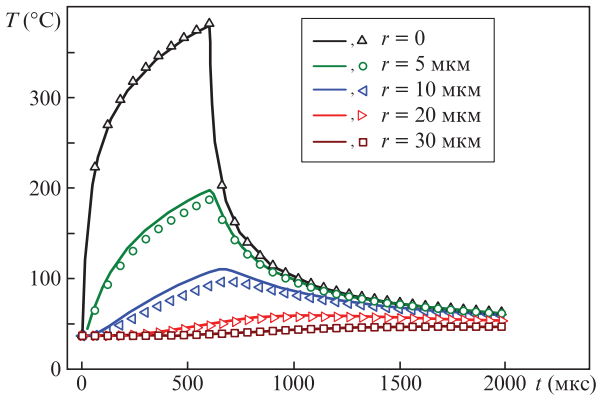

Рис.7. Динамика температуры на различных расстояниях r от оси лазерного пучка в плоскости перетяжки. Кривые – данные из [8] ($\lambda = 1480$ нм, $\tau_L = 0.6$ мс, $P = 250$ мВт, NA = 0.6), точки – настоящая работа.

татами расчета (кривые), выполненного в [8]. Расхождения в пределах 5% обусловлены конечным шагом координатной сетки Δr и неточностью интерполяции значений в точках, задаваемых плоскостями сечения.

3.3. Сравнение теплового воздействия, оказываемого фемтосекундными и миллисекундными импульсами при микрохирургии эмбриона

Здесь представлены результаты моделирования взаимодействия фемтосекундного импульса с водной средой для значений параметров излучения, используемых при проведении микрохирургической процедуры вспомогательного хэтчинга или маркировки блестящей оболочки [10, 43]. Расчеты выполнены для излучения лазерного импульса на длине волны $\lambda = 514$ нм с временным профилем интенсивности гауссовой формы с пиковым значением $I_0 = 2.5 \times 10^{12}$ Вт/см^2, длительностью $\tau_L = 280$ фс по полувысоте, сфокусированного микрообъективом Olympus UPLFLN 20$^\times$ с числовой апертурой NA = 0.5 в пятно диаметром 1.9 мкм по уровню 1/e.

На рис.8 приведены временные зависимости интенсивности лазерного импульса $I(t)$ и объемной плотности мощности теплового источника $S(t)$ в центре перетяжки ($r = 0$, $z = 0$) лазерного пучка. Отметим, что при длительности лазерного импульса в несколько сотен фемтосекунд значение $S(t)$ снижается в два раза на временном масштабе порядка сотни пикосекунд. Таким образом, длительность стадии остывания при воздействии лазерных УКИ существенно превышает длительность стадии нагрева, что было качественно продемонстрировано авторами работы [48]. Данное обстоятельство позволяет предположить, что существует потенциальная возможность применения лазерных источников пикосекундной длительности для задач микрохирургии.

Считая, что концентрация электронов в ЗП в момент окончания действия лазерного импульса пропорциональна $I^{k'}$, пространственное распределение может быть записано в виде

$$\rho_{\max}(r,z) = \rho_{\max}(I(0,0))\exp\left[-2k'\left(\frac{r^2}{a^2}+\frac{z^2}{b^2}\right)\right], \qquad (21)$$

где $\rho_{\max}$ – максимальное значение концентрации электронов; k' – число фотонов, требуемых для многофотонной

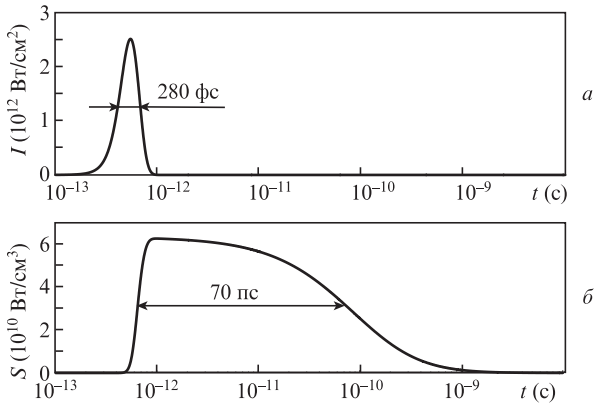

Рис.8. Временные профили интенсивности лазерного импульса $I(t)$ (*а*) и объемной плотности мощности теплового источника $S(t)$ (*б*) в точке с координатами $r = 0$, $z = 0$ при воздействии фемтосекундного лазерного импульса.

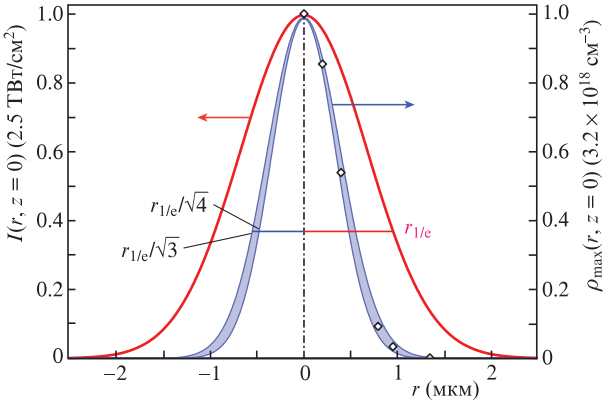

Рис.9. Пространственные распределения интенсивности $I(r, z = 0)$ и максимальной концентрации электронов $\rho_{\max}(r, z = 0)$ в фокусе лазерного импульса.

ионизации. Длина волны излучения $\lambda = 514$ нм приходится на границу перехода от трехфотонного поглощения к четырехфотонному. Расчет зависимости максимальных значений концентрации от интенсивности лазерного импульса $\rho_{\max}(I)$ в точке (0, 0) показал (точки на рис.9), что наилучшее согласие с уравнением (21) достигается при $k' = 3-4$. Полученные данные позволили оценить временной и пространственный профили плотности мощности теплового источника для решения задачи теплопереноса, сформулированной в п.2.2.2.

Для демонстрации существенных различий на рис.10 представлены пространственные распределения максимальных температур в области фокусировки, достигаемых в результате воздействия импульсов миллисекундной (рис.10,*а*) и фемтосекундной (рис.10,*б*) длительности. В первом случае распределение $T(r, z)$ получено в момент времени $t = 0.6$ мс, т.е. в момент окончания действия лазерного импульса. Во втором случае максимальная температура достигается при временах $t \approx 10$ нс (рис.10,*в*) после окончания импульса. Белыми линиями на рис.10,*а*, *б* показана геометрия лазерного пучка. Изотермы построены с шагом 20 °C.

Для миллисекундного импульса расчет выполнен для значений параметров, использованных в работе [8] при микрохирургии блестящих оболочек эмбрионов мыши, хомяка и коровы, обеспечивающих минимальный энерговклад: $P = 180$ мВт, $\tau_L = 0.6$ мс. В результате поглощения импульса формируется область перегретой воды в форме цилиндра с диаметром ~20 мкм и высотой ~100 мкм. В случае фемтосекундного импульса изменение температуры не превышает 2.5 °C. Результаты расчета демонстрируют существенно лучшую локализацию температуры для фемтосекундных импульсов, что обусловлено геометрией теплового источника, описываемого выражениями (19)–(21).

Динамика пространственного распределения температуры представлена на рис.11 для миллисекундного и фемтосекундного лазерных импульсов. При миллисекундном воздействии температура достигает более 80 °C в окрестности радиусом 10 мкм от центра пучка и 50 °C – в окрестности радиусом 20 мкм. Данное обстоятельство накладывает существенные ограничения на выполнение микрохирургических процедур (сверление, истончение, «открытие» zona pellucida) вследствие высоких рисков термического повреждения клеток эмбриона, прилегающих изнутри к блестящей оболочке. При поглощении

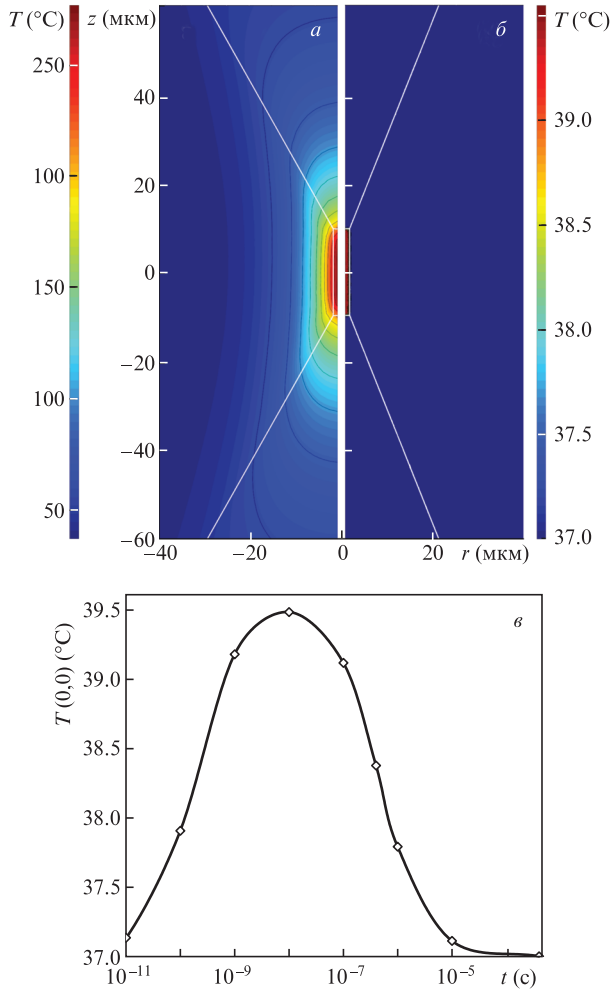

Рис.10. Результаты расчета методом конечных элементов максимальных температур в результате поглощения миллисекундных (*а*) и фемтосекундных (*б*) лазерных импульсов в водной среде, а также динамика температуры в центре пятна $T(0,0)$ при фемтосекундном воздействии (*в*). Начальная температура среды T_0 = 37 °C, λ = 1480 нм, τ_L = 0.6 мс, P = 180 мВт, температура в центре 270 °C (*а*) и λ = 514 нм, τ_L = 280 фс, $I_0 = 2.5 \times 10^{12}$ Вт/см^2, температура в центре 39.5 °C (*б*). И зотермы построены с шагом 20 °C. Белыми линиями показана геометрия лазерного пучка.

фемтосекундного импульса размер области термического воздействия сравним с диаметром пятна фокусировки лазерного излучения, что создает предпосылки для безопасного проведения микрохирургических процедур с блестящей оболочкой эмбриона даже при непосредственном прилегании эмбриональных клеток к оболочке в области воздействия.

4. Заключение

Целью настоящего исследования являлась оценка теплового воздействия, оказываемого фемтосекундными лазерными импульсами при выполнении микрохирургических процедур в рамках ВРТ. Была использована модель поглощения фемтосекундных импульсов в водной среде, подробно описанная группой авторов в серии работ за 2003–2019 гг. [18–21], для оценки динамики электронов в области фокусировки. Достоверность результатов моделирования была подтверждена ранее авторами указанных работ в экспериментальных исследованиях пробоя воды импульсами лазерного излучения [49].

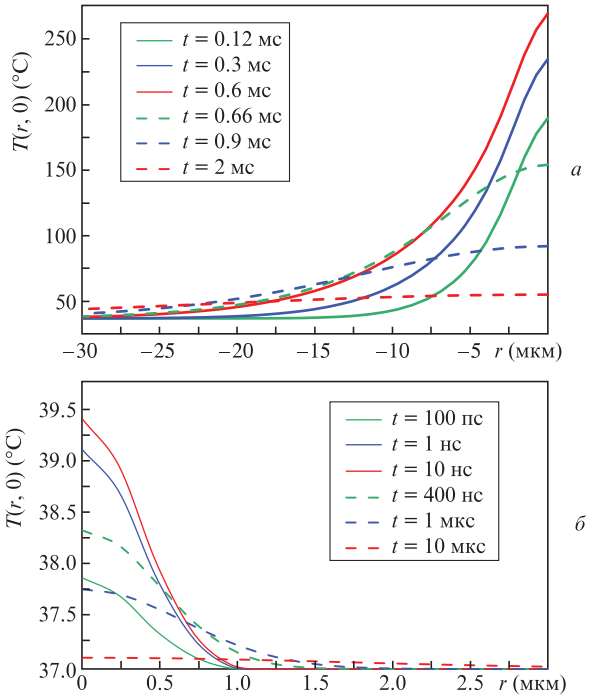

Рис.11. Радиальные профили температуры $T(r, z=0)$ в различные моменты времени для импульса миллисекундной (*а*) и фемтосекундной (*б*) длительности. Сплошные кривые – стадия нагрева, штриховые – стадия охлаждения.

Решение уравнений модели выполнялось численно в среде MATLAB. Были получены пространственные и временные характеристики теплового источника при решении задачи теплопереноса для оценки пространственного распределения температуры после окончания действия лазерного импульса. В качестве входных параметров модели были взяты параметры фемтосекундных лазерных импульсов, используемые для успешной реализации таких микрохирургических процедур, как диссекция и микрогравировка блестящей оболочки эмбриона (λ = 514 нм, τ_L = 280 фс, $I_0 = 2.5 \times 10^{12}$ Вт/см^2). В результате было найдено пространственное распределение температуры в области фокусировки, а также исследована динамика температурного поля после окончания действия фемтосекундного импульса. Проведено сравнение полученных результатов с данными для значений параметров лазерных импульсов, используемых в миллисекундных лазерных диссекторах в клиниках ЭКО.

Показано, что максимальная температура, достигаемая в центре области фокусировки при воздействии фемтосекундного лазерного импульса и при заданных нами параметрах, составляет 39.5 °C, что значительно меньше температуры, достигающей 350 °C при воздействии миллисекундного лазерного импульса. Кроме того, в случае импульсов фемтосекундной длительности процессы нелинейного (многофотонного) поглощения позволяют предельно локализовать область воздействия. Так, радиус формируемого теплового источника примерно в два раза меньше радиуса перетяжки лазерного пучка, что открывает возможность для выполнения микрохирургических процедур с субдифракционной точностью.

Также стоит отметить, что длительность существования теплового источника, создаваемого в области фокусировки, на несколько порядков превышает длительность самого лазерного импульса. Данное обстоятельст-

во создает предпосылки для применения пикосекундных лазерных источников для выполнения микрохирургических процедур. Однако ответ на вопрос о целесообразности этого требует проведения дополнительных исследований и остается за рамками настоящей работы.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Госзадание № 075-01056-22-00).

1. Tirlapur U.K., König K. *Nature*, **418**, 290 (2002).
2. Ferrando-May E., Tomas M., Blumhardt P., Stöckl M., Fuchs M., Leitenstorfer A. *Front. Genet*., **4**, 135 (2013).
3. Chung S.H., Mazur E. *J. Biophotonics*, **2**, 557 (2009).
4. Friedman N.J., Palanker D.V., Schuele G., Andersen D., Marcellino G., Seibel B.S., Batlle J., Feliz R., Talamo J.H., Blumenkranz M.S., Culbertson W.W. *J. Cataract Refract. Surg*., **37**, 1189 (2011).
5. Hoy C.L., Ferhanoglu O., Yildirim M., Ki Hyun Kim, Karajanagi S.S., Chan K.M.C., Kobler J.B., Zeitels S.M., Ben-Yakar A. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron*., **20**, 242 (2014).
6. Ratkay-Traub I., Ferincz I.E., Juhasz T., Kurtz R.M., Krueger R.R. *J. Refract. Surg*., **19**, 94 (2003).
7. Douglas-Hamilton D.H., Conia J. *J. Biomed. Opt*., **6**, 205 (2001).
8. Tadir Y., Douglas-Hamilton D.H. *Methods Cell Biol*., **82**, 409 (2007).
9. Chatzimeletiou K., Morrison E.E., Panagiotidis Y., Prapas N., Prapas Y., Rutherford A.J., Grudzinskas G., Handyside A.H. *Reprod. Biomed. Online*, **11**, 697 (2005).
10. Ilina I.V., Khramova Y.V., Filatov M.A., Sitnikov D.S. *J. Assist. Reprod. Genet*., **36**, 1251 (2019).
11. Ilina I.V., Khramova Y.V., Ivanova A.D., Filatov M.A., Silaeva Y.Y., Deykin A.V., Sitnikov D.S. *J. Assist. Reprod. Genet*., **38**, 517 (2021).
12. Mao S.S., Quéré F., Guizard S., Mao X., Russo R.E., Petite G., Martin P. *Appl. Phys. A: Mater. Sci. Process*., **79**, 1695 (2004).
13. Rethfeld B. *Phys. Rev. Lett*., **92**, 187401 (2004).
14. Gulley J.R. *Proc. SPIE*, **8190**, 819022 (2011).
15. Гейнц Ю.Э., Голик С.С., Землянов А.А., Кабанов А.М., Петров А.В. *Квантовая электроника*, **46**, 133 (2016) [*Quantum Electron*., **46**, 133 (2016)].
16. Джонг Б., Ли Б., Ким Ч.Х., Чой Ч.А., Янг Ч., Салль Е.Г., Ким Ч.В., Хо Д., Джанг Дж., Ким Г.Х., Яшин В.Е. *Квантовая электроника*, **50**, 201 (2020) [*Quantum Electron*., **50**, 201 (2020)].
17. Guo B., Sun J., Hua Y., Zhan N., Jia J., Chu K. *Nanomanufacturing Metrol*., **3**, 26 (2020)
18. Vogel A., Venugopalan V. *Chem. Rev*., **103**, 577 (2003).
19. Vogel A., Noack J., Hüttman G., Paltauf G. *Appl. Phys. B*, **81**, 1015 (2005).
20. Linz N., Freidank S., Liang X.X., Vogel A. *Phys. Rev. B*, **94**, 1 (2016).
21. Liang X.-X., Zhang Z., Vogel A. *Opt. Express*, **27**, 4672 (2019).
22. Docchio F., Sacchi C., Marshall J. *Lasers Ophthalmol*., **1**, 83 (1986).
23. Williams F., Varma S.P., Hillenius S. *J. Chem. Phys*., **64**, 1549 (1976).
24. Elles C.G., Jailaubekov A.E., Crowell R.A., Bradforth S.E. *J. Chem. Phys*., **125**, 044515 (2006).
25. Sander M.U., Gudiksen M.S., Luther K., Troe J. *Chem. Phys*., **258**, 257 (2000).
26. Bartels D.M., Crowell R.A. *J. Phys. Chem. A*, **104**, 3349 (2000).
27. Linz N., Freidank S., Liang X.-X., Vogelmann H., Trickl T., Vogel A. *Phys. Rev. B*, **91**, 134114 (2015).
28. Son D.H., Kambhampati P., Kee T.W., Barbara P.F. *J. Phys. Chem. A*, **105**, 8269 (2001).
29. Келдыш Л.В. *ЖЭТФ*, **47**, 1945 (1965) [*Sov. Phys. JETP*, **20**, 1307 (1965)].
30. Kennedy P.K. *IEEE J. Quantum Electron*., **31**, 2241 (1995).
31. Christensen B.H., Balling P. *Phys. Rev. B*, **79**, 155424 (2009).
32. Kaiser A., Rethfeld B. *Phys. Rev. B: Condens. Matter Mater. Phys*., **61**, 11437 (2000).
33. Docchio F. *Europhys. Lett*., **6**, 407 (1988).
34. Sarpe-Tudoran C., Assion A., Wollenhaupt M., Winter M., Baumert T., Assion A., Wollenhaupt M., Winter M., Baumert T. *Appl. Phys. Lett*., **88**, 261109 (2006).
35. Davidson L.M., Liu Y., Griffiths T., Jones C., Coward K. *Reprod. Biomed. Online*, **38**, 725 (2019).
36. Ilina I.V., Khramova Y.V., Filatov M.A., Semenova M.L., Sitnikov D.S. *High Temp*., **54**, 46 (2016).
37. Ilina I.V., Khramova Y.V., Filatov M.A., Semenova M.L., Sitnikov D.S. *High Temp*., **53**, 804 (2015).
38. Ilina I.V., Rakityanskiy M.M., Sitnikov D.S., Ovchinnikov A.V., Agranat M.B., Khramova Y.V., Semenova M.L. *AIP Conf. Proc*., **1464**, 560 (2012).
39. Krivokharchenko A., Karmenyan A., Sarkisov O., Bader M., Chiou A., Shakhbazyan A. *PLoS One*, **7**, e50029 (2012).
40. Осыченко А.А., Залесский А.Д., Кривохарченко А.С., Шахбазян А.К., Рябова А.В., Надточенко В.А. *Квантовая электроника*, **45**, 498 (2015) [*Quantum Electron*., **45**, 498 (2015)].
41. Ilina I.V., Filatov M.A., Khramova Y.V., Sitnikov D.S. *Proc. 2020 Int. Conf. Laser Optics (ICLO)* (St. Petersburg, IEEE, 2020).
42. Ilina I.V., Khramova Y.V., Filatov M.A., Sitnikov D.S. *Proc. SPIE*, **11079**, 110798 (2019).
43. Ilina I.V., Khramova Y.V., Filatov M.A., Sitnikov D.S. *Biomed. Opt. Express*, **10**, 2985 (2019).
44. Hogan B., Beddington R., Costantini F., Lacy E. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Lab., 2014).
45. Sitnikov D.S., Ovchinnikov A.V., Ilina I.V., Chefonov O.V., Agranat M.B. *High Temp*., **52**, 803 (2014).
46. Ramires M.L.V., Nieto de Castro C.A., Nagasaka Y., Nagashima A., Assael M.J., Wakeham W.A. *J. Phys. Chem. Ref. Data*, **24**, 1377 (1995).
47. Hale G.M., Querry M.R. *Appl. Opt*., **12**, 555 (1973).
48. Вейко В.П., Шахно Е.А., Яковлев Е.Б. *Квантовая электроника*, **44**, 322 (2014) [*Quantum Electron*., **44**, 322 (2014)].
49. Vogel A., Linz N., Freidank S., Paltauf G. *Phys. Rev. Lett*., **100**, 038102 (2008).