

OPTYKA BIOMEDYCZNA

Wybrane zagadnienia

Redakcja

Halina Podbielska



Oficina Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej
Wrocław 2011

Książka powstała pod auspicjami
Komitetu Fizyki Medycznej, Radiobiologii i Diagnostyki Obrazowej
Polskiej Akademii Nauk

Recenzenci

Zofia DRZAZGA
Eugeniusz JAGOSZEWSKI
Wiesław STRĘK
Jerzy WALECKI

Opracowanie redakcyjne i korekta

Katarzyna WYSOCKA-KRÓL

Projekt okładki

Igor BUZALEWICZ

Wszelkie prawa zastrzeżone. Żadna część niniejszej książki, zarówno w całości,
jak i we fragmentach, nie może być reprodukowana w sposób elektroniczny,
fotograficzny i inny bez zgody wydawcy i właścicieli praw autorskich.

© Copyright by Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2011

OFICyna WYDAWNICZA POLITECHNIKI WROCLAWSKIEJ
Wybrzeże Wyspiańskiego 27, 50-370 Wrocław
<http://www.oficyna.pwr.wroc.pl>;
e-mail: oficwyd@pwr.wroc.pl; zamawianie.ksiazek@pwr.wroc.pl

ISBN 978-83-7493-637-8

Drukarnia Oficyny Wydawniczej Politechniki Wrocławskiej. Zam. nr 1034/2011.

AUTORZY

Dr inż. Joanna Bauer

*Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki,
Politechnika Wroclawska, 50-370 Wroclaw, Wybrzeże Wyspiańskiego 27*

Dr n. o kult. fiz. Ewa Boerner

*Wydział Fizjoterapii, Akademia Wychowania Fizycznego we Wroclawiu,
51-612 Wroclaw, al. I.J. Paderewskiego 35*

Mgr inż. Igor Buzalewicz

*Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki,
Politechnika Wroclawska, 50-370 Wroclaw, Wybrzeże Wyspiańskiego 27*

Dr hab. n. med. Grzegorz Ciešlar, prof. nadzw. PWSZ

*Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Angiologii i Medycyny Fizykalnej w Bytomiu
Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, 41-902 Bytom, ul. Batorego 15*

i

*Państwowa Wyższa Szkoła Zawodowa im. Stanisława Staszica w Pile,
64-920 Pila, ul. Podchorążych 10*

Dr inż. Iwona Hołowacz

*Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki,
Politechnika Wroclawska, 50-370 Wroclaw, Wybrzeże Wyspiańskiego 27*

Mgr inż. Wojciech Jopek

*Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki,
Politechnika Wroclawska, 50-370 Wroclaw, Wybrzeże Wyspiańskiego 27*

Mgr inż. Marek Kaczyński

*Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki,
Politechnika Wroclawska, 50-370 Wroclaw, Wybrzeże Wyspiańskiego 27*

Dr hab. Małgorzata Komorowska prof. nadzw. Politechniki Wroclawskiej

*Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki,
Politechnika Wroclawska, 50-370 Wroclaw, Wybrzeże Wyspiańskiego 27*

Dr hab. n. tech. Marta Kopaczyńska

*Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki,
Politechnika Wroclawska, 50-370 Wroclaw, Wybrzeże Wyspiańskiego 27*

Mgr inż. Katarzyna Kowal

*Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki,
Politechnika Wroclawska, 50-370 Wroclaw, Wybrzeże Wyspiańskiego 27*

Dr inż. Mirosław Kwaśny

*Instytut Optoelektroniki, Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego,
00-908 Warszawa, ul. gen. S. Kaliskiego 2*

Dr n. med. Agnieszka Mielczarek lek. stomatolog

*I Wydział Lekarski z Oddziałem Stomatologicznym, Warszawski Uniwersytet Medyczny,
02-091 Warszawa, ul. Żwirki i Wigury 61*

Mgr Jadwiga Mierczyk

*Instytut Optoelektroniki, Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego,
00-908 Warszawa, ul. gen. S. Kaliskiego 2*

Gen. bryg. prof. dr. hab. inż. Zygmunt Mierczyk

*Instytut Optoelektroniki, Wojskowa Akademia Techniczna im. Jarosława Dąbrowskiego,
00-908 Warszawa, ul. gen. S. Kaliskiego 2*

Mgr inż. Paulina Misiewicz

*Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki,
Politechnika Wroclawska, 50-370 Wroclaw, Wybrzeże Wyspiańskiego 27*

Dr inż. Sylwia Olsztyńska-Janus

*Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki,
Politechnika Wroclawska, 50-370 Wroclaw, Wybrzeże Wyspiańskiego 27*

Prof. n. tech. dr hab. n. fiz. inż. lek. med. Halina Podbielska

*Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki,
Politechnika Wroclawska, 50-370 Wroclaw, Wybrzeże Wyspiańskiego 27*

i

*Wydział Fizjoterapii, Akademia Wychowania Fizycznego we Wrocławiu,
51-612 Wroclaw, al. I.J. Paderewskiego 35*

Dr inż. Magdalena Przybyło

*Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki,
Politechnika Wroclawska, 50-370 Wroclaw, Wybrzeże Wyspiańskiego 27*

Mgr inż. Joanna Pucińska

*Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki,
Politechnika Wroclawska, 50-370 Wroclaw, Wybrzeże Wyspiańskiego 27*

Dr hab. n. fiz. Andrzej Radosz, prof. nadzw. Politechniki Wrocławskiej

*Instytut Fizyki, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wroclawska,
50-370 Wroclaw, Wybrzeże Wyspiańskiego 27*

Prof. dr hab. n. med. dr h.c. Aleksander Sieroń

Katedra i Oddział Kliniczny Chorób Wewnętrznych, Angiologii i Medycyny Fizykalnej w Bytomiu Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Katowicach, 41-902 Bytom, ul. Batorego 15

i

Wyższa Szkoła Ekonomii i Administracji w Bytomiu, 41-907 Bytom, ul. A. Frycza-Modrzewskiego 12

Mgr inż. Katarzyna Szymborska-Malek

Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wroclawska, 50-370 Wrocław, Wybrzeże Wyspiańskiego 27

Dr inż. Agnieszka Ulatowska-Jarża

Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wroclawska, 50-370 Wrocław, Wybrzeże Wyspiańskiego 27

Mgr inż. Katarzyna Wysocka-Król

Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Wydział Podstawowych Problemów Techniki, Politechnika Wroclawska, 50-370 Wrocław, Wybrzeże Wyspiańskiego 27

SŁOWO WSTĘPNE

Optyka Biomedyczna, zwana też Bio-Optyką, Biooptyką lub Biofotoniką jest interdyscyplinarną, a nawet multidyscyplinarną dziedziną wiedzy, której głównym atrybutem jest pozyskiwanie informacji za pomocą światła w celach badawczych, diagnostycznych lub terapeutycznych. Niewątpliwie zaczyna ona odgrywać coraz większą rolę w inżynierii biomedycznej, jak i w praktyce medycznej; i to zarówno w diagnostyce, jak i w terapii. Najlepszym tego przykładem jest rozwijająca się obecnie medycyna laserowa, szczególnie w oftalmologii czy dermatologii, a także medycyna fotodynamiczna.

W terapii oddziaływania światło–tkanka wykorzystywane są np. do usuwania tkanek za pomocą cięcia, topienia, spawania, koagulacji, rozdrobnienia lub odparowywania. Chirurgiczne zabiegi laserowe stosowane są w chirurgii tkanek miękkich, w dermatologii estetycznej, w oftalmologii, w stomatologii i w wielu innych działach medycyny. Oddziaływania terapeutyczne to nie tylko usuwanie tkanek, ale również ich pobudzanie światłem, co np. wykorzystywane jest w fizjoterapii, a także może znaleźć zastosowanie w krwiodawstwie do ochrony krwi.

Światło wykorzystywane jest również w wielu badaniach biologicznych lub biochemicznych, prowadzonych za pomocą mikroskopii, mikroskopii fluorescencyjnej, lub w diagnostyce spektroskopowej tkanek czy biomateriałów. Innymi słowy światło pomaga odkryć np. przyczyny wielu schorzeń. Zrozumienie zjawisk, zachodzących w organizmach żywych może przyczynić się do wdrożenia lepszych procedur klinicznych, bardziej dokładnych i bardziej przyjaznych dla pacjenta.

Niniejsza książka, przygotowana z inicjatywy Grupy Bio-Optyki z Instytutu Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej z Wydziału Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej porusza tylko niektóre problemy związane z szeroko rozumianą optyką biomedyczną. Ta fascynująca dziedzina obejmuje znacznie więcej zagadnień, a jej szybki rozwój wymaga pilnego śledzenia najnowszych doniesień.

Książkę tę polecamy studentom inżynierii biomedycznej, a także medycyny i nauk pokrewnych, lekarzom, fizykom i inżynierom, którzy zajmują się badaniami organizmów żywych, biomateriałów czy projektowaniem urządzeń diagnostycznych

i terapeutycznych. Marzymy o tym, żeby to wydanie zapoczątkowało współpracę wielu ośrodków w Polsce, które zajmują się badaniami w zakresie optyki biomedycznej i być może przyczyniło się do powstania serii takich opracowań.

Halina Podbielska
Wrocław, listopad 2011

SPIS TREŚCI

I. WPROWADZENIE DO OPTYKI BIOMEDYCZNEJ

1. Optyka biomedyczna: nieodzowna gałąź inżynierii biomedycznej (<i>Halina Podbielska</i>)	1
1.1. Wstęp	1
1.2. Optyka biomedyczna na tle inżynierii biomedycznej	2
1.3. Edukacja w optyce biomedycznej	8
2. Natura światła (<i>Andrzej Radosz</i>)	11
2.1. Falowa natura światła	11
2.2. Czym jest światło?	12
2.3. Katastrofa w nadfiolecie	14
2.4. Korpuskularna natura promieniowania – hipoteza Plancka	17
2.5. Interferencja pojedynczego fotonu	19
3. Podstawy fotofizyki (<i>Igor Buzalewicz, Halina Podbielska</i>)	23
3.1. Wstęp	24
3.2. Światło jako fala elektromagnetyczna	24
3.2.1. Podstawowe właściwości fal elektromagnetycznych	24
3.2.2. Polaryzacja światła	32
3.3. Natężenie promieniowania świetlnego i podstawy fotometrii	41
3.4. Transformacja światła na obiektach materialnych	48
3.4.1. Załamanie i odbicie światła	50
3.4.1.1. Odbicie światła	51
3.4.1.2. Załamanie światła	54
3.4.1.3. Ogólny przypadek transformacji światła w cienkiej warstwie ośrodka	57
3.4.1.4. Parametry fizyczne ilościowo charakteryzujące odbicie i załamanie światła	62
3.4.1.4.1. Amplitudowe współczynniki odbicia i transmisji	63
3.4.1.4.2. Energetyczne współczynniki odbicia i transmisji	70
3.5. Absorpcja promieniowania elektromagnetycznego oraz zjawisko luminescencji	77
3.5.1. Absorpcja światła i jej opis ilościowy	77
3.5.2. Luminescencja	82
3.6. Interferencja fal świetlnych	85
3.6.1. Elementy wektorowej superpozycji fal świetlnych	86
3.6.2. Interferencja monochromatycznych i spolaryzowanych fal świetlnych	90
3.6.3. Warunki stabilnej interferencji fal świetlnych	93
3.7. Dyfrakcja światła	98
3.7.1. Dyfrakcja na nieskończenie cienkiej szczelinie	99
3.7.2. Elementy skalarnej teorii dyfrakcji	103

3.7.2.1.	Przekształcenie Fouriera	104
3.7.2.2.	Przybliżenie Fresnela	106
3.7.2.3.	Przybliżenie Fraunhofera	110
3.8.	Rozpraszanie światła	114
3.8.1.	Podstawy teoretyczne rozpraszania światła	114
3.8.2.	Rodzaje rozpraszania światła	116
3.8.2.1.	Podział rozpraszania światła ze względu na kierunek rozpraszania	116
3.8.2.2.	Podział rozpraszania światła ze względu na wielkość centrów rozpraszających	117
3.8.2.3.	Podział rozpraszania światła ze względu na sposób wymiany energii	122
3.8.3.	Jakościowy opis rozpraszania światła oraz właściwości rozpraszających ośrodka	123
3.8.3.1.	Opis rozkładu przestrzennego światła rozproszonego	123
3.8.3.2.	Opis właściwości rozpraszających ośrodka	125
4.	Podstawowe pojęcia fotochemii i fotobiologii (<i>Małgorzata Komorowska, Sylwia Olsztyńska-Janus</i>)	129
4.1.	Wstęp	129
4.2.	Główne prawa fotochemii	131
4.2.1.	Prawo Grotthussa–Drapera	131
4.2.2.	Prawo równoważności fotochemicznej Einsteina–Starka	134
4.2.3.	Dwufazowa odpowiedź układu biologicznego na różne dawki promieniowania. Prawo Arndta–Schulza	135

II. PODSTAWY BIOFOTONIKI

5.	Podstawy działania laserów (<i>Iwona Hołowacz, Halina Podbielska</i>)	139
5.1.	Wstęp	139
5.2.	Zasady działania lasera	140
5.2.1.	Fizyka laserów	140
5.2.2.	Budowa lasera i właściwości promieniowania	142
5.3.	Podział laserów	145
5.4.	Bezpieczeństwo pracy z laserami	147
6.	Przegląd laserów (<i>Zygmunt Mierczyk, Mirosław Kwaśny, Jadwiga Mierczyk</i>)	153
6.1.	Wstęp	153
6.2.	Podstawy fizyczne działania laserów	154
6.2.1.	Zasada działania lasera	154
6.2.2.	Właściwości promieniowania laserowego	158
6.2.3.	Typy laserów	159
6.2.4.	Przegląd laserów	161
6.2.4.1.	Laser helowo-neonowy	161
6.2.4.2.	Laser argonowy	163
6.2.4.3.	Laser kryptonowy	164
6.2.4.4.	Laser helowo-kadmowy	165
6.2.4.5.	Laser na parach złota	166
6.2.4.6.	Lasery barwnikowe	167
6.2.4.7.	Laser azotowy	168
6.2.4.8.	Lasery ekscymerowe	168
6.2.4.9.	Lasery SHG Nd:YAG	169
6.2.4.10.	Lasery półprzewodnikowe i diody elektroluminescencyjne	169

6.2.4.11. Lasery przestrajalne na ciele stałym	170
6.2.4.12. Lasery kaskadowe	171
6.3. Kierunki rozwoju laserów	172
6.3.1. Niebieska optoelektronika	172
6.3.2. Mikrolasery	173
6.3.3. Lasery włóknowe	174
6.3.4. Lasery hybrydowe	175
6.3.5. Lasery światłowodowe	176
7. Oddziaływanie światła z tkanką (<i>Agnieszka Ulatowska-Jarża, Halina Podbielska</i>)	179
7.1. Wstęp	179
7.2. Parametry optyczne tkanek	182
7.3. Propagacja światła w tkankach	187
7.4. Właściwości termiczne tkanek	190
7.5. Oddziaływanie ultrafioletu na tkanki	193
7.5.1. Oddziaływanie ultrafioletu na skórę	194
7.5.2. Działanie UV na struktury oka	196
7.5.3. Światłolecznictwo	196
7.5.4. Szkodliwe działanie promieniowania słonecznego	198
7.6. Oddziaływanie promieniowania laserowego na tkanki	202
7.6.1. Efekty fotobiochemiczne	204
7.6.2. Efekty fototermiczne	205
7.6.3. Fotoablacja	208
7.6.4. Efekty fotjonizacyjne	209

III. WYBRANE ELEMENTY OPTYCZNEJ DIAGNOSTYKI BIOMEDYCZNEJ

8. Badania mikroskopowe w biomedycynie (<i>Marta Kopaczyńska, Joanna Pucińska, Agnieszka Ulatowska-Jarża, Halina Podbielska</i>)	215
8.1. Wstęp	215
8.2. Mikroskopia optyczna	218
8.3. Badania mikroskopowe wykorzystujące zjawisko fluorescencji	224
8.3.1. Mikroskopia fluorescencyjna	224
8.3.2. Mikroskopia konfokalna	228
8.3.3. Mikroskopowe obrazowanie czasu zaniku fluorescencji (FLIM)	230
8.3.4. Mikroskopia rezonansowego transferu energii (FRET)	231
8.4. Mikroskopia elektronowa	234
8.4.1. Elektronowy mikroskop transmisyjny	235
8.4.2. Elektronowy mikroskop skaningowy (SEM)	236
8.5. Mikroskopia sond skanujących	238
8.5.1. Skaningowy mikroskop tunelowy (STM)	238
8.5.2. Mikroskop sił atomowych (AFM)	239
8.6. Zastosowanie technik mikroskopowych w medycynie	241
9. Badania endoskopowe (<i>Halina Podbielska, Igor Buzalewicz</i>)	249
9.1. Wstęp	249
9.2. Budowa endoskopu	250
9.3. Zasady optyczne działania endoskopu	253
9.3.1. Działanie oka – powiększenie wizualne	254
9.3.2. Działanie lupy	255

9.3.3.	Podstawy optyki endoskopu	256
9.3.3.1.	Soczewkowy układ przenoszenia	257
9.3.3.2.	Światłowodowy układ przenoszenia	259
9.3.3.3.	Układ przenoszenia zbudowany ze światłowodów gradientowych	262
9.3.4.	Układy odwracające w endoskopach	264
9.3.4.1.	Soczewki	264
9.3.4.2.	Zwierciadła	266
9.3.4.3.	Pryzmaty	267
9.3.5.	Układy oświetlenia	270
9.3.6.	Czynniki wpływające na jasność obrazu w endoskopie	273
9.4.	Nowoczesne techniki endoskopowe	274
9.4.1.	Endoskopia wirtualna i endoskopia 3D	274
9.4.2.	Endoskopia kapsułkowa	278
9.5.	Podsumowanie	282
10.	Podstawy transiluminacji (<i>Halina Podbielska, Ewa Boerner, Joanna Bauer</i>)	285
10.1.	Wstęp	285
10.2.	Badania transiluminacyjne	286
10.2.1.	Rys historyczny	286
10.2.2.	Transiluminacja w ocenie stawów międzypaliczkowych	287
10.2.3.	Inne zastosowania transiluminacji	290
11.	Optyczne czujniki chemiczne (<i>Agnieszka Ulatowska-Jarża, Marta Kopaczyńska, Halina Podbielska</i>)	295
11.1.	Wstęp	295
11.2.	Podstawowe definicje	298
11.2.1.	Czujnik chemiczny	298
11.2.2.	Biosensor	298
11.2.3.	Aktuator	299
11.3.	Klasyfikacja czujników	300
11.3.1.	Podział czujników według typu przetwornika	300
11.3.2.	Podział czujników według mechanizmu czujnikowego	300
11.3.3.	Inne sposoby klasyfikacji czujników	301
11.4.	Parametry czujników	301
11.5.	Optody czujników światłowodowych	303
11.5.1.	Optoda	304
11.5.2.	Światłowody	307
11.6.	Metody unieruchamiania cząsteczek detekcyjnych	310
11.7.	Wady i zalety detekcji optyczno-chemicznej	313
11.8.	Wybrane zastosowania czujników w medycynie	313
12.	Spektroskopia laserowo indukowanego rozpadu (LIBS). Podstawy i zastosowania (<i>Wojciech Jopek, Marek Kaczyński, Paulina Misiewicz, Magdalena Przybyło</i>)	317
12.1.	LIBS – Laser Induced Breakdown Spectroscopy	317
12.2.	Atomowe podstawy techniki LIBS	318
12.3.	Zasada pomiaru techniką LIBS	320
12.4.	Techniczne aspekty konstrukcji spektrometrów LIBS	324
12.4.1.	Ogólna budowa spektrometrów	324
12.4.2.	Charakterystyka emisyjna plazmy oraz źródeł światła	325
12.4.3.	Spektrometry	327

12.4.4. Detektory	328
12.5. Przykładowe zastosowania	329
12.6. Podsumowanie	331
13. Fotodiagnostyka medyczna w czasie rzeczywistym. Aparatura i aplikacje kliniczne (<i>Miroslaw Kwaśny</i>)	333
13.1. Wstęp	333
13.2. Metoda autofluorescencji i jej zastosowania kliniczne	334
13.2.1. Charakterystyka spektralna fluoroforów tkanek biologicznych	334
13.2.2. Praktyczne wykorzystanie metody autofluorescencji w klinikach	336
13.3. Układy diagnostyczne do wykrywania fotouczulaczy egzogennych	340
13.3.1. Przegląd układów diagnostycznych	340
13.3.2. Konstrukcje własnych układów fluorescencyjnych	342
13.4. Wybrane aplikacje medyczne metody PDD	347
13.4.1. Wykorzystanie metody PDD w dermatologii	348
13.4.2. Zastosowanie PDD w innych specjalnościach medycznych	350
14. Zastosowanie wybranych metod optycznych w praktyce stomatologicznej (<i>Agnieszka Mielczarek, Miroslaw Kwaśny</i>)	357
14.1. Wstęp	357
14.2. Zjawiska optyczne w tkankach zęba	359
14.3. Wybrane optyczne metody diagnostyczne stosowane w stomatologii	359
14.3.1. Radiografia cyfrowa	359
14.3.2. Metoda DIFOTI	362
14.3.3. Polaryzacyjna koherentna tomografia optyczna (PS-OTC)	362
14.3.4. Metody laserowo wzbudzonej fluorescencji	363
14.3.4.1. System QLF	364
14.3.4.2. System DIAGNOdent	370
14.3.5. Metody optyczne aktywujące proces wybielania zębów	371
14.4. Podsumowanie	372
 IV. ZASTOSOWANIA TERAPEUTYCZNE	
15. Wykorzystanie oddziaływania światła w bliskiej podczerwieni na struktury biologiczne (<i>Małgorzata Komorowska, Sylwia Olsztyńska-Janus, Katarzyna Szyborska-Malek</i>)	375
15.1. Promieniowane z zakresu bliskiej podczerwieni	375
15.1.1. Źródła promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni	375
15.1.2. Chromofory	377
15.1.3. Efekty wywołane przez promieniowanie NIR	379
15.2. Fotochemiczne działanie NIR na proste cząsteczki	380
15.2.1. Wpływ promieniowania NIR na wodę	380
15.2.2. Wpływ promieniowania NIR na cząsteczki biologiczne	381
15.2.3. Wpływ promieniowania NIR na tkanki	383
16. Przykładowe zastosowania laserów w medycynie (<i>Joanna Pucińska, Iwona Hołowacz, Halina Podbielska</i>)	387
16.1. Wstęp	387
16.2. Zastosowania laserów wysokoenergetycznych	388
16.2.1. Lasery w chirurgii	388
16.2.2. Lasery w angioplastyce	393

16.2.3. Lasery w ortopedii	394
16.2.4. Lasery w stomatologii	395
16.2.5. Lasery w okulistyce	396
16.2.6. Lasery w dermatologii	398
16.2.6.1. Terapia laserowa w zmianach naczyniowych	399
16.2.6.2. Usuwanie tatuaży i zmian barwnikowych	400
16.2.6.3. Leczenie łuszczycy	400
16.2.6.4. Laserowe usuwanie owłosienia	400
16.2.6.5. Fotoodmładzanie	401
16.3. Zastosowanie laserów średnio- i niskoenergetycznych	403
16.3.1. Lasery w biostymulacji	403
16.3.2. Lasery w medycynie fotodynamicznej	404
16.3.3. Terapia fototermalna	405
17. Terapia fotodynamiczna (<i>Aleksander Sieroń, Grzegorz Cieślar</i>)	411
17.1. Charakterystyka i mechanizmy terapii fotodynamicznej	411
17.2. Metodyka terapii fotodynamicznej	414
17.2.1. Fotouczulacze stosowane w terapii fotodynamicznej	414
17.2.2. Aparatura stosowana w terapii fotodynamicznej	415
17.2.3. Procedura wykonywania zabiegów terapii fotodynamicznej	418
17.3. Zastosowania kliniczne terapii fotodynamicznej	419
17.3.1. Choroby skóry	419
17.3.2. Choroby błony śluzowej jamy ustnej i górnych dróg oddechowych	422
17.3.3. Choroby naczyń	424
17.3.4. Choroby płuc	424
17.3.5. Choroby narządu wzroku	425
17.3.6. Choroby przewodu pokarmowego	425
17.3.7. Choroby dróg moczowych	425
17.3.8. Choroby żeńskiego narządu rodowego	426
17.3.9. Choroby układu kostnego	426
17.4. Ograniczenia i perspektywy terapii fotodynamicznej	427

V. OPTYKA BIOMEDYCZNA NA PRZYKŁADACH

18. Promieniowanie laserowe w medycynie. Przykładowe zadania rachunkowe (<i>Igor Buzalewicz, Katarzyna Wysocka-Król, Katarzyna Kowal</i>)	433
18.1. Wstęp	433
18.2. Przykładowe zadania z rozwiązaniami	435
18.3. Zadania do samodzielnego rozwiązywania	446
18.4. Odpowiedzi	454
19. Optyczna diagnostyka medyczna. Przykładowe ćwiczenia laboratoryjne (<i>Igor Buzalewicz, Katarzyna Kowal, Katarzyna Wysocka-Król, Halina Podbielska</i>)	460
19.1. Wstęp	460
19.2. Analiza stanu polaryzacji światła przechodzącego przez tkankę w układzie polaryskopowym	460
19.2.1. Wyznaczenie gęstości mocy wiązki oświetlającej	461
19.2.2. Wyznaczenie zmiany stopnia polaryzacji światła po przejściu przez badaną tkankę	461

19.2.3.	Wyznaczenie zależności zmiany stopnia polaryzacji liniowej światła po przejściu przez badaną tkankę od kąta padania liniowo spolaryzowanej wiązki wejściowej	463
19.2.4.	Wyznaczenie zależności gęstości mocy światła przechodzącego przez tkankę od kąta położenia osi transmisji analizatora	463
19.2.5.	Wyznaczenie zależności współczynnika transmisji światła przez badaną tkankę od kąta padania liniowo spolaryzowanej wiązki oświetlającej	464
19.3.	Obrazowanie struktur powierzchniowych tkanek w świetle odbitym i przechodzącym w układzie polaryskopowym	464
19.3.1.	Obserwacja preparatów tkankowych w odbiciowym i transmisyjnym mikroskopie optycznym	465
19.3.2.	Obserwacja preparatów tkankowych w układzie polaryskopowym w świetle odbitym	467
19.3.3.	Obserwacja powierzchni skóry w układzie polaryskopowym w świetle odbitym	469
19.4.	Komputerowa analiza zdjęć komórek biologicznych	470
19.4.1.	Wstępna obróbka zdjęć w programie <i>ImageJ</i>	470
19.4.2.	Charakteryzacja obrazów fluorescencyjnych komórek biologicznych za pomocą programu <i>ImageJ</i>	471
19.4.3.	Określenie rozmiarów komórki oraz jej jądra na podstawie analizy jej profilu w jednym z kanałów R, G lub B zdjęcia fluorescencyjnego	472
19.4.4.	Analiza rozkładu rozmiarów struktur komórkowych na podstawie analizy obrazu w jednym z kanałów R, G, lub B z wykorzystaniem funkcji <i>Analyze Particles</i>	473
19.5.	Zastosowanie lampy Wooda w diagnostyce fluorescencyjnej	474
19.5.1.	Wprowadzenie	474
19.5.2.	Przebieg ćwiczenia	479
19.6.	Spektroskopia skóry	480
19.6.1.	Wprowadzenie	480
19.6.2.	Budowa skóry	480
19.6.3.	Spektroskopia odbiciowa	482
19.6.4.	Przebieg ćwiczenia	483

ROZDZIAŁ 1
OPTYKA BIOMEDYCZNA.
NIEODZOWNA GAŁĄŻ INŻYNIERII BIOMEDYCZNEJ

Halina Podbielska

Spis treści

1.1. Wstęp	1
1.2. Optyka biomedyczna na tle inżynierii biomedycznej	2
1.3. Edukacja w optyce biomedycznej	8

1.1. Wstęp

W 1895 roku Wilhelm Roentgen odkrył, że istnieje promieniowanie elektromagnetyczne zdolne przenikać przez obiekty, przez które światło widzialne nie jest transmitowane. Każdemu znane jest słynne już zdjęcie dłoni żony odkrywcy, na którym widać układ kostny, jak i ozdoby na palcach. Dziś dysponujemy zaawansowanymi metodami obrazowania wykorzystującego odkryte przez Roentgena promieniowanie; mamy do dyspozycji radiografię cyfrową i tomografię komputerową. Stosujemy w diagnostyce metody wykorzystujące zjawisko rezonansu magnetycznego, czyli obrazowanie NMR, czy metody badania funkcjonalnego, jak scyntyografię czy PET. Duży postęp dokonał się w metodach wykorzystujących fale ultradźwiękowe.

Optyka biomedyczna, oferując minimalnie inwazyjne badania i minimalnie inwazyjne techniki terapeutyczne, będzie odgrywała coraz większą rolę w medycynie. Jedno z najbardziej spektakularnych zastosowań wiedzy optycznej w medycynie, związane jest z rozwojem mikroskopii. Od prostego przyrządu, który miał pomóc zobaczyć obiekty zbyt małe, aby można było je badać nieuzbrojonym okiem, mikroskop stał się narzędziem, bez którego nie sposób wyobrazić sobie współczesnej diagnostyki. Nieżyjący już profesor Maksymilian Pluta, światowej sławy specjalista mikroskopii, pisząc o mikroskopach, powiedział: „...*mikroskop jest instrumentem, w którym tkwią i skutecznie funk-*

cjonują bodajże najbardziej fascynujące i oko cieszące zjawiska optyki fizycznej...” [1]. To zdanie niewątpliwie oddaje naturę tego wyjątkowego przyrządu.

Innym takim urządzeniem, do którego pasuje podobne stwierdzenie, jest endoskop. Historia endoskopii jest niezwykle ciekawa i można by rzec – dramatyczna. Współczesny endoskop nie przypomina (i to na szczęście) swoich historycznych przodków. Jednakże, nawet takie urządzenie, jak współczesny endoskop, wymaga wprowadzenia sondy np. do narządów rurowych przez naturalne otwory ciała, co na pewno nie jest zbyt przyjemne. Aby zaoszczędzić pacjentom tej wątpliwej przyjemności, inżynieria biomedyczna przyczyniła się do powstania tzw. endoskopii kapsułkowej. Endoskop został tak zminiaturyzowany, że znajduje się w łatwej do połknięcia kapsułce, która przechodząc przez układ pokarmowy, przesyła drogą radiową obrazy do zewnętrznego detektora. Pacjent oddaje detektor lekarzowi, a ten analizuje zarejestrowane obrazy.

Trudno jest wymienić wszystkie stosowane dzisiaj lub będące w fazie badań techniki optyczne, które mają, albo będą miały duże znaczenie dla medycyny. Skonstruowanie laserów przyczyniło się do powstania nowych gałęzi w medycynie. W ostatnich latach rozwija się chirurgia laserowa i medycyna fotodynamiczna. Badania nad nowymi związkami zaowocowały rozwojem metod wykorzystujących oddziaływanie światła na tkanki. Techniki fluorescencyjne pozwalają na obrazowanie pojedynczych komórek, nawet związków chemicznych. Koherentna tomografia optyczna pozwala na ocenę tkanek *in situ*, bez konieczności biopsji. Prowadzone są badania w zakresie fluorescencyjnej tomografii molekularnej, która jest metodą obrazowania rozkładu związków kontrastujących o bardzo niskich stężeniach.

Nasza książka dotyka zaledwie niewielkiej części tej niezwykle dynamicznie rozwijającej się dziedziny, jaką jest optyka biomedyczna.

1.2. Optyka biomedyczna na tle inżynierii biomedycznej

Istnieje bardzo wiele definicji inżynierii biomedycznej; jednakże każda zwraca uwagę na multidyscyplinary charakter tej dziedziny wiedzy. W inżynierii biomedycznej mamy bowiem elementy nauk podstawowych, takich jak matematyka, fizyka, chemia, biologia oraz elementy zaawansowanych technologii, a także wiedzę medyczną na temat budowy i funkcji organizmu człowieka, a także chorób i patologii. Jest to dziedzina na pograniczu nauk przyrodniczych i technicznych. Badania w zakresie inżynierii biomedycznej są priorytetem wielu programów międzynarodowych (np. w Ramowych Programach Komisji Europejskiej czy w programach Narodowych Instytutów Zdrowia NIH w USA). W tych i wielu innych programach preferowane są badania interdyscyplinarne i badania wieloosławkowe, prowadzone we współpracy z wieloma grupami badawczymi.

Wiele prognoz dotyczących rozwoju nauki i techniki podkreśla, że inżynieria biomedyczna jest jedną z najbardziej priorytetowych dziedzin, a zapotrzebowanie na specjali-

stów będzie stale rosnać. Wiąże się to oczywiście z jednej strony ze starzeniem się rozwiniętych społeczeństw, z drugiej zaś strony ze wzrostem zapotrzebowania na zaawansowane technologicznie urządzenia medyczne, wspomaganie diagnostyki, terapii, wspomaganie lub zastępowanie funkcji narządów człowieka i rozwój metod rehabilitacji.

Na świecie istnieją prężne organizacje, zajmujące się promocją badań naukowych i karier specjalistów inżynierii biomedycznej. Jedną z nich jest *Biomedical Engineering Society (BMES)* [2]. Misją tego amerykańskiego Towarzystwa jest wspieranie profesjonalistów pracujących nad rozwojem nowych technologii do celów poprawy jakości usług medycznych i ochrony zdrowia. W krajach, gdzie istnieje system opieki zdrowotnej wykorzystujący zaawansowane techniczne metody i urządzenia, istnieje też zapotrzebowanie na inżynierów medycznych. Informacje na temat tej profesji i jej roli w służbie zdrowia amerykańscy inżynierowie mogą uzyskać ze strony internetowej *Biomedical Engineer Jobs Overview* [3].

W Polsce działa Polskie Towarzystwo Inżynierii Biomedycznej PTIB [4], współpracujące z wieloma towarzystwami naukowymi w kraju i zagranicą (patrz tab. 1). Pod patronatem PTIB wydawane jest czasopismo *Inżynieria Biomedyczna* [5].

Tabela 1. Niektóre towarzystwa związane z inżynierią biomedyczną*

Nazwa	Strona internetowa
International Federation for Medical and Biological Engineering (IFMBE)	http://www.ifmbe.org/
European Alliance for Medical and Biological Engineering and Science (EAMBES)	http://www.eambes.org/
European Society for Engineering and Medicine (ESEM)	http://www.esem.org/
International Union for Physics and Engineering Sciences in Medicine (IUPESM)	http://www.iupesm.org/
American Society for Artificial Internal Organs (ASAIO)	http://www.asaio.com/
Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI)	http://www.aami.org/
International Biomedical Optics Society (IBOS)	http://spie.org/x10.xml
International Society of Biomechanics (ISB)	http://isbweb.org/
Polskie Towarzystwo Techniki Sensorowej (PTTS)	http://www.ptts.pl/
Polskie Towarzystwo Fizyki Medycznej (PTFM)	http://ptfm.ire.pw.edu.pl/mambo/
Polskie Towarzystwo Sieci Neuronowych (PTSN)	http://ptsn.pcz.czyst.pl/

* Adresy stron aktualne w lipcu 2011 r.

Optyka Biomedyczna, zwana też Bio-Optyką, Biooptyką lub Biofotoniką wpisuje się w szeroko rozumianą inżynierię biomedyczną. Głównym celem prowadzonych w tym zakresie prac naukowych i opracowywanych aplikacji jest zastosowanie światła w badaniach obiektów biologicznych, w diagnostyce i terapii. Istnieją dwa główne obszary optyki biomedycznej. Wykorzystuje się albo oddziaływanie światła (fotonów) na obiekty biologiczne (komórki, struktury subkomórkowe, tkanki, narządy, organi-

zmy), bądź też odwrotnie: oddziaływanie obiektów biologicznych na padające promieniowanie elektromagnetyczne.

Ten pierwszy obszar to domena oddziaływań terapeutycznych, czyli wykorzystanie światła do cięcia, topienia, spawania tkanek, do koagulacji, rozdrobnienia, karbonizacji czy waporyzacji. Chirurgiczne zabiegi laserowe stosowane są w chirurgii tkanek miękkich, w dermatologii estetycznej, w stomatologii i w innych działach medycyny.

Drugi, wspomniany powyżej obszar, to wykorzystanie oddziaływania obiektów biologicznych na padające promieniowanie elektromagnetyczne w diagnostyce obrazowej (np. w mikroskopii, mikroskopii fluorescencyjnej, transiluminacji) lub diagnostyce spektroskopowej tkanek czy biomateriałów.

Badania z zakresu szeroko rozumianej optyki biomedycznej prowadzone są w wielu ośrodkach na świecie. Na pewno niemożliwe jest tutaj wymienienie wszystkich. Trudno też o jakieś uporządkowanie czy gradację. Wspomniane w tym rozdziale ośrodki zwróciły po prostu w jakiś sposób uwagę autora, lub też są to ośrodki, których badacze współpracują bądź kiedyś współpracowali z Grupą Bio-Optyki z Instytutu Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej Politechniki Wrocławskiej (patrz tab. 2).

Tabela 2. Niektóre zagraniczne centra optyki biomedycznej*

Ośrodek	Zakres badań	Strona internetowa
1	2	3
Centrum Optyki Biomedycznej, Wydział Inżynierii Biomedycznej, Oregon Health and Science University	Obrazowanie optyczne, czujniki optyczne, interferometria, medycyna fotodynamiczna, mikrochirurgia laserowa	http://www.bme.ogi.edu/biomedicaloptics/index.html
The Boston University BioMedical Optics Lab	Biopsja optyczna, optyczne pomiary stężenia farmaceutyków w organizmie (optyczna farmakokinetyka), czujniki optyczne, nieinwazyjne metody optyczne do monitorowania funkcji mózgu i aktywności neuronów, optyczne monitorowanie zagrożeń z powodu czynników zakaźnych	http://www.bu.edu/bmo/
Beckman Laser Institute, Uniwersytet Kalifornijski, Irvine	Rozwój nowych technologii optycznych do zastosowań klinicznych: obrazowanie medyczne, tomografia optyczna, biofotonika komórki, badania mikronaczyniowe	http://www.bli.uci.edu
Department of Bio-medical Engineering, University of Texas	Femtosekundowa mikrochirurgia laserowa, obrazowanie dwufotonowe	http://www.bme.utexas.edu

1	2	3
Fitzpatrick Institute for Photonics, Duke University	Koherentne obrazowanie optyczne, dyfuzyjna tomografia optyczna, techniki fluorescencyjne i ramanowskie, badania molekularne	http://www.fitzpatrick.duke.edu/
The Wellman Center for Photomedicine, Massachusetts General Hospital	Technologie laserowe, obrazowanie medyczne, środki medyczne aktywowane światłem, minimalnie inwazyjne procedury	http://www2.massgeneral.org/wellman/
The George R. Harrison Spectroscopy Laboratory, MIT	Identyfikacja fluoroforów (elastyna, kolagen NADH) w diagnostyce <i>in vivo</i> , wczesna diagnostyka raka piersi i szyjki macicy spektroskopią Ramana, przezskórny pomiar glukozy spektroskopią Ramana, badania fluorescencyjne, trójwymiarowa mikroskopia tomograficzna, mikroskopia ilościowa w badaniach krwi w malarii	http://web.mit.edu/spectroscopy/overview/index.html
Biomedical Optics Laboratory – Vanderbilt University Department of Biomedical Engineering	Obrazowanie optyczne na poziomie biomolekularnym, diagnostyka optyczna, optyczne metody prowadzenia operacji, symulacje optyczne	http://www.bme.vanderbilt.edu/bmoptics/index.htm
Centrum Medycyny i Technologii Lasero- wch w Berlinie, Laser- und Medizin-Technologie GmbH, Berlin	Minimalnie inwazyjne terapie laserowe, terapia interstycjalna, optyczne czujniki jakości konserwowanej krwi, badanie właściwości optycznych tkanek, optyczna diagnostyka medyczna	http://www.lmtb.de/home/lmtb_en.php
Photonics4life – sieć europejskich centrów badawczych, zajmujących się biofotonią	Wspieranie rozwoju i zastosowań minimalnie inwazyjnych technologii optycznych w medycynie	http://www.photonics4life.eu/
Center for Medical Physics and Biomedical Engineering, Medical University of Vienna	Optyczna diagnostyka naczyń, koherentna tomografia optyczna, wysokorozdzielcza mikroskopia, obrazowanie optyczne neuronów	http://www.zmpbmt.meduniwien.ac.at
Center for Ultrafast Science and Biomedical Optics, Politechnika w Mediolanie	Techniki laserowe, obrazowanie czasoworozdzielcze, badanie właściwości optycznych tkanek	http://www.fisi.polimi.it/dipfisica/page56.do
Center for Biomedical Optics and New Laser Systems – BIOP	Optyczne systemy obrazowe, nowe systemy laserowe dla diagnostyki i terapii, optyczna pęseta, bioczujniki optyczne, obróbka obrazów biomedycznych	http://www.biop.dk/About_biop/About_biop.htm
The Applied Physics Group, Tel Aviv University	Światłowody na podczerwień, radiometria światłowodowa, spawanie tkanek	http://www.tau.ac.il/~applphys/

* Adresy stron aktualne w lipcu 2011 r.

W Polsce istnieje też wiele grup badawczych, zajmujących się optyką biomedyczną, badaniami podstawowymi, jak i zaawansowanymi klinicznie aplikacjami. Podobnie, jak w przypadków centrów zagranicznych, trudno wymienić wszystkie grupy. Poniższy przegląd (patrz tab. 3) też jest więc subiektywny.

Tabela 3. Niektóre krajowe ośrodki, zajmujące się optyką biomedyczną*

Ośrodek	Zakres badań	Strona internetowa
1	2	3
Zakład Obrazowania i Pomiarów Biofizycznych, Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcz, Polska Akademia Nauk, Warszawa	Analiza fluorescencji barwników naturalnych i egzogennych, obrazowanie molekularne tkanek <i>in vivo</i> oraz <i>in vitro</i> , spektroskopia w bliskiej podczerwieni, pomiar czasu przelotu fotonów, dyfuzyjna tomografia optyczna, laserowo-dopplerowski pomiar ukrwienia	http://www.ibib.waw.pl
Zakład Biofizyki i Fizyki Medycznej, Instytutu Fizyki, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Toruń	Możliwości diagnostyczne koherentnej tomografii optycznej	http://www.fizyka.umk.pl/fizyka/?q=node/368
Zakład Biologii Medycznej, Uniwersytet Mikołaja Kopernika, Wydział Biologii i Nauk o Ziemi, Toruń	Fluorescencyjne metody wykrywania nowotworów człowieka, optymalizacja fluorescencyjnej metody wykrywania <i>in situ</i> czerniaka skóry, biologiczne aspekty działania promieniowania ultrafioletowego, ze szczególnym uwzględnieniem zastosowań w fotodiagnostyce i fototerapii	http://www.biol.umk.pl/biologia/biol_med.html
Zespół Optyki Widzenia, Instytut Fizyki, Politechnika Wrocławska	Odzyskiwanie informacji ilościowej z obrazów koherentnej tomografii optycznej (OCT), interferencyjne pomiary stabilności warstwy łez na rogówce, nowe koncepcje hybrydowych (refrakcyjno-dyfrakcyjnych) i gradientowych soczewek wewnątrzgałkowych (IOLs), modelowanie biomechanicznych właściwości gałki ocznej i ich wpływu na refrakcję oka, dynamika podłużnych ruchów oka i ich związek z układem krwionośnym i oddechowym	http://www.vog.if.pwr.wroc.pl/VOG.htm
Centrum Diagnostyki i Terapii Laserowej, Politechniki Łódzkiej	Diagnostyka fotodynamiczna, laseroterapia, laseropunktura i biostymulacja laserowa, układy sterowania laserami	http://www.cdtl.pl/
Ośrodek Diagnostyki i Terapii Fotodynamicznej, Szpital Specjalistyczny nr 2 w Bytomiu	Diagnostyka fluorescencyjna, obiektywizacja oceny autofluorescencji poprzez cyfrowe określenie stosunku barwy czerwonej do zielonej, spektroskopia fluorescencyjna tkanek, terapia fotodynamiczna	http://szpitalspec2.bytom.ids.pl/index.php?option=com_content&task=view&id=215&Itemid=8

1	2	3
Zakład Fizyki Medycznej, Instytut Fizyki, Uniwersytet Śląski	Zagadnienia spektroskopii absorpcyjnej i fluorescencyjnej <i>in vivo</i> i <i>in vitro</i> , obrazowanie wnętrza gałki ocznej metodą spektralnej koherentnej tomografii optycznej wysokiej rozdzielczości SOCT HR oraz badanie pola widzenia	http://fizmed.us.edu.pl
Instytut Optoelektroniki (IOE) Wojskowej Akademii Technicznej	Metody fluorescencyjne, fotodiagnostyka, fotodetekcja, lasery medyczne	http://www.ioe.wat.edu.pl
Zakład Spektroskopii Stanów Wzbudzonych, Instytut Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu	Nanomateriały, nanoproszki antybakteryjne, badania luminescencyjne, badania fotodynamiczne	http://ses.int.pan.wroc.pl/
Instytut Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej, Politechnika Wrocławska	W Grupie Bio-Optyki: badania światłouczulaczy stosowanych w medycynie fotodynamicznej, metody transiluminacyjne, metody dyfrakcyjne do identyfikacji patogenów, nanomateriały, powłoki funkcjonalne, pomiary biomateriałów w nanoskali, badanie możliwości wzmocnienia oddziaływania fotodynamicznego w obecności aktywnych nanocząstek metali szlachetnych, zagadnienia dozymetrii w diagnostyce i terapii fotodynamicznej. W Zespole Biospektroskopii: badania właściwości fizykochemicznych morfotycznych składników krwi, badania ochronnego wpływu NIR na krew. W Laboratorium Biofizyki Agregatów Makrocząsteczkowych: badania fluorescencyjne, badania metodą LIBS. W Zespole Bioinformatyki i Biofizyki Nanoporów: wspomaganie PDT za pomocą elektroterapii.	www.ibp.pwr.wroc.pl

* Adresy stron aktualne w lipcu 2011 r.

W dobie Internetu bardzo wiele informacji dostępnych jest na wyciągnięcie ręki. Czasopisma naukowe w większości wypadków również są dostępne *on-line*. Bardzo wiele jednak osób szuka zebranych w jednym miejscu informacji. Stąd też się bierze zainteresowanie książkami i podręcznikami. Tak też jest w przypadku optyki biomedycznej. Istnieje kilka opracowań, które są zbiorem zebranych i dobrze opracowanych danych na temat podstaw i aplikacji wybranych metod optyki biomedycznej. Wybrane pozycje zaprezentowano poniżej:

- Jürgen Popp, Valery V. Tuchin, Arthur Chiou, Stefan H. Heinemann (Eds.), *Handbook of Biophotonics: Vol. 1: Basics and Techniques*, 2011 [6],
- Pavesi, Lorenzo; Fauchet, Philippe M. (Eds.), *Biophotonics*, 2008 [7],
- Lihong V. Wang, Hsin-i Wu, *Biomedical Optics: Principles and Imaging*, 2007 [8],
- Jürgen Popp, Marion Strehle (Eds.), *Biophotonics*, 2006 [9],
- Paras N. Prasad, *Introduction to Biophotonics*, 2003 [10],
- Tuan Vo-Dinh (Ed.), *Biomedical photonics handbook*, 2002 [11].

1.3. Edukacja w optyce biomedycznej

Optyka biomedyczna to część inżynierii biomedycznej, dotycząca optycznej diagnostyki medycznej, terapii oraz minimalnie inwazyjnego obrazowania. W wielu ośrodkach na świecie zwraca się uwagę na kształcenie w tym zakresie. Na przykład na Uniwersytecie Vanderbilt w Stanach Zjednoczonych oferowane są kursy spektroskopii klinicznej, medycyny laserowej i obrazowania optycznego. Kursy w tym zakresie oferowane są również na Uniwersytecie w Teksasie (patrz tabela 2). W Danii w Centrum Optyki Biomedycznej – Center for Biomedical Optics and New Laser Systems – BIOP, prowadzone są między innymi kursy magisterskie w zakresie optyki biomedycznej. Na ten aspekt inżynierii biomedycznej zwracają szczególną uwagę towarzystwa naukowe m.in. *Optical Society of America* OSA [12] i *SPIE* [13], które w swojej działalności również wspierają szeroko pojętą edukację.

Wiele gremiów zastanawia się, co powinno być więc w programie kształcenia Optyki Biomedycznej, aby wskazać studentom drogę do dalszego zdobywania wiedzy. Chociaż programy edukacji w tym zakresie są modyfikowane, na bieżąco dostosowywane do potrzeb danego środowiska, mają zawsze wiele punktów wspólnych. W programie optyki biomedycznej należy więc uwzględnić następujące elementy:

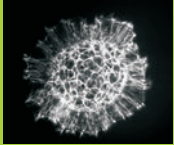
- Podstawowe zjawiska optyczne: optyka geometryczna, optyczne elementy obrazujące, dyfrakcja, interferencja.
- Systemy laserowe, działanie, budowa, rodzaje laserów.
- Właściwości optyczne tkanek: transmisja, absorpcja, rozpraszanie, fluorescencja. Zależności od długości fali.
- Oddziaływanie światła na tkanki: fotochemiczne, fototermiczne, fotoablacja, ablacja indukowana laserowo.
- Propagacja światła w tkankach: teoria transportu, dyfuzja, metody Monte Carlo.
- Analiza obrazów.
- Zaawansowane techniki spektroskopowe: spektroskopia Ramana, fluorescencyjna.
- Obrazowanie multispektralne.

- Tomografia optyczna, układy, zastosowania.
- Aspekty kształcenia w tym zakresie powinny być uwzględniane przy układaniu planów i programów studiów na kierunku inżynieria biomedyczna.

Zdajemy sobie sprawę, że nasza książka porusza tylko niektóre zagadnienia. Niemniej jednak na rynku polskim nie ma wiele pozycji w tym zakresie. Mamy nadzieję, że podjęta przez nas próba zebrania w jednym miejscu niektórych informacji na temat tej fascynującej dziedziny, spotka się z pozytywnym przyjęciem.

Literatura

- [1] PLUTA M., *Mikroskopia Optyczna*, PWN, Warszawa 1982.
- [2] <http://www.bmes.org/aws/BMES/pt/sp/about>
- [3] <http://www.biomedicalengineerjobs.org/>
- [4] <http://ptib.ibib.waw.pl/>
- [5] <http://www.inzynieria-biomedyczna.com/>
- [6] POPP J., TUCHIN V., CHIOU A., HEINEMANN S. (Eds.), *Handbook of Biophotonics*. Vol. 1. *Basics and Techniques*, Wiley, 2011.
- [7] PAVESI L., FAUCHET Ph.M. (Eds.), *Biophotonics*, Springer, 2008.
- [8] WANG L., WU H., *Biomedical Optics: Principles and Imaging*, Wiley, 2007.
- [9] POPP J., STREHLE M., *Biophotonics*, Wiley, 2006.
- [10] PRASAD P., *Introduction to Biophotonics*, Wiley, 2003.
- [11] VO-DINH TUAN, *Biomedical photonics handbook*, CRC Press, 2002.
- [12] www.osa.org
- [13] <http://spie.org/>



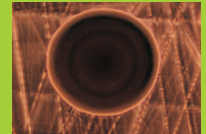
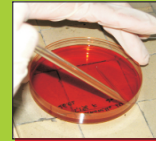
Laboratorium Elektroniki Biomedycznej i Pomiarów

Pomieszczenie: 0016, bud. D1

Kierownik Laboratorium:

dr hab. inż. Zbigniew Moroń prof. nadzw.

Tel. 71 320 44 63



Laboratorium Biospektroskopii

Pomieszczenie 04a, bud. D1

Kierownik Laboratorium:

dr hab. Małgorzata Komorowska prof. nadzw.

Tel. 71 320 31 68, 43 45



LABORATORIA NAUKOWO-BADAWCZE Przykładowa oferta badawcza

Badania obiektów biomedycznych sygnałami elektrycznym.

Projektowanie systemów do elektromagnetycznej nawigacji medycznej.

Wytwarzanie aktywnych nanomateriałów i materiałów żółelowych.

Pomiary biomateriałów w nanoskali.

Badanie topografii powierzchni próbek metodą AFM i KPM.

Badanie właściwości fizykochemicznych błon lipidowych poddanych elektroporacji.

Określanie optymalnych parametrów pola elektrycznego do elektrochemioterapii.

Badania czujników i przetworników do pomiarów ciśnienia medycznych; ciśnienia wewnątrzgałkowego IOP oraz wewnątrzczaszkowego ICP.

Badania reaktywności zrenicy oka i badania ruchów gałek ocznych.

Wyznaczanie składu atomowego próbek stałych i ciekłych. Oznaczenie ciepła rozpuszczenia.

Określanie termodynamicznej stabilności próbek.

Wyznaczanie współczynnika przenikania przez modelowe błony biologiczne.

Oznaczenie ładunku powierzchniowego nanostruktur i makromolekuł.

Określanie rozkładu rozmiarów nanostruktur, emulsji i zawiesin.

Wyznaczanie pK substancji w roztworze i zawiesinach.

Opracowywanie liposomów do zastosowań medycznych i kosmetycznych.

Pomiary mikroskopowe (DIA i EPI) i pomiary transiluminacyjne.

Optyczne rozpoznawanie obiektów.

Badanie możliwości wzmocnienia oddziaływania fotodynamicznego w obecności aktywnych nanocząstek metali szlachetnych.

Zagadnienia dozymetrii w diagnostyce i terapii fotodynamicznej, optymalizacja parametrów zabiegowych w PDD i PDT.

Badania właściwości fizykochemicznych morfotycznych składników krwi.

Laboratorium Biopomiarów w Nanoskali

Pomieszczenie: 0016, bud. D1

Kierownik Laboratorium: dr hab. Marta Kopaczyńska

Tel. 71 320 44 61



Laboratorium Nanomateriałów

Pomieszczenie 011, bud. D1

Kierownik Laboratorium: dr inż. Agnieszka Ulatowska-Jarża

Tel. 71 320 44 61



Laboratorium Biofizyki Agregatów Makrocząsteczkowych

Pomieszczenie: 02, budynek D1

Kierownik Laboratorium: prof. dr hab. inż. Marek Langner

Tel. 71 320 23 84



Laboratorium Bio-Optyki

Pomieszczenie: 04, bud. D1

Kierownik Laboratorium:

prof. n. tech. dr hab. n. fiz. inż. lek. med. Halina Podbielska

Tel. 71 320 65 80, 28 25



Pracownia Pomiarów Biomedycznych

Pomieszczenie 09, bud. D1

Kierownik Laboratorium: dr inż. Andrzej Hachol

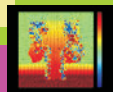


Laboratorium Elektroporacji

Pomieszczenie 011a, bud. D1

Kierownik Laboratorium: dr hab. inż. Małgorzata Kotulska

Tel. 71 320 39 74



ROZDZIAŁ 2

NATURA ŚWIATŁA

Andrzej Radosz

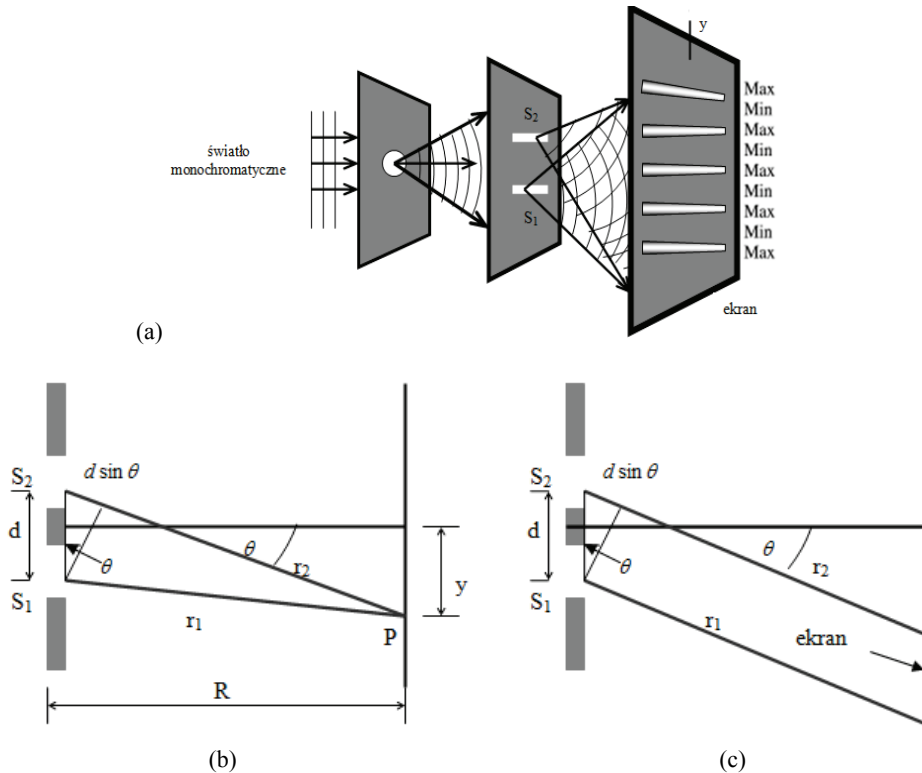
Spis treści

2.1. Falowa natura światła	11
2.2. Czym jest światło?	12
2.3. Katastrofa w nadfiolecie	14
2.4. Korpuskularna natura promieniowania – hipoteza Plancka	17
2.5. Interferencja pojedynczego fotonu	19

2.1. Falowa natura światła

Wiemy od dawna, że światło ma naturę falową. Charakterystyczne cechy zachowań falowych to interferencja i dyfrakcja oraz polaryzacja (przykład: Redakcji: zjawiska te zostaną szczegółowo omówione w rozdziale 3: *Podstawy fotofizyki*). Na początku XIX wieku Thomas Young przeprowadził doświadczenia ukazujące interferencję światła. Wyobraźmy sobie, że do ekranu dociera światło pochodzące z dwóch różnych źródeł (szczelin S_1 i S_2). Wtedy na ekranie powstaje układ na przemian jasnych i ciemnych prążków (patrz rys. 2.1).

Powstanie tego obrazu, zwanego obrazem interferencyjnym, stanowi zasadniczy argument na rzecz natury światła. Warto jednak zwrócić uwagę na dwa istotne elementy tego prostego doświadczenia. Po pierwsze, jeśli jedna ze szczelin zostanie przesłonięta, na ekranie powstanie jasny prążek stanowiący obraz (rozmyty) odsłoniętej szczeliny. Po drugie, chociaż światło docierające do ekranu pochodzi z dwu odsłoniętych szczelin, to jednak obu szczelin nie należy traktować jako niezależne źródła. Przeciwnie, obie szczeliny zostają oświetlone przy pomocy jednego (tego samego) źródła światła.

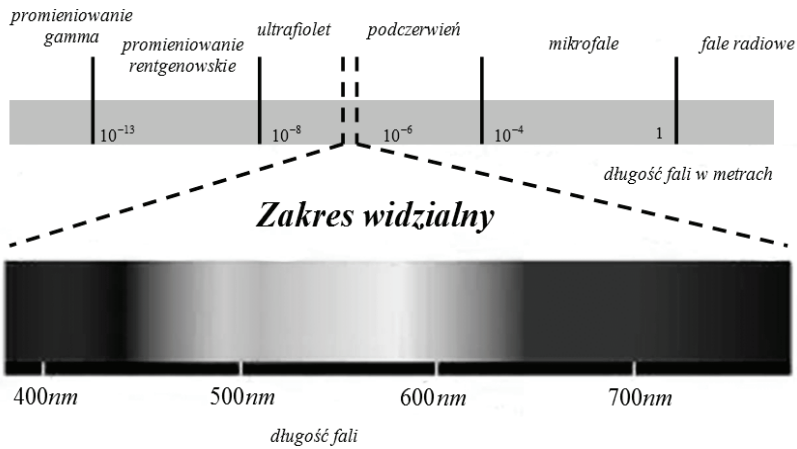


Rys. 2.1. Schematyczne przedstawienie zjawiska interferencji światła (a). Płaska monochromatyczna fala elektromagnetyczna dociera do układu dwu szczelin; na oddalonym ekranie w odległości R powstaje rozkład prążków interferencyjnych, na przemian jasnych i ciemnych miejsc. Różnica dróg optycznych jest dla niewielkich wartości kąta θ (b) równa $d \cdot \sin \theta$ (c)

2.2. Czym jest światło?

W drugiej połowie dziewiętnastego stulecia, głównie dzięki pracom Maxwella (James Clerk Maxwell – szkocki fizyk i matematyk) i Hertza (Heinrich Rudolf Hertz – niemiecki fizyk), zrozumieliśmy, że światło to niewielki wycinek promieniowania elektromagnetycznego. Fale elektromagnetyczne to drgania pola elektrycznego i magnetycznego rozchodzące się w próżni z prędkością, $c = \left(\sqrt{\epsilon_0 \mu_0}\right)^{-1} = 2.997 \cdot 10^8 \frac{\text{m}}{\text{s}}$.

Zakres długości fal promieniowania elektromagnetycznego od 380 nm do 780 nm, przypada na promieniowanie, które nazywamy światłem widzialnym. Barwa światła zmienia się od czerwieni w zakresie długofalowym do fioletu w zakresie krótkofalowym (patrz rys. 2.2).



Rys. 2.2. Światło widzialne stanowi niewielki wycinek widma promieniowania elektromagnetycznego

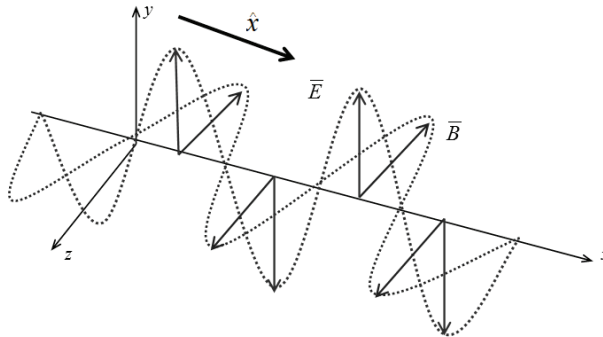
Fale elektromagnetyczne o długościach krótszych niż dolna granica światła widzialnego nazywamy nadfioletem, a fale odpowiadające długościom większym niż górna, czerwona granica światła widzialnego, nazywamy podczerwienią. Drgania pola elektromagnetycznego spełniają relację:

$$\omega = ck, \quad (1)$$

gdzie $\omega = \frac{2\pi}{T}$ oznacza częstotliwość promieniowania, a $k = \frac{2\pi}{\lambda}$ jest to długość tzw. wektora falowego. Zatem światło widzialne odpowiada sytuacji, w której pole elektromagnetyczne wykonuje drgania z częstotliwością $\nu = \frac{1}{T} \propto 10^{15}$ Hz. W najprostszym przypadku, dotyczącym płaskiej fali elektromagnetycznej biegnącej w kierunku \hat{x} , rozkład (chwilowy) wzajemnie prostopadłych pola elektrycznego i magnetycznego, został przedstawiony schematycznie na rys. 2.3.

Interesujące, że wyobrażenie promieniowania elektromagnetycznego, układu wzajemnie prostopadłych wektorów natężenia pola elektrycznego oraz indukcji magnetycznej, rozchodzących się w próżni z prędkością c , tak jak to rozumiano pod koniec dziewiętnastego stulecia, dało początek dwóm, zupełnie odmiennym, fundamentalnym podejściom do otaczającej nas rzeczywistości. Jedno z nich związane było ze spostrzeżeniem, że nie można „dogonić światła” tzn. nie można poruszać się wraz z falą elektromagnetyczną tak, aby chwilowy rozkład pola (przedstawiony na rys. 2.3), mógł stać się rozkładem statycznym. Wychodząc z tego spostrzeżenia, Albert Einstein zbudował najpierw szczególną (1905), a następnie ogólną teorię względności (1916). Teoria względności przyniosła całkowicie nowe spojrzenie na właściwości czasu oraz

przestrzeni. Przede wszystkim jednak pozwalała zrozumieć istotę mechanizmów rządzących Wszechświatem w największej możliwej skali.



Rys. 2.3. Płaska fala elektromagnetyczna, spolaryzowana liniowo biegnie w kierunku x .
Wektory \vec{E} , \vec{B} oraz \hat{x} są wzajemnie prostopadłe

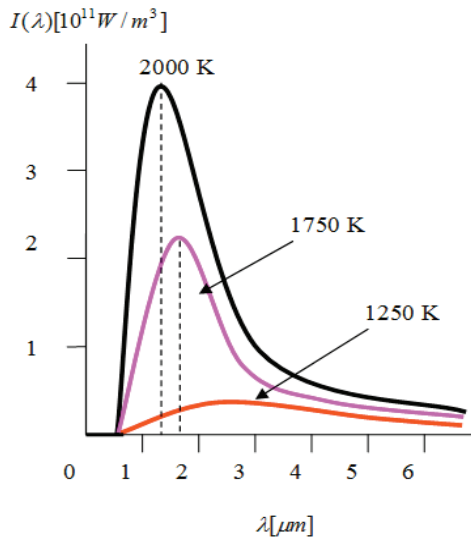
Druga przemiana została zapoczątkowana przez Plancka w 1900 roku. Rozwój idei Plancka stanowił wprowadzenie do mechaniki kwantowej, która jest prawdziwym wyzwaniem dla umysłu ludzkiego (choć dotyczy jedynie niewielkiego fragmentu rzeczywistości).

2.3. Katastrofa w nadfiolecie

W grudniu 1900 roku Max Planck przedstawił referat, w którym zasugerował, że w pewnych warunkach promieniowanie elektromagnetyczne może przejawiać naturę korpuskularną. Hipoteza Plancka była wyrazem rozterki, z jaką mamy do czynienia w obliczu emisji promieniowania wysyłanego przez różne ciała znajdujące się w stanie równowagi termodynamicznej. Planck, próbując opisać teoretycznie takie promieniowanie, natknął się na dramatyczną sprzeczność, nazwaną „katastrofą w nadfiolecie”, pomiędzy doświadczeniem a interpretacją teoretyczną. Problem rozważany przez Plancka można opisać następująco. Rozpatrując promieniowanie emitowane przez rozmaite ciała będące w stanie równowagi termodynamicznej, wygodnie jest wprowadzić pewne wyobrażenie idealnego ciała całkowicie pochłaniającego promieniowanie, tzw. *ciała doskonale czarnego*. Ciało doskonale czarne nie odbija promieniowania, ale je pochłania całkowicie; wysyła natomiast (emituje) promieniowanie, gdyż znajduje się w stanie równowagi termodynamicznej. Przedmiotem badań jest rozkład widmowy, czyli widmo promieniowania ciała doskonale czarnego. Wyniki doświadczeń sugerują, że widmo takie powinno mieć uniwersalny charakter zależny jedynie od temperatury ciała, niezależny zaś od rodzaju materiału, kształtu ciała itp. Dla niewiel-

kich częstości strumień energii wysyłanej przez ciało czarne jest proporcjonalny do kwadratu częstości, następnie osiąga maksimum, którego położenie przesuwa się w stronę wysokich częstości, a następnie wykładniczo maleje. Tyle mówi doświadczenie.

Próba opisu teoretycznego jest natomiast następująca. Można przyjąć, że rolę ciała doskonale czarnego spełnia wnęka z niewielkim otworem. Wówczas promieniowanie wypełniające wnękę, pozostające w równowadze ze ściankami wnęki, stanowi właśnie promieniowanie ciała doskonale czarnego. Należy określić rozkład możliwych modów – stanów pola elektromagnetycznego i przypisać im odpowiednią energię, aby się przekonać, że promieniowanie wydobywające się przez niewielki otwór, ma taką samą charakterystykę, jak rozkład widmowy obserwowany w doświadczeniu (patrz rys. 2.4).



Rys. 2.4. Rozkład widmowy promieniowania ciała doskonale czarnego w funkcji długości fali: dla niewielkich i dla dużych długości fali, natężenie promieniowania maleje; natomiast maksimum przesuwa się w stronę krótszych fal (w kierunku rosnącej częstości) wraz ze wzrostem temperatury ciała

Promieniowanie wypełniające wnękę ma tę właściwość, że gęstość modów $\rho(\nu)$ jest kwadratową funkcją częstości:

$$\rho(\nu) = V \frac{8\pi}{c^3} \nu^2, \quad (2)$$

gdzie V oznacza objętość wnęki, a $\nu = \frac{\omega}{2\pi} = \frac{c}{\lambda}$ częstość promieniowania.

Jeśli temperatura ścianek wnęki („temperatura promieniowania”) wynosi T , to zgodnie z założeniem mechaniki statystycznej, każdy stopień swobody takiego układu posiada energię ε , wyrażoną wzorem:

$$\varepsilon = \frac{1}{2} k_B T. \quad (3)$$

Wówczas energia promieniowania wypełniającego wnękę („promieniowanie ciała doskonale czarnego”) w zakresie częstości ν , $\nu + d\nu$ wynosi:

$$u(\nu)d\nu = \frac{1}{2} k_B T \rho(\nu) d\nu. \quad (4)$$

Całkowita energia promieniowania E :

$$E = \int_0^{\infty} u(\nu) d\nu = \frac{1}{2} k_B T \frac{8\pi}{c^3} V \int_0^{\infty} \nu^2 d\nu \rightarrow \infty \quad (5)$$

staje się nieskończona!

Energia emitowana przez wnękę z niewielkim otworem w postaci fal elektromagnetycznych odpowiada rozkładowi spektralnemu spełniającemu prawa Stefana–Boltzmana i Wiena: strumień energii jest proporcjonalny do czwartej potęgi temperatury, a położenie maksimum rozkładu spektralnego jest proporcjonalne do temperatury. Interpretacja teoretyczna wskazuje na nieusuwalną rozbieżność: funkcja gęstości spektralnej jest kwadratową funkcją częstości, a ponieważ średnia energia przypadająca na pojedynczy stopień swobody jest proporcjonalna do temperatury, strumień energii jest nieskończony.

Promieniowanie ciała doskonale czarnego stało się na początku dwudziestego stulecia źródłem trzeciego poważnego, nierozwiązywalnego paradoksu. Druga sprzeczność, paradoks Olbersa (Heinrich Wilhelm Matthäus Olbers – niemiecki astronom, lekarz i fizyk), zwany paradoksem nocnego nieba, ma swój początek w 1736 roku, a sformułowanie podane przez Olbersa pochodzi z 1822 roku. Paradoks nocnego nieba dotyczy rozmiarów wszechświata: skończony, powinien zapaść się grawitacyjnie, w nieskończonym wszechświecie nocą niebo powinno być jasne. Ostateczne rozwiązanie tego paradoksu przyniosło odkrycie Hubble’ego (1920’) (Edwin Powell Hubble – astronom amerykański): Wszechświat podlega ekspansji. Raczej nieskończony niż skończony, z całą pewnością bardzo duży a jego ekspansja potrwa co najmniej drugie 15 miliardów lat. (Omówienie paradoksu nocnego nieba oraz jego rozwiązanie w ramach współczesnej kosmologii można znaleźć w książce M. Roosa [1]; wprowadzenie do teorii względności można znaleźć w wielu podręcznikach, np. [2, 3]. Najbardziej odpowiednie pozycje literaturowe, zapoznające Czytelnika z teorią względności, są autorstwa A. Einsteina, np. [4]; patrz również [5]). Trzecia sprzeczność dotyczyła oczywiście prędkości fal elektromagnetycznych w próżni oraz w konsekwencji hipotezy eteru, jako nośnika fal elektromagnetycznych.

2.4. Korpuskularna natura promieniowania – hipoteza Plancka

Planck zaproponował rozwiązanie usuwające katastrofę w nadfiolecie z teoretycznego opisu promieniowania ciała doskonale czarnego. Przyjął, że energia pola elektromagnetycznego ma dyskretną naturę. Fali elektromagnetycznej o ustalonej długości λ odpowiadają cząstki o niepodzielnej energii:

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}. \quad (6)$$

Takiemu stopniowi swobody układu termodynamicznego, jakim jest promieniowanie pozostające w równowadze termodynamicznej ze ściankami wnęki o temperaturze T , odpowiadają stany energetyczne:

$$E_n = nh\nu, \quad (7)$$

gdzie $n = 1, 2, 3$.

Zgodnie z podstawowym postulatem fizyki statystycznej, prawdopodobieństwo p_n , że układ znajdzie się w tym stanie energetycznym jest proporcjonalne do:

$$p_n \propto \exp(-\beta nh\nu), \quad (8)$$

$$\beta = \frac{1}{k_B T},$$

gdzie współczynnik proporcjonalności określa warunek normalizacyjny:

$$1 = \sum_{n=0}^{\infty} p_n = A \sum_{n=0}^{\infty} \exp(-\beta nh\nu) = A \frac{1}{1 - \exp(-\beta h\nu)}. \quad (9)$$

Zatem

$$p_n = \left(\frac{\exp(\beta h\nu)}{\exp(\beta h\nu) - 1} \right)^{-1} \exp(-\beta nh\nu). \quad (10)$$

Na podstawie tego wyznaczamy średnią energię przypadającą na dany stopień swobody:

$$\varepsilon(\nu) = \sum_{n=0}^{\infty} E_n p_n = \frac{h\nu}{\exp(\beta h\nu) - 1}. \quad (11)$$

Wstawiając tak otrzymaną wielkość we wzorze na rozkład energii promieniowania ciała doskonale czarnego, zamiast wynikającej z zasady ekwipartycji energii wielkości $\varepsilon = \frac{1}{2} k_B T$, otrzymujemy:

$$u(\nu)d(\nu) = \frac{8\pi}{c^3} \varepsilon(\nu) \nu^2 d(\nu) = \frac{8\pi}{c^3} \frac{h\nu}{\exp(\beta h\nu) - 1} \nu^2 d(\nu). \quad (12)$$

Powyższe wyrażenie odpowiada funkcji gęstości energii promieniowania ciała doskonale czarnego mierzonej doświadczalnie. W obszarze niewielkich częstości funkcja ta wzrasta kwadratowo, w obszarze wysokich częstości wykładniczo maleje i osiąga maksimum dla:

$$\nu_0 \cong 0.6 \cdot 10^{10} T. \quad (13)$$

Propozycja Plancka usuwa oczywiście „katastrofę w nadfiolecie”. Kosztem tej operacji jest jednak hipoteza, że światło ma naturę korpuskularną (kwantową). Kwanty światła, dziś nazywane fotonami, posiadają energię, ale nie posiadają masy i poruszają się z prędkością c . Jeśli tak, to można uzasadnić, że przenoszą również pęd:

$$p = \frac{h\nu}{c} = \frac{h}{\lambda}. \quad (14)$$

Czy światło, promieniowanie elektromagnetyczne, wykazujące naturę falową, czego przejawem jest interferencja (ale także dyfrakcja czy polaryzacja), rzeczywiście posiada również właściwości korpuskularne/kwantowe?

Argument w postaci interpretacji promieniowania ciała doskonale czarnego znalazł wsparcie dzięki innym weryfikacjom. Przedstawiono je w dwóch pierwszych dekadach dwudziestego wieku. Jako pierwszy, hipotezę fotonów, cząstek światła poważnie potraktował i wykorzystał Albert Einstein. W 1905 roku przedstawił własną ideę *zjawiska fotoelektrycznego*, w której centralne miejsce zajęły fotony. Jeśli oświetlamy światłem monochromatycznym kawałek metalu, to pojedyncze porcje energii promieniowania elektromagnetycznego mogą być większe lub mniejsze od tzw. pracy wyjścia materiału, na który padają fotony. W pierwszym przypadku, na powierzchni metalu pojawiają się uwolnione elektrony, a w drugim nie. Taki argument okazał się kluczowy w opisie efektu fotoelektrycznego (Albert Einstein za tę interpretację otrzymał Nagrodę Nobla). Inne zjawisko, potwierdzające korpuskularną naturę światła, to *efekt Comptona* związany z rozpraszaniem światła na swobodnych elektronach. Ugięta fala świetlna wykazuje charakterystyczny związek pomiędzy długością fali oraz kątem ugięcia. Objaśnienie staje się natychmiastowe, jeśli przyjąć, że światło to wiązka fotonów, których energia i pęd oraz długość fali promieniowania pozostają w związkach, pisanych równaniami (6) i (14).

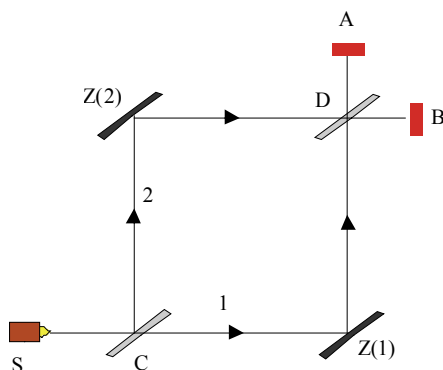
Jednak stwierdzenie, że światło albo ogólniej promieniowanie elektromagnetyczne ma dwoistą naturę, jednocześnie falową i korpuskularną jest daleko głębsze i bardziej fundamentalne niż można byłoby oczekiwać. Otóż, jeśli promieniowanie elektromagnetyczne ma dwoistą naturę, to być może również materia posiada dwoistą naturę? Takie pytanie postawił sobie de Broglie na początku lat dwudziestych ubiegłego wieku. Korzystając ze związku pomiędzy długością fali i pędem fotonu, zasugerował taki sam związek w przypadku obiektów materialnych, posiadających masę. Jasne, że właściwości falowe obiektów materialnych spełniających tę relację można stwierdzić jedynie w szczególnych okolicznościach, kiedy „fale materii” wykazują interferencję i dyfrakcję w zakresie weryfikowalnym doświadczalnie. Po raz pierwszy interferencję elektronów stwierdzono w 1925, kiedy to Davisson (Clinton Joseph Davisson – fizyk amerykański) i Germer (Lester Halbert Germer – fizyk amerykański), pokazali charakterystyczne sekwencje osłabień i wzmocnień interferencyjnych elektronów ugiętych na warstwach grafitu. Za doświadczalne potwierdzenie dyfrakcji elektronów na kryształach otrzymali Nagrodę Nobla.

Ostateczna konkluzja jest taka, że promieniowanie elektromagnetyczne posiada dwoistą naturę, ale i materia zdaje się również wykazywać dwoistą naturę. W latach dwudziestych ubiegłego wieku pojmowanie rzeczywistości weszło w nową, nieoczekiwaną fazę.

2.5. Interferencja pojedynczego fotonu

Dzisiejsze wyobrażenie na temat natury promieniowania elektromagnetycznego jedynie w niewielkim stopniu odbiega od tego obrazu, który wyłonił się osiemdziesiąt lat temu. Promieniowanie elektromagnetyczne wykazuje oczywiście właściwości falowe. Interferencja, dyfrakcja oraz polaryzacja, to charakterystyczne dla falowej natury promieniowania efekty, niewymagające wyrafinowanych technik obserwacyjnych, z czego skorzystał Young. Właściwości falowe są jednakże odmienne od właściwości korpuskularnych, przede wszystkim ze względu na sposób przekazu, przenoszenia energii. Jak zatem wyjaśnić dualizm korpuskularno-falowy promieniowania? Nie podamy wyjaśnienia, bo ciągle jeszcze nie istnieje satysfakcjonujące wyjaśnienie tej właściwości Przyrody (zwróćmy uwagę na dualizm korpuskularno-falowy materii; na szczęście nie jest on przedmiotem naszych rozważań). Możemy natomiast przybliżyć interferencję promieniowania elektromagnetycznego, traktowanego jako zbiór cząstek – przedstawimy ilustrację „interferencji cząstek”, która nie stanowi objaśnienia problemu dualizmu, ale podkreśla jego istotę.

Wyobraźmy sobie układ badawczy składający się z 2 zwierciadeł $Z(i)$, 2 zwierciadeł półprzepuszczalnych (idealnych), C , D , dwóch detektorów, A , B oraz źródła światła S .



Rys. 2.5. Uproszczony schemat ilustrujący interferencję fotonu: wszystkie fotony, biegnące pomiędzy źródłem S a detektorami, są rejestrowane przez jeden z detektorów: B. Foton interferuje sam ze sobą!

Przyjmijmy, że źródło S (patrz rys. 2.5) wysyła pojedyncze fotony w taki sposób, że odległości pomiędzy nimi są znacznie większe od rozmiarów aparatury badawczej. Zatem w układzie badawczym w każdej chwili przebywa nie więcej niż jeden foton. Można postawić pytanie: do którego z detektorów A lub B chętniej (z większym prawdopodobieństwem) wpadają kolejne fotony?

Odpowiedź nie wydaje się trudna. Foton opuszczający źródło S, dociera do półprzezroczystego zwierciadła C:

- przechodzi przez nie (z prawdopodobieństwem $1/2$) i podąża drogą (1) w kierunku Z(1) a następnie D, lub
- odbity w C (z takim samym prawdopodobieństwem $1/2$) kieruje się drogą (2) do Z(2) oraz D.

Rozważmy teraz ruch fotonu na drodze (1). Foton odbity w Z(1) trafia do D, gdzie

- z prawdopodobieństwem $1/2$ przechodzi i trafia do A
- z takim samym prawdopodobieństwem $1/2$, zostaje odbity i trafia do detektora B.

Ruch fotonu na drodze (2) prowadzi do podobnego wniosku, jak w przypadku drogi (1). Foton odbity w Z(2)

- przechodzi przez D i trafia do B (z prawdopodobieństwem $1/2$) lub
- zostaje odbity w D i trafia do A (z takim samym prawdopodobieństwem $1/2$).

Jakąkolwiek drogę, (1) lub (2), „wybiera” foton, z równym prawdopodobieństwem $1/2$ trafia do każdego z detektorów A i B. Zatem każdy foton z takim samym prawdopodobieństwem, równym $1/2$, trafia do detektora A lub detektora B. Jakie znaczenie ma ten rezultat w odniesieniu do pojedynczego fotonu? Nie ma żadnego: foton może zostać zarejestrowany w A lub w B. Jeśli jednak zajmiemy się przypadkiem 100 fotonów, wtedy blisko połowa z nich zostanie zarejestrowana w A, a reszta (blisko 50), w B. Oczywiście, ze względu na probabilistyczny charakter doświadczenia, może się zdarzyć znaczące odchylenie od równego rozdziału, ale jesteśmy w stanie oszacować

prawdopodobieństwo każdego odchylenia od przewidywanej statystycznej średniej. Tak więc prawdopodobieństwo, że 10 kolejnych fotonów zarejestruje określony detektor, powiedzmy A, jest nieco mniejsze niż $1/1000$. Zaś 1000 kolejnych fotonów wpada do detektora A z prawdopodobieństwem mniejszym od 10^{-300} .

Jak można było oczekiwać, statystycznie połowa fotonów trafia do każdego z detektorów. A raczej – powinna trafiać. Gdyby bowiem przeprowadzić idealne doświadczenie w idealnie przygotowanym układzie (patrz rys. 2.5), to okazałoby się, że wszystkie fotony wpadają do jednego z detektorów. Każdy foton z prawdopodobieństwem równym 1 dociera do detektora B.

Jak to możliwe? Spójrzmy jeszcze raz na pojedynczy foton. Foton docierający do C dokonuje losowego wyboru, wybiera drogę (1) lub drogę (2). Jeśli jednak wybrał którąkolwiek z tych dróg to trafił do A lub do B z takim samym prawdopodobieństwem. Ale każdy foton trafia do B!

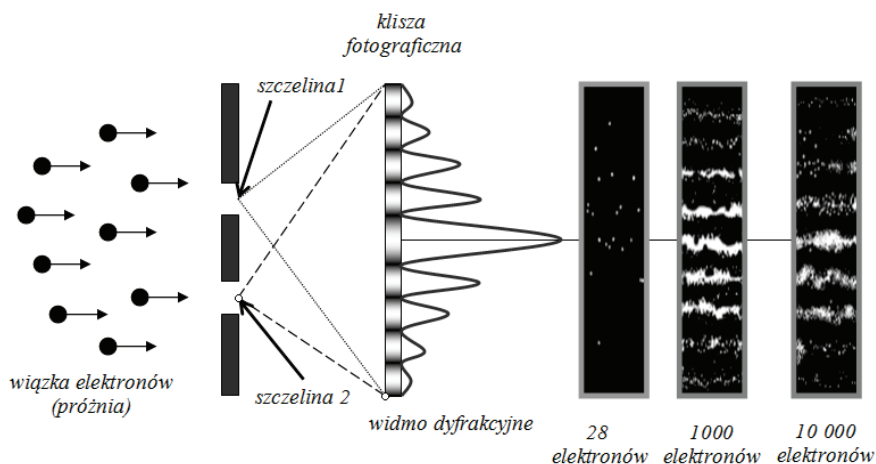
Jedynym możliwym rozwiązaniem tego paradoksu jest następujące. Foton nie biegnie po drodze (1) lub po drodze (2). Foton biegnie zarówno po drodze (1), jak i po drodze (2). Foton choć jest niepodzielną cząstką, w zdumiewający, niepojęty sposób, biegnie jednocześnie po obu drogach.

Do takiego wniosku zdaje się prowadzić analiza stosunkowo prostego doświadczenia. Na ile ta hipoteza jednoczesnej penetracji rozmaitych alternatywnych dróg przez pojedynczy foton, pozwala zrozumieć, dlaczego foton wpada do detektora B? Należy przyjąć, że różne drogi (1), (2) fotonu stanowią amplitudy prawdopodobieństwa, a samo prawdopodobieństwo stanowi kwadrat wartości bezwzględnej sumy takich amplitud prawdopodobieństwa. Dalej trzeba przyjąć, że w momencie odbicia w zwierciadle, amplituda prawdopodobieństwa ulega zmianie o czynnik urojony i , tak, że $i^2 = -1$. Jeśli drogi (1) oraz (2) prowadzące do detektorów A oraz B są identyczne, z wyjątkiem liczby odbić na zwierciadłach półprzepuszczalnych, to można istotnie zauważyć, że suma alternatyw prowadzących do detektora A znika! Oznacza, że wszystkie fotony powinny (muszą!) trafić do detektora B.

A gdyby tych dróg byłoby więcej? Foton biegłby jednocześnie po wszystkich możliwych drogach. A jak zachowywałyby się cząstki materialne: elektrony, protony, neutrony...? Podobnie, rozpoznawałyby wszystkie możliwe drogi lub inaczej alternatywy itd. Dalszy ciąg tych rozważań stanowi przedmiot mechaniki kwantowej, a właściwie teorii kwantowej.

Na koniec, powróćmy jeszcze do interferencji oglądanej przez pryzmat dualizmu korpuskularno-falowego. Jeśli przyjąć, że na układ dwóch szczelin padają pojedyncze, identyczne cząstki: fotony, elektrony, neutrony, to na ekranie powinien pojawić się obraz ilustrujący rozkład prawdopodobieństwa. Zatem fotony (elektrony, neutrony, ...) zapełniają ekran zgodnie z otrzymanym rozkładem prawdopodobieństw. Oznacza to, że w początkowej fazie zjawiska, gdy do ekranu dotarło stosunkowo niewiele cząstek, ich rozkład powinien pozostawać nieregularny, a dopiero wielka liczba cząstek zapełnia ekran zgodnie z kształtem funkcji rozkładu prawdopodobieństw.

stwa. Jak te uwagi mają się do rzeczywistego obrazu *interferujących* cząstek? Ilustrację stanowi rys. 2.6, przedstawiający wypełnianie ekranu elektronami „sączącymi” się przez układ dwóch szczelin. Podobnie wyglądałaby interferencja układów innych identycznych cząstek.



Rys. 2.6. Interferencja cząstek (rysunek na podstawie [6])

Tematy związane ze zjawiskami dualizmu korpuskularno-falowego doczekały się wielu opracowań naukowych i dydaktycznych. Zainteresowanym można polecić np. [7].

Literatura

- [1] ROOS M., *Introduction to Cosmology*, John Wiley & Sons, 1994.
- [2] SHUTZ B., *Wprowadzenie do ogólnej teorii względności*, PWN, 2002.
- [3] HARTLE J.B., *GRAVITY: an introduction to Einstein's general relativity*, Addison Wesley, 2003.
- [4] EINSTEIN A., *O szczególnej i ogólnej teorii względności* (pol. tłum. M.T. Huber), 1921.
- [5] RADOSZ A., RADOSIŃSKI Ł., *Introduction to relativity and cosmology* (w druku).
- [6] SILVERMAN M.P., *More than one mystery*, Springer-Verlag, New York 1995.
- [7] SHANKAR R., *Wstęp do mechaniki kwantowej*, PWN, 2006.

ROZDZIAŁ 3

PODSTAWY FOTOFIZYKI

Igor Buzalewicz, Halina Podbielska

Spis treści

3.1. Wstęp	24
3.2. Światło jako fala elektromagnetyczna	24
3.2.1. Podstawowe właściwości fal elektromagnetycznych	24
3.2.2. Polaryzacja światła	32
3.3. Natężenie promieniowania świetlnego i podstawy fotometrii	41
3.4. Transformacja światła na obiektach materialnych	48
3.4.1. Załamanie i odbicie światła	50
3.4.1.1. Odbicie światła	51
3.4.1.2. Załamanie światła	54
3.4.1.3. Ogólny przypadek transformacji światła w cienkiej warstwie ośrodka	57
3.4.1.4. Parametry fizyczne ilościowo charakteryzujące odbicie i załamanie światła	62
3.4.1.4.1. Amplitudowe współczynniki odbicia i transmisji	63
3.4.1.4.2. Energetyczne współczynniki odbicia i transmisji	70
3.5. Absorpcja promieniowania elektromagnetycznego oraz zjawisko luminescencji	77
3.5.1. Absorpcja światła i jej opis ilościowy	77
3.5.2. Luminescencja	82
3.6. Interferencja fal świetlnych	85
3.6.1. Elementy wektorowej superpozycji fal świetlnych	86
3.6.2. Interferencja monochromatycznych i spolaryzowanych fal świetlnych	90
3.6.3. Warunki stabilnej interferencji fal świetlnych	93
3.7. Dyfrakcja światła	98
3.7.1. Dyfrakcja na nieskończenie cienkiej szczelinie	99
3.7.2. Elementy skalarnej teorii dyfrakcji	103
3.7.2.1. Przekształcenie Fouriera	104
3.7.2.2. Przybliżenie Fresnela	106
3.7.2.3. Przybliżenie Fraunhofera	110
3.8. Rozpraszanie światła	114
3.8.1. Podstawy teoretyczne rozpraszania światła	114
3.8.2. Rodzaje rozpraszania światła	116
3.8.2.1. Podział rozpraszania światła ze względu na kierunek rozpraszania	116

3.8.2.2.	Podział rozpraszania światła ze względu na wielkość centrów rozpraszających	117
3.8.2.3.	Podział rozpraszania światła ze względu na sposób wymiany energii	122
3.8.3.	Jakościowy opis rozpraszania światła oraz właściwości rozpraszających ośrodka	123
3.8.3.1.	Opis rozkładu przestrzennego światła rozproszonego	123
3.8.3.2.	Opis właściwości rozpraszających ośrodka	125

3.1. Wstęp

Rozchodzące się w przestrzeni światło w wyniku interakcji z różnego rodzaju obiektami ulega amplitudowo-fazowej modulacji. Analiza transformacji fal świetlnych może dostarczyć informacji o tych obiektach. Z tego też powodu pomiary optyczne odgrywają coraz większą rolę w różnych dziedzinach współczesnej techniki, a także w naukach przyrodniczych. Jednocześnie oddziaływanie światła z materią prowadzi do zmiany właściwości badanych obiektów poprzez wywołanie np. efektów termicznych lub też fotochemicznych, co również może znaleźć zastosowanie praktyczne. W ostatnich latach obserwuje się duży rozwój optyki biomedycznej, która ogólnie rzecz biorąc, związana jest z zastosowaniem światła w biologii i medycynie, w tym w terapii i diagnostyce medycznej.

Niniejszy rozdział opisuje najważniejsze cechy falowe oraz właściwości światła. Przedstawione zostaną podstawowe wielkości charakteryzujące energię niesioną przez światło, jak również obiektywne oraz subiektywne miary tej wielkości częściowo obejmujące obszar fotometrii. Dalsza część zostanie poświęcona opisowi podstawowych zjawisk transformacji światła na obiektach i powierzchniach granicznych. Wyjaśnione zostaną takie zjawiska, jak odbicie, załamanie, absorpcja, luminescencja, interferencja, dyfrakcja oraz rozpraszanie światła. Należy zaznaczyć, iż niniejszy rozdział jest swojego rodzaju kompromisem – wprowadzeniem, opisującym jedynie pewne podstawowe zagadnienia optyczne, których przedstawienie jest niezbędne w kontekście prezentowanej w niniejszej pracy tematyki dotyczącej szeroko rozumianej optyki biomedycznej.

3.2. Światło jako fala elektromagnetyczna

3.2.1. Podstawowe właściwości fal elektromagnetycznych

W celu opisu interesujących nas efektów optycznych, przyjęcie elektromagnetycznej teorii światła ma tę zaletę, iż pozwala na jednoczesne scharakteryzowanie zarówno zjawisk rozpraszania czy też dyfrakcji, jak również polaryzacji fal świetlnych. W teo-

rii elektromagnetyzmu istotne są cztery podstawowe wielkości fizyczne, które charakteryzują promieniowanie: wektor natężenia pola elektrycznego \vec{E} , wektor indukcji elektrycznej \vec{D} , wektor natężenia pola magnetycznego \vec{H} oraz wektor indukcji magnetycznej \vec{B} , jak również odpowiadające im wielkości skalarne: natężenie pola elektrycznego E [V/m], indukcja elektryczna D [C/m²], natężenie pola magnetycznego H [A/m] oraz indukcja magnetyczna B [Wb/m²]. Podstawowe relacje pomiędzy tymi wielkościami fizycznymi opisują równania Maxwella [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8]:

$$\text{rot}\vec{E} = -\frac{\partial\vec{B}}{\partial t}, \quad (1)$$

$$\text{rot}\vec{H} = \vec{j} + \frac{\partial\vec{D}}{\partial t}, \quad (2)$$

$$\text{div}\vec{D} = \rho, \quad (3)$$

$$\text{div}\vec{B} = 0 \quad (4)$$

oraz tzw. równania materiałowe:

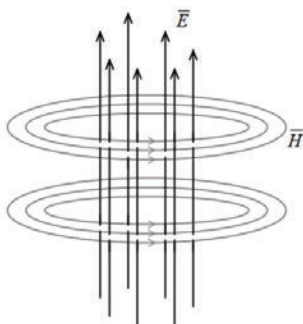
$$\vec{D} = \varepsilon\varepsilon_0\vec{E}, \quad (5)$$

$$\vec{B} = \mu\mu_0\vec{H}, \quad (6)$$

$$\vec{j} = \sigma\vec{E}. \quad (7)$$

Poszczególne symbole mają następujące znaczenie fizyczne: \vec{j} – wektor gęstości prądu, ε – względna przenikalność elektryczna ośrodka, ε_0 – przenikalność elektryczna próżni, μ – względna przenikalność magnetyczna ośrodka, μ_0 – przenikalność magnetyczna próżni, ρ – gęstość ładunku elektrycznego, σ – przewodnictwo właściwe.

Równania Maxwella przedstawiają podstawowe prawa fizyczne, opisujące wzajemne oddziaływanie pola elektrycznego i magnetycznego. Z równań (1) i (2) widzimy, iż zmienne czasowo pole magnetyczne generuje zmienne czasowo pole elektryczne, a z kolei zmienne czasowo pole elektryczne generuje zmienne czasowo pole magnetyczne. Dodatkowo, każde z tych pól istnieje w przestrzeni jedynie w kierunkach prostopadłych do kierunku zmian drugiego pola (patrz rys. 3.1). Właśnie to wzajemne sprzężenie pomiędzy polem elektrycznym a polem magnetycznym jest odpowiedzialne za powstawanie fal elektromagnetycznych zdolnych do rozchodzenia się w przestrzeni. Aby dokładnie zrozumieć to zjawisko, wyobraźmy sobie, że w danej przestrzeni rozmieszczone są nieruchome ładunki elektryczne o określonym położeniu. Na podstawie równania (3) widzimy, iż każdy ładunek elektryczny generuje pole elektryczne we wszystkich kierunkach. Jeżeli ładunek ten jest nieruchomy, wówczas mamy do czynienia ze stałym polem elektrycznym, które jest przedmiotem analizy w elektrostatyce.



Rys. 3.1. Zmienne czasowo pole elektryczne \bar{E} . Pole magnetyczne \bar{H} tworzy się w postaci zamkniętych pętli linii sił pola wszędzie, gdzie dochodzi do zmiany strumienia pole elektrycznego

Jeżeli natomiast w jakiś sposób jeden z tych ładunków zostanie wprawiony w ruch, wówczas pole elektryczne w otoczeniu tego ładunku będzie się zmieniać, a zmiana ta będzie rozchodzić się w przestrzeni z pewną skończoną prędkością. Jak wiadomo, zmienne czasowo pole elektryczne generuje zmienne czasowo pole magnetyczne, ale w sytuacji, gdy prędkość ładunku będzie stała, wówczas szybkość zmian pola elektrycznego będzie niezmienna i powstanie stałe pole magnetyczne, które nie zapewni wzajemnego sprzężenia pola magnetycznego oraz pola elektrycznego, umożliwiająciego rozchodzenie się fali elektromagnetycznej. Jeżeli natomiast prędkość rozważanego ładunku będzie rosła, czyli $\partial\bar{E}/\partial t$ nie będzie wartością stałą, wówczas wygenerowane pole magnetyczne będzie zmienne w czasie, a tym samym doprowadzi do powstania zmiennego czasowo pola elektrycznego. Widzimy zatem, iż proces wzajemnego sprzężenia zmiennych czasowo pól magnetycznych oraz elektrycznych odpowiada za rozchodzenie się w przestrzeni fal elektromagnetycznych. Z kolei, gdy rozmieszczone w przestrzeni ładunki elektryczne są nieruchome lub też poruszają się ze stałą prędkością, wówczas pola elektryczne i magnetyczne są niezależne od siebie, a tym samym fala elektromagnetyczna nie będzie się rozprzestrzeniać. Takie właśnie zjawiska analizuje elektrostatyka.

Jeżeli założymy, iż względna przenikalność elektryczna i magnetyczna ośrodka nie zależą od czasu ani od zmiennych przestrzennych, czyli innymi słowami, ośrodek scharakteryzowany przez te wielkości fizyczne nie zmienia się w czasie oraz jest jednorodny i izotropowy przestrzennie, a dodatkowo gęstość ładunku elektrycznego jest równa zero, wówczas z równań Maxwella wyprowadzić możemy dwie następujące zależności wektorowe, opisujące pole elektromagnetyczne:

$$\nabla^2 \bar{E} = \varepsilon_0 \mu_0 \varepsilon \mu \frac{\partial^2 \bar{E}}{\partial t^2}, \quad (8)$$

$$\nabla^2 \bar{H} = \varepsilon_0 \mu_0 \varepsilon \mu \frac{\partial^2 \bar{H}}{\partial t^2}, \quad (9)$$

gdzie symbol ∇^2 jest operatorem Laplace'a ($\nabla^2 \bar{E} = \hat{i}\nabla^2 E_x + \hat{j}\nabla^2 E_y + \hat{k}\nabla^2 E_z$), a $\hat{i}, \hat{j}, \hat{k}$ wersorami (jednostkowymi wektorami) odpowiednio w kierunkach osi x, y i z . Powyższe zależności przedstawiają równania falowe, opisujące falę elektromagnetyczną, czyli zarówno jej składową elektryczną, jak i magnetyczną. Analiza obu równań, zarówno tego odnoszącego się do wektora natężenia pola elektrycznego, jak i wektora natężenia pola magnetycznego, jest analogiczna.

Zajmijmy się zatem równaniem odnoszącym się jedynie do składowej elektrycznej tego promieniowania. Równanie wektorowe (8) można przekształcić w równania trzech składowych wektora natężenia pola elektrycznego:

$$\frac{\partial^2 E_x}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 E_x}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 E_x}{\partial z^2} = \varepsilon_0 \mu_0 \varepsilon \mu \frac{\partial^2 E_x}{\partial t^2}, \quad (10)$$

$$\frac{\partial^2 E_y}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 E_y}{\partial z^2} = \varepsilon_0 \mu_0 \varepsilon \mu \frac{\partial^2 E_y}{\partial t^2}, \quad (11)$$

$$\frac{\partial^2 E_z}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 E_z}{\partial z^2} = \varepsilon_0 \mu_0 \varepsilon \mu \frac{\partial^2 E_z}{\partial t^2}, \quad (12)$$

kóre odnoszą się do czasowo-przestrzennych zmian wektora natężenia pola elektrycznego. Analogiczne równania możemy uzyskać dla wektora natężenia pola magnetycznego. Widzimy zatem, iż każda składowa pola elektromagnetycznego ($E_m; H_m$) _{$m=x,y,z$} spełnia następujące skalarne równanie różniczkowe:

$$\frac{\partial^2 U}{\partial x^2} + \frac{\partial^2 U}{\partial y^2} + \frac{\partial^2 U}{\partial z^2} = \frac{1}{V_n^2} \frac{\partial^2 U}{\partial t^2}, \quad (13)$$

gdzie

$$V_n = \frac{1}{\sqrt{\varepsilon_0 \mu_0 \varepsilon \mu}}. \quad (14)$$

Jeżeli zauważymy, iż względna przenikalność elektryczna ośrodka zlokalizowanego w zmiennym polu elektrycznym zależy od częstotliwości zmian tego pola, czyli określa dyspersję rozchodzącego się w nim pola elektromagnetycznego, wówczas widzimy, iż równanie (8) opisuje propagację fali elektromagnetycznej rozchodzącej z prędkością V_n w ośrodku, którego współczynnik załamania wynosi $n = \sqrt{\varepsilon \mu}$. Właśnie ten związek pomiędzy częstotliwością zmian pola elektrycznego a względną przenikalnością elektryczną jest odpowiedzialny za wszelkiego rodzaju zjawiska rozszczepienia światła

polichromatycznego na poszczególne składowe monochromatyczne podczas rozchodzenia się w ośrodku o określonym współczynniku załamania. Spowodowane jest to tym, iż współczynnik załamania ośrodka przyjmuje różne wartości dla poszczególnych długości fali światła, tym samym różne składowe spektralne załamują się pod różnymi kątami. Kąt załamania maleje wraz ze wzrostem częstości fali świetlnej, lub też wzrasta wraz ze zmniejszaniem się długości fali. Widzimy zatem, że fale krótkie z zakresu widzialnego np. światło fioletowe będzie załamywane pod większym kątem w ośrodku o danym współczynniku załamania niż światło czerwone. Zależność prędkości fali elektromagnetycznej w danym ośrodku w stosunku do jej prędkości w próżni opisuje zatem następujące wyrażenie:

$$V_n = \frac{c}{n}, \quad (15)$$

gdzie c oznacza prędkość fali elektromagnetycznej w próżni:

$$c = \frac{1}{\sqrt{\epsilon_0 \mu_0}} = 3 \times 10^8 \text{ m/s}. \quad (16)$$

Fala świetlna jest zatem falą elektromagnetyczną, a jej propagacja w przestrzeni jest konsekwencją wzajemnego oddziaływania czasowo zmiennego pola elektrycznego oraz pola magnetycznego. Aby wyznaczyć kierunki drgań wektorów natężenia pola elektrycznego i magnetycznego, przeanalizujemy prosty przypadek fali płaskiej rozchodzącej się w próżni w kierunku osi z . Wektor natężenia pola elektrycznego jest stały w nieskończonym zbiorze płaszczyzn prostopadłych do kierunku propagacji. Jest on zatem funkcją jedynie dwóch zmiennych $\bar{E} = E(z, t)$. Jeżeli odniesiemy się teraz do jednego z równań Maxwella (3) i założymy, że w całej przestrzeni $\rho = 0$, to korzystając z równania materiałowego (5), otrzymamy następującą zależność na dywergencję wektora natężenia pola elektrycznego:

$$\frac{\partial \bar{E}_x}{\partial x} + \frac{\partial \bar{E}_y}{\partial y} + \frac{\partial \bar{E}_z}{\partial z} = 0. \quad (17)$$

Ponieważ wektor natężenia pola elektrycznego jest niezależny od współrzędnych przestrzennych x i y , zatem powyższe równanie redukuje się do postaci:

$$\frac{\partial \bar{E}_z}{\partial z} = 0. \quad (18)$$

Jeżeli składowa E_z nie jest równa zero, czyli istnieje pewna składowa wektora natężenia pola elektrycznego w kierunku rozchodzenia się fali elektromagnetycznej, wówczas równanie (18) oznacza, iż nie jest ona funkcją współrzędnej z i się nie zmienia wraz z propagacją.

W każdym momencie czasu składowa E_z jest stała dla wszystkich wartości z , jednakże w takim przypadku nie mielibyśmy do czynienia z propagacją fali elektromagnetycznej wzdłuż osi z , ponieważ nie dochodziłoby do sprzężenia pola elektrycznego z magnetycznym, które ma miejsce tylko dla pól zmiennych czasowo. Należy zatem przyjąć, że $E_z = 0$, wówczas z równania (18) będzie wynikało, że fala elektromagnetyczna nie będzie posiadała składowej wektora natężenia pola elektrycznego w kierunku propagacji. Oznacza to, że fala elektromagnetyczna, a zatem fala świetlna, jest falą poprzeczną.

W celu przeprowadzenia analogicznej analizy dla wektora natężenia pola magnetycznego, konieczne byłoby określenie dokładnego kierunku drgań wektora natężenia pola elektrycznego. Przyjmując, iż drgania wektora natężenia pola elektrycznego mają charakter harmoniczny, oraz zakładając, że wektor natężenia pola elektrycznego oscyluje jedynie w jednym, ściśle określonym kierunku, równoległym do osi y :

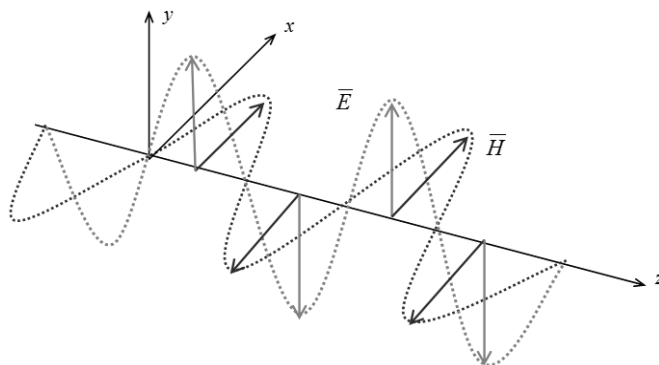
$$\bar{E} = E(y, t)\hat{j}, \quad (19)$$

wówczas korzystając z właściwości rotacji, w rozważanym przypadku równanie (1) możemy zapisać:

$$-\frac{\partial \bar{E}_y}{\partial z} = -\frac{\partial \bar{B}_x}{\partial t} \quad (20)$$

lub też uwzględniając równanie (6) oraz zakładając, że względna przenikalność magnetyczna próżni i przenikalność magnetyczna ośrodka nie zmieniają się w czasie, otrzymujemy:

$$-\frac{\partial \bar{E}_y}{\partial z} = -\mu_0 \mu \frac{\partial \bar{H}_x}{\partial t}. \quad (21)$$



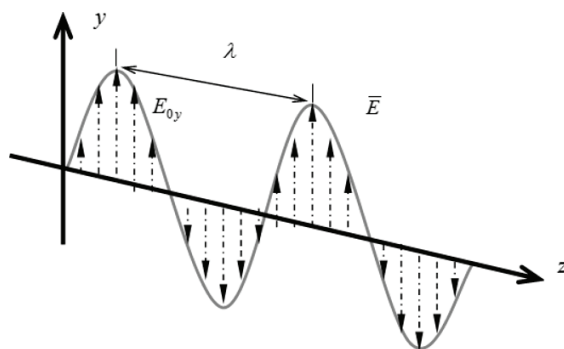
Rys. 3.2. Fala elektromagnetyczna jako fala poprzeczna

Widzimy zatem, iż składowe y i z wektora natężenia pola magnetycznego lub też wektora indukcji magnetycznej są stałe w czasie. Zmienne czasowo pole magnetyczne może mieć jedynie składową w kierunku osi x . Tym samym zmienne czasowo drgania wektorów natężenia pola elektrycznego oraz wektora natężenia pola magnetycznego tworzące falę elektromagnetyczną występują jedynie w płaszczyźnie x - y , czyli prostopadłej do kierunku propagacji z i jednocześnie wektory te oscylują we wzajemnie prostopadłych kierunkach x i y (patrz rys. 3.2).

Analizowana składowa wektora natężenia pola elektrycznego może być opisana w następujący sposób:

$$E_y(z, t) = E_{0y} \cos \left[\omega \left(t - \frac{z}{V_n} \right) + \varphi \right], \quad (22)$$

gdzie $\omega = 2\pi\nu = 2\pi/T$ oznacza częstość kołową a ν częstotliwość drgań wektora natężenia pola elektrycznego, T – okres drgań wektora natężenia pola elektrycznego, V_n prędkość propagacji fali w ośrodku o współczynniku załamania n oraz φ fazę początkową (patrz rys. 3.3).



Rys. 3.3. Reprezentacja spolaryzowanej liniowo fali elektromagnetycznej jako fali harmonicznej (λ – długość fali promieniowania elektromagnetycznego)

Składową wektora natężenia pola magnetycznego możemy wyznaczyć bezpośrednio na podstawie równania (21):

$$H_x = \frac{1}{\mu_0 \mu} \int \frac{\partial E_y}{\partial z} dt. \quad (23)$$

Po wprowadzeniu wyrażenia (22) do równania (23) otrzymujemy:

$$H_x = \left(\frac{1}{\mu_0 \mu} \right) \left(\frac{\omega}{V_n} \right) E_{0y} \int \sin \left[\omega \left(t - \frac{z}{V_n} \right) + \varphi \right] dt, \quad (24)$$

czyli

$$H_x = \left(\frac{1}{\mu_0 \mu} \right) \left(\frac{1}{V_n} \right) E_{0y} \cos \left[\omega \left(t - \frac{z}{V_n} \right) + \varphi \right] = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon}{\mu_0 \mu}} E_{0y} \cos \left[\omega \left(t - \frac{z}{V_n} \right) + \varphi \right] \quad (25)$$

lub po prostu:

$$H_x = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon}{\mu_0 \mu}} E_y. \quad (26)$$

Widzimy zatem, iż drgania wektorów natężenia pola elektrycznego i magnetycznego są zgodne w fazie i opisane tą samą zależnością czasową. Różnią się jedynie wartościami amplitud drgań o stałą $\sqrt{\varepsilon_0 \varepsilon / \mu_0 \mu}$. Zatem stosunek amplitudy wektora natężenia pola elektrycznego do amplitudy wektora natężenia pola magnetycznego jest wielkością stałą i określany jest mianem oporności ośrodka. Jednocześnie wektory natężenia pola elektrycznego oraz natężenia pola magnetycznego tworzą układ prawoskrętny z kierunkiem propagacji fali elektromagnetycznej.

Jeżeli kierunek propagacji promieniowania elektromagnetycznego będzie reprezentowany przez jednostkowy wektor (wersor) \bar{s} , wówczas powyższe spostrzeżenia możemy wyrazić w formalizmie matematycznym za pomocą następujących zależności [3, 9]:

$$\bar{H} \times \bar{s} = \sqrt{\frac{\varepsilon_0 \varepsilon}{\mu_0 \mu}} \bar{E}, \quad (27)$$

$$\bar{s} \times \bar{E} = \sqrt{\frac{\mu_0 \mu}{\varepsilon_0 \varepsilon}} \bar{H}, \quad (28)$$

lub też korzystając z pojęcia wektora falowego $\bar{k} = |\bar{k}| \bar{s}$ określającego kierunek propagacji fali świetlnej, powyższe zależności możemy przedstawić ogólnie w postaci:

$$\bar{k} = \frac{|\bar{k}|}{|\bar{E} \times \bar{H}|} \bar{E} \times \bar{H}. \quad (29)$$

Jeżeli dodatkowo wprowadzimy zależność opisującą gęstość strumienia energii fali elektromagnetycznej, czyli wektor Poyntinga:

$$\bar{S} = \bar{E} \times \bar{H}, \quad (30)$$

to widzimy, iż w ośrodku izotropowym energia fali elektromagnetycznej jest transportowana prostopadle do jej czoła, czyli w kierunku propagacji. Możemy powiedzieć, że kierunek wektora falowego jest zgodny z kierunkiem przenoszenia energii przez falę elektromagnetyczną.

W wyniku wzajemnego sprzężenia zmiennego czasowo pola elektrycznego i magnetycznego możliwa jest propagacja światła w ośrodkach materialnych.

Fala elektromagnetyczna jest falą poprzeczną, gdyż wektory natężenia pola elektrycznego oraz natężenia pola magnetycznego drgają w fazie we wzajemnie prostopadłych kierunkach. Płaszczyzna drgań tych wektorów jest prostopadła do kierunku propagacji fali elektromagnetycznej.

Współczynnik załamania światła jest wielkością dyspersyjną. Fale o krótszej długości fali załamane są pod większym kątem niż fale o dłuższych długościach fal.

W ośrodkach izotropowych energia fali elektromagnetycznej jest transportowana prostopadle do jej czoła, czyli w kierunku propagacji – kierunku wektora falowego.

3.2.2. Polaryzacja światła

Fala elektromagnetyczna jest falą poprzeczną tzn. wektory natężenia pola elektrycznego i magnetycznego drgają we wzajemnie prostopadłych płaszczyznach, które dodatkowo są prostopadłe do kierunku propagacji fali – kierunku wektora falowego. W celu jednoznacznego określenia kierunku oscylacji obu tych wektorów, konieczne jest wyznaczenie kierunku drgań przynajmniej jednego z nich. W ogólnym przypadku jest to zagadnienie dość skomplikowane, gdyż w płaszczyźnie prostopadłej do kierunku propagacji może istnieć nieskończenie wiele kierunków drgań tych wektorów. Jednocześnie w przypadku światła naturalnego wektor natężenia pola elektrycznego nie tylko zmienia swoją amplitudę, lecz również może on drgać w losowych kierunkach. Mamy wówczas do czynienia ze światłem niespolaryzowanym. Istnieją jednak pewne przypadki, w których możliwe jest określenie ustalonego kierunku drgań wektora natężenia pola elektrycznego, czyli wyznaczenie jego polaryzacji. W ogólnym przypadku, gdy analizujemy falę elektromagnetyczną rozchodzącą się w kierunku propagacji równoległym do osi z , wówczas wektor natężenia pola elektrycznego posiada dwie składowe w kierunkach osi x i y , a tym samym można go zapisać w następującej postaci:

$$\vec{E} = \vec{E}_x + \vec{E}_y = E_{0x}\hat{i} + E_{0y}\hat{j}. \quad (31)$$

Dodatkowo zakładając, że mamy do czynienia z monochromatyczną falą elektromagnetyczną, składowe wektora natężenia pole elektrycznego mogą być opisane w następujący sposób:

$$\bar{E}_x = E_{0x} \cos(\omega t - kz) \hat{i}, \quad (32)$$

$$\bar{E}_y = E_{0y} \cos(\omega t - kz + \varphi_{xy}) \hat{j}, \quad (33)$$

gdzie $\varphi_{xy} = \varphi_x - \varphi_y$ jest różnicą faz początkowych obu składowych wektora natężenia pola elektrycznego. W zależności od wartości różnicy faz oraz rzeczywistych amplitud wektora natężenia pola elektrycznego wyróżniamy trzy podstawowe rodzaje polaryzacji światła: liniową, eliptyczną oraz kołową. Z czego w ogólności stany polaryzacji liniowej oraz kołowej są szczególnymi przypadkami polaryzacji eliptycznej. Równania (32) i (33) prowadzą do następujących zależności:

$$\frac{E_x}{E_{0x}} = \cos(\omega t - kz), \quad (34)$$

$$\frac{E_y}{E_{0y}} = \cos(\omega t - kz + \varphi_{xy}). \quad (35)$$

Korzystając z zależności trygonometrycznych, funkcja kosinus z równania (35) może zostać przekształcony w następujący sposób:

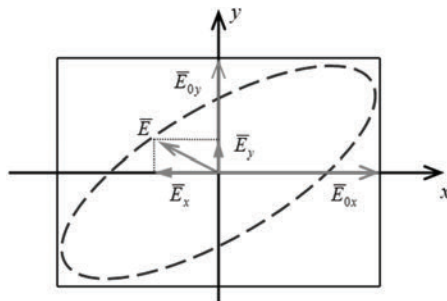
$$\cos(\omega t - kz + \varphi_{xy}) = \cos(\omega t - kz) \cos \varphi_{xy} - \sin(\omega t - kz) \sin \varphi_{xy}. \quad (36)$$

Po odpowiednich podstawieniach prawdziwa jest zależność:

$$\frac{E_y}{E_{0y}} = \frac{E_x}{E_{0x}} \cos \varphi_{xy} - \sqrt{1 - \cos^2(\omega t - kz)} \sin \varphi_{xy}, \quad (37)$$

lub też

$$\frac{E_y}{E_{0y}} = \frac{E_x}{E_{0x}} \cos \varphi_{xy} - \sqrt{1 - \left(\frac{E_x}{E_{0x}}\right)^2} \sin \varphi_{xy}. \quad (38)$$



Rys. 3.4. Graficzne przedstawienie stanu polaryzacji eliptycznej

Ostatecznie po drobnych przekształceniach równania (38) uzyskujemy zależność:

$$\left(\frac{E_x}{E_{0x}}\right)^2 + \left(\frac{E_y}{E_{0y}}\right)^2 - 2\frac{E_x E_y}{E_{0x} E_{0y}} \cos \varphi_{xy} = \sin^2 \varphi_{xy}. \quad (39)$$

Widzimy zatem, iż dla dowolnej wartości różnicy faz φ_{xy} końce wektorów natężenia pola elektrycznego zakreślają w danej płaszczyźnie $z = \text{const}$ elipsę (patrz rys. 3.4). Mamy wówczas do czynienia z **polaryzacją eliptyczną**, a falę świetlną, której składowe wektory natężenia pola elektrycznego spełniają zależność (39) – nazywamy falami spolaryzowanymi eliptycznie.

Gdy różnica faz pomiędzy składowymi wektora natężenia pola elektrycznego wynosi $\varphi_{xy} = \pm \frac{\pi}{2} + 2m\pi$ ($m = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$) i dodatkowo $E_{0x} = E_{0y} = E_0$ wówczas zależność (39) przybiera następującą postać:

$$\left(\frac{E_x}{E_0}\right)^2 + \left(\frac{E_y}{E_0}\right)^2 = 1 \quad (40)$$

lub też

$$E_x^2 + E_y^2 = E_0^2. \quad (41)$$

Powyższe równanie jest równaniem okręgu, z tego też powodu ten rodzaj polaryzacji określane jest mianem **polaryzacji kołowej**. W tym przypadku amplitudy składowych wektora natężenia pola elektrycznego pozostają stałe w czasie, a końce wektorów w płaszczyźnie $z = \text{const}$ zakreślają okrąg. W zależności od wartości różnicy faz, mamy do czynienia z dwoma rodzajami skrętności wektora natężenia pola elektrycznego:

- polaryzacją kołową lewoskrętną dla $\varphi_{xy} = \frac{\pi}{2} + 2m\pi$: wektor \vec{E} obraca się w płaszczyźnie $z = \text{const}$ przeciwnie do ruchu wskazówek zegara z częstością kołową ω ,
- polaryzacją kołową prawoskrętną dla $\varphi_{xy} = -\frac{\pi}{2} + 2m\pi$: wektor \vec{E} obraca się w płaszczyźnie $z = \text{const}$ zgodnie z ruchem wskazówek zegara z częstością kołową ω .

Jeżeli pojęcie skrętności rozszerzymy do przypadku polaryzacji eliptycznej, wówczas z polaryzacją prawoskrętną mamy do czynienia, gdy $0^\circ < \varphi_{xy} < 180^\circ$, a z polaryzacją lewoskrętną, gdy $180^\circ < \varphi_{xy} < 360^\circ$.

Jeżeli natomiast $\varphi_{xy} = \pm m2\pi$ ($m = 0, 1, 2, \dots$), to obie składowe wektora natężenia pola elektrycznego wyrażone zależnościami (32) i (33) są w fazie, a wypadkowy wektor przybiera postać:

$$\bar{E} = \bar{E}_x + \bar{E}_y = (E_{0x}\hat{i} + E_{0y}\hat{j})\cos(\omega t - kz). \quad (42)$$

Oznacza to, iż dla stałych wartości amplitud E_{0x}, E_{0y} drgania wektora natężenia pola elektrycznego mają charakter harmoniczny z amplitudą $\bar{E}_0 = (E_{0x}\hat{i} + E_{0y}\hat{j})$ oraz częstością kołową ω w płaszczyźnie (x, y) wzdłuż kierunku określonego przez kąt $\zeta = \tan^{-1}(E_{0y}/E_{0x})$ w stosunku do osi x . Przypadek ten odnosi się do **liniowej polaryzacji światła**, a zależność (39) przybiera postać:

$$\left(\frac{E_x}{E_{0x}} - \frac{E_y}{E_{0y}} \right)^2 = 0, \quad (43)$$

zatem

$$E_y = \frac{E_{0y}}{E_{0x}} E_x, \quad (44)$$

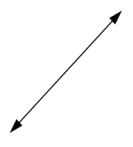
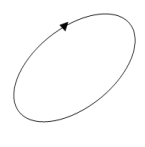
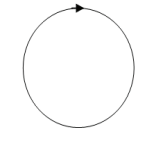
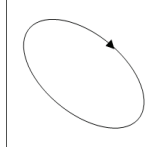
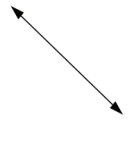
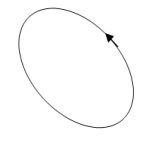
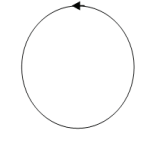
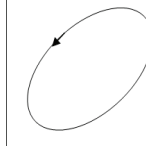
lub po prostu

$$\frac{E_x}{E_y} = \frac{E_{0x}}{E_{0y}} = \text{const.} \quad (45)$$

Widzimy zatem, iż obie składowe są w fazie, a ich amplitudy są proporcjonalne z dokładnością do stosunku E_{0y}/E_{0x} . Zatem stan polaryzacji liniowej jest szczególnym przypadkiem stanu polaryzacji eliptycznej, dla której $E_{0x} = E_{0y}$.

Zmiany stanu polaryzacji światła w zależności od różnicy faz pomiędzy składowymi wektora natężenia pola elektrycznego przedstawiono na rys. 3.5. Każdy stan polaryzacji może być zatem złożony z dwóch fal spolaryzowanych liniowo we wzajemnie prostopadłych płaszczyznach. W zależności od rzeczywistych amplitud składowych wektora natężenia pola elektrycznego oraz różnicy faz między nimi uzyskujemy kołowe lub eliptyczne stany polaryzacji o różnej skrętności.

Jak wiadomo, światło naturalne emitowane ze źródeł termicznych jest niespolaryzowane, czyli wektor natężenia pola elektrycznego drga w sposób nieuporządkowany w losowych kierunkach. Możliwe jest jednak wymuszenie uporządkowania drgań wektora natężenia pola elektrycznego, w wyniku czego uzyskuje się światło spolaryzowane. Istnieje wiele sposobów uzyskania światła spolaryzowanego, ale do najczęściej wykorzystywanych technik należy polaryzacja światła przez odbicie i załamanie, selektywną absorpcję oraz dwójłomność optyczną.

$\delta = 0$ lub $\delta = 2\pi$	$0 < \delta < \pi/2$	$\delta = \pi/2$	$\pi/2 < \delta < \pi$
			
$\delta = \pi$	$\pi < \delta < 3\pi/2$	$\delta = 3\pi/2$	$3\pi/2 < \delta < 2\pi$
			

Rys. 3.5. Zależność stanu polaryzacji światła od wartości różnicy faz φ_{xy} pomiędzy składowymi \vec{E}_x, \vec{E}_y wektora natężenia pola elektrycznego

W pierwszym z nich mamy do czynienia np. w przypadku odbicia światła od gładkiej powierzchni dielektryka. Amplitudowy współczynnik odbicia, wyrażony jako stosunek amplitudy wiązki odbitej od powierzchni do amplitudy wiązki padającej na nią, opisuje ilościowo właściwości odbiciowe powierzchni, na którą pada światło. Należy zaznaczyć, iż wartość tego współczynnika zależy nie tylko od kąta padania wiązki świetlnej, lecz również od jej stanu polaryzacji. Jeżeli wyróżnimy dwie składowe wektora natężenia pola elektrycznego o kierunku równoległym lub prostopadłym do płaszczyzny padania (zawierającej normalną do powierzchni padania oraz promień wyznaczający bieg wiązki padającej), amplitudowe współczynniki odbicia poszczególnych składowych wektora natężenia pola elektrycznego fali padającej są opisane za pomocą amplitudowych równań Fresnela:

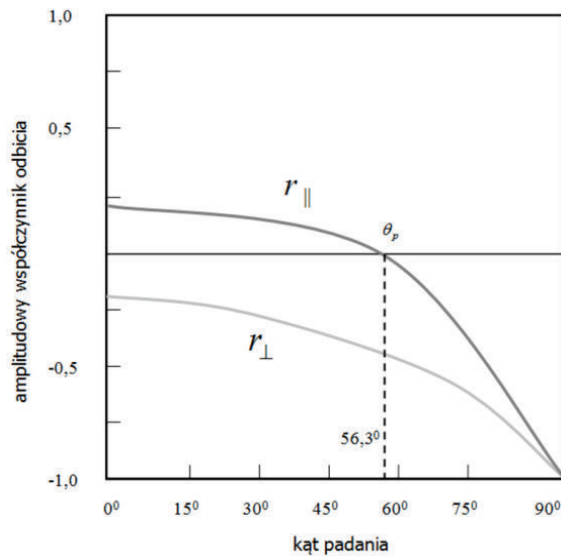
$$r_{\perp} = \left(\frac{E_{\text{odb}}}{E_{\text{pad}}} \right)_{\perp} = \frac{n_1 \cos \theta_{\text{pad}} - n_2 \cos \theta_{\text{zał}}}{n_1 \cos \theta_{\text{pad}} + n_2 \cos \theta_{\text{zał}}}, \quad (46)$$

$$r_{\parallel} = \left(\frac{E_{\text{odb}}}{E_{\text{pad}}} \right)_{\parallel} = \frac{n_2 \cos \theta_{\text{pad}} - n_1 \cos \theta_{\text{zał}}}{n_1 \cos \theta_{\text{zał}} + n_2 \cos \theta_{\text{pad}}}, \quad (47)$$

gdzie r_{\perp}, r_{\parallel} są amplitudowymi współczynnikami odbicia składowych wektora pola elektrycznego odpowiednio prostopadłych oraz równoległych do płaszczyzny padania, $E_{\text{pad}}, E_{\text{odb}}$ są amplitudami wektora natężenia pola elektrycznego odpowiednio wiązki padającej i odbitej, $\theta_{\text{pad}}, \theta_{\text{zał}}$ kątami padania i załamania wiązki świetlnej na powierzchni granicznej, a n_1, n_2 współczynnikami załamania odpowiednio ośrodka wejściowego oraz ośrodka, na który pada wiązka świetlna. Jeżeli $n_2 > n_1$, wówczas zgod-

nie z prawem załamania $\theta_{\text{pad}} > \theta_{\text{zał}}$, tym samym r_{\perp} przyjmuje wartości ujemne dla wszystkich kątów padania.

Z kolei r_{\parallel} przyjmuje wartość dodatnią dla kąta padania równego zero stopni (w stosunku do normalnej do powierzchni). Wraz ze wzrostem kąta padania wartość r_{\parallel} spada aż do zera (dla kąta padania równego 90°). Przykładową zależność amplitudowych współczynników odbicia od kąta padania dla dwóch stanów polaryzacji liniowej przedstawiono na rys. 3.6. W analizowanym przypadku współczynnik załamania ośrodka wejściowego wynosi 1, a współczynnik załamania ośrodka, na który pada wiązka świetlna, wynosi 1,5.



Rys. 3.6. Zależność amplitudowych współczynników odbicia od kąta padania dla dwóch stanów polaryzacji liniowej ($n_{12} = 1,5$)

Widzimy, iż dla pewnego kąta padania θ_p amplitudowy współczynnik odbicia składowej wektora natężenia pola elektrycznego równoległej do płaszczyzny padania jest równy zero. Oznacza to, że w tym przypadku światło odbite nie zawiera składowej równoległej do płaszczyzny padania, lecz jedynie składową prostopadłą do niej. Odbita wiązka świetlna jest zatem całkowicie spolaryzowana liniowo. Efekt ten związany jest ze zjawiskiem całkowitego wewnętrznego odbicia, które zachodzi dla pewnego specyficznego kąta padania nazywanego kątem granicznym. Wówczas kąt pomiędzy promieniem odbitym a załamanym jest równy 90° . Dla kątów padania o wartościach większych od kąta granicznego mamy do czynienia z całkowitym wewnętrznym odbiciem. Warunek opisujący zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia może być wprowadzony z prawa załamania światła:

$$n_1 \sin(\theta_{\text{pad}}) = n_2 \sin(\theta_{\text{zał}}) \Rightarrow \sin(\theta_{\text{pad}}) = \frac{n_2}{n_1} \sin(90 - \theta_{\text{pad}}) = \frac{n_2}{n_1} \cos(\theta_{\text{pad}}),$$

zatem

$$\theta_p = \theta_{\text{pad}} = \arctg\left(\frac{n_2}{n_1}\right), \quad (48)$$

Widzimy więc, iż przypadku przedstawionym na rys. 3.6, gdy $n_2/n_1 = 1,5$, kąt padania, przy którym zachodzi zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia, wynosi $56,3^\circ$.

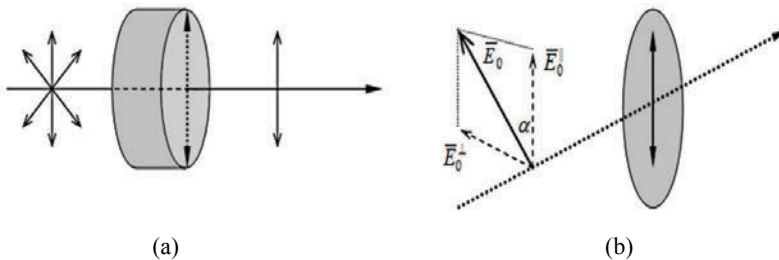
Ze wzorów Fresnela wynika, że nie jest możliwe uzyskanie w pełni spolaryzowanej wiązki świetlnej przez załamanie światła. Wykorzystując to zjawisko możemy uzyskać jedynie światło częściowo spolaryzowane, jednakże możliwe jest zwiększenie jego stopnia polaryzacji poprzez wielokrotne załamanie światła. Oznacza to, iż wysoki stopień polaryzacji osiągniemy poprzez wielokrotne przepuszczenie wiązki światła pod kątem Brewstera przez tą samą płytkę lub też przez szereg płytek o odpowiednio dobranych współczynnikach załamania. Zjawisko polaryzacji światła poprzez załamanie znalazło zastosowanie w komorach rezonansowych laserów, gdyż poprzez zastosowanie elementów optycznych o określonym współczynniku załamania, na które pada wiązka laserowa pod odpowiednim kątem, możliwa jest generacja silnie spolaryzowanego światła.

Kolejnym sposobem uzyskania światła spolaryzowanego jest proces selektywnej absorpcji [4, 9]. W przypadku folii polaryzacyjnej (polaroidu), którą jest np. folia poliesterowa z zanurzonymi w niej długimi dichroicznymi kryształami o średnicy dużo mniejszej od długości fali, w momencie uporządkowania cząstek kryształu w taki sposób, że tworzą one zbiór równoległe ułożonych przewodników, możliwe jest wyeliminowanie pewnych składowych wektora natężenia pola elektrycznego wiązki światła padającej na taką strukturę. Dzieje się tak, ponieważ fala świetlna o kierunku drgań wektora natężenia pola elektrycznego równoległym do osi długiej kryształów, wytwarza w nich prąd, który ze względu na ich niezerowy opór przekształca się w ciepło. Ponieważ energia świetlna w rozważanym ośrodku zostaje zamieniona na ciepło, tym samym mamy do czynienia z rozpraszaniem energii niesionej przez składową wektora natężenia pola elektrycznego lub też absorpcją tej składowej przez ośrodek. W przypadku wiązki spolaryzowanej prostopadle do kierunku uporządkowania cząstek przewodzących, prąd indukcyjny jest znikomy, zatem nie zachodzi proces pochłaniania energii fali świetlnej lub jest on pomijalny.

Możliwe jest również spolaryzowanie światła poprzez wykorzystanie elementów optycznych wykonanych z materiałów o właściwościach dwójłomnych, a dokładniej mówiąc jednoosiowych kryształów dwójłomnych. Mamy wówczas do czynienia z polaryzatorami pryzmatycznymi. W tym przypadku wchodzące do ośrodka światło

ulega podziałowi na dwa promienie własne [1, 4, 6, 9]. Jeden z nich pada na powierzchnię wewnętrzną pryzmatu pod kątem mniejszym od kąta całkowitego wewnętrznego odbicia, dlatego jest załamany na powierzchni granicznej, a drugi promień pada pod większym kątem tak, iż ulega całkowitemu wewnętrznemu odbiciu i jest pochłaniany lub też odchylany i kierowany poza układ optyczny. Przykładem takich polaryzatorów mogą być pryzmaty: Glan-Thompsona, Arensa, Glana, Foster, Wollastona itp.

Elementy optyczne, które wykorzystywane są do uporządkowania drgań wektora natężenia pola elektrycznego, czyli przekształcenia wiązki niespolaryzowanej w spolaryzowaną nazywamy polaryzatorami. Zazwyczaj mamy na myśli polaryzatory liniowe tzn. generujące światło spolaryzowane liniowo, gdyż polaryzatory eliptyczne lub kołowe są złożeniem polaryzatora liniowego oraz ćwierćfalowej płytki fazowej. Powyżej opisano kilka przykładów działania polaryzatorów liniowych, które opierają się na eliminacji pozostałych składowych wektora natężenia poza składowymi drgającymi w jednym, ściśle określonym kierunku wyznaczonym przez oś transmisji polaryzatora (patrz rys. 3.7a).



Rys. 3.7. Zasada działania polaryzatora(a), Ilustracja prawa Malusa (b)

Ograniczenie pozostałych składowych wektora natężenia pola elektrycznego prowadzi do zmniejszenia całkowitej amplitudy wektora natężenia pola elektrycznego wiązki wyjściowej, a tym samym do zmniejszenia jej natężenia w stosunku do natężenia wiązki padającej na polaryzator. W celu określenia natężenia wiązki wyjściowej stosuje się prawo Malusa wyrażone wzorem (50).

W celu uproszczenia analizy założmy, że na polaryzator pada światło spolaryzowane liniowo w płaszczyźnie tworzącej pewien kąt α z osią transmisji polaryzatora. Każdy wektor natężenia pola elektrycznego \vec{E}_0 możemy rozłożyć na dwie składowe: prostopadłą \vec{E}_0^\perp oraz równoległą \vec{E}_0^\parallel do kierunku przepuszczania polaryzatora (patrz rys. 3.7b). Polaryzator przepuści jedynie składową równoległą, którą można opisać zależnością:

$$\vec{E}_0^\parallel = \vec{E}_0 \cos \alpha . \quad (49)$$

Ponieważ natężenie fali elektromagnetycznej jest równe kwadratowi rzeczywistej amplitudy jej wektora natężenia pola elektrycznego, zatem natężenie fali świetlnej po przejściu przez polaryzator wynosi:

$$I_{\parallel} = (E_0^{\parallel})^2 = I_0 \cos^2 \alpha . \quad (50)$$

Widzimy więc, że zależy ono od wartości natężenia wiązki wejściowej oraz od kąta pomiędzy osią transmisji polaryzatora a kierunkiem drgań początkowego wektora natężenia pola elektrycznego.

Polaryzacja fali świetlnej to uporządkowane drganie wektora natężenia pola elektrycznego w ściśle określony sposób.

W zależności od sposobu drgań wektora natężenia pola elektrycznego wyróżniamy trzy podstawowe rodzaje polaryzacji: **liniową**, **kołową** i **eliptyczną**.

Gdy końce wektorów natężenia pola elektrycznego zakreślają w danej płaszczyźnie $z = \text{const}$ elipsę, mamy wówczas do czynienia z **polaryzacją eliptyczną**.

Gdy różnica faz pomiędzy składowymi wektora natężenia pola elektrycznego wynosi $\varphi_{xy} = \pm \frac{\pi}{2} + 2m\pi$ ($m = 0, \pm 1, \pm 2, \dots$) i dodatkowo $E_{0x} = E_{0y} = E_0$, wówczas mamy do czynienia z **polaryzacją kołową**.

W zależności od różnicy faz pomiędzy składowymi wektora natężenia pola elektrycznego wyróżniamy **polaryzację eliptyczną** oraz **kołową prawoskrętną** i **lewoskrętną**.

Gdy różnica faz wynosi $\varphi_{xy} = \pm m2\pi$ ($m = 0, 1, 2, \dots$), to obie składowe wektora natężenia pola elektrycznego są w fazie i obserwujemy **polaryzację liniową** światła.

Uporządkowanie drganie wektora natężenia pola elektrycznego możemy wymusić poprzez odbicie i załamanie światła, selektywną absorpcję oraz dwójłomność optyczną.

Wartość natężenia wiązki wejściowej po przejściu przez polaryzator liniowy zależy od wartości natężenia fali padającej na polaryzator oraz od kąta pomiędzy osią transmisji polaryzatora a kierunkiem drgań początkowego wektora natężenia pola elektrycznego.

3.3. Natężenie promieniowania świetlnego i podstawy fotometrii

Fala elektromagnetyczna, rozchodząc się w przestrzeni staje się źródłem energii, która może prowadzić do podniesienia temperatury danego przedmiotu, wzbudzić jego luminescencję lub też jest w stanie zainicjować przebieg różnego rodzaju reakcji chemicznych, określanych mianem fotochemicznych. W zależności od ilości dostarczonej energii świetlnej możemy uzyskać różnego rodzaju efekty, dlatego też określenie natężenia światła jest tak istotne w optyce biomedycznej.

Porównywaniem oraz pomiarem energii światła białego zajmuje się fotometria, z kolei porównywaniem i pomiarem energii poszczególnych składowych długości fali analizowanego światła, czyli składowych spektralnych, zajmuje się spektrofotometria. Detekcja promieniowania elektromagnetycznego, w tym światła, opiera się na pomiarze energii tego promieniowania, dlatego też poniżej opisane zostaną podstawowe wielkości fizyczne pozwalające na scharakteryzowanie energii niesionej przez falę elektromagnetyczną, jak również wielkości powszechnie stosowane w fotometrii.

W przypadku, gdy chcemy analizować „ilość” światła oświetlającego daną powierzchnię, posługujemy się wielkością fizyczną określaną mianem natężenia promieniowania I , która zdefiniowana jest jako uśredniona energia promieniowania padającego na jednostkową powierzchnię w jednostkowym czasie. Każdy detektor promieniowania charakteryzuje się skończonymi wymiarami powierzchni sensorycznej, zatem oświetlona powierzchnia detektora zawsze ogranicza się do pewnego ustalonego obszaru. Z tego też powodu, w celu wyeliminowania zależności uzyskiwanych wyników pomiaru natężenia promieniowania od rozmiaru okna detektora, wartość całkowitej energii promieniowania dzieli się przez wartość powierzchni detektora. Jednocześnie pomiary wykonywane są w skończonym okresie czasu t , tym samym wyniki pomiarów przeprowadzonych w tych samych warunkach, lecz w innym okresie czasu, mogą się w znaczny sposób różnić. W celu wyeliminowania tego wpływu czyli normalizacji uzyskiwanych wyników pomiarów, zmierzoną wartość dzieli się również przez czas t . W ten sposób średnia wartość energii elektromagnetycznej podzielona przez powierzchnię detektora oraz czas pomiaru, określa wartość natężenia promieniowania. Jednocześnie wartość I określa się na podstawie czasowo uśrednionej wartości modułu wektora Poyntinga. Jak to było wspomniane, to wektor Poyntinga (równanie (30)) określa kierunek rozchodzenia się gęstości strumienia energii fali elektromagnetycznej. Znając wektor natężenia pola elektrycznego, z zależności (27) można wyznaczyć wektor natężenia pola magnetycznego i dodatkowo, wprowadzając go do równania (30), możemy uzyskać następującą zależność opisującą wektor Poyntinga:

$$\bar{S} = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon}{\mu_0 \mu}} E^2 \bar{s}, \quad (51)$$

gdzie E określa wartość wektora natężenia pola elektrycznego. Ponieważ natężenie pola elektrycznego jest wielkością zmienną w czasie, również wektor Poyntinga będzie zmieniał się w czasie, dlatego konieczne jest jego uśrednienie czasowe. Uśredniona wartość modułu wektora Poyntinga może zostać przedstawiona w następujący sposób:

$$\langle S \rangle = \frac{1}{2} \sqrt{\frac{\epsilon_0 \mathcal{E}}{\mu_0 \mu}} E_0^2, \quad (52)$$

gdzie E_0 oznacza rzeczywistą amplitudę wektora natężenia pola elektrycznego. Często wartość tę normuje się tak, iż wartość natężenia promieniowania może być opisana przez następującą zależność:

$$I = \frac{\langle S \rangle}{\frac{1}{2} \sqrt{\frac{\epsilon_0 \mathcal{E}}{\mu_0 \mu}}} = E_0^2. \quad (53)$$

Widzimy zatem, iż natężenie promieniowania jest równe kwadratowi rzeczywistej amplitudy wektora natężenia pola elektrycznego. Z uwagi na fakt, iż pole magnetyczne nie jest obserwowalne wizualnie, powyższe wielkości wektora Poyntinga, jego uśrednionego modułu oraz natężenia promieniowania zostały wyrażone przez wielkości związane z polem elektrycznym. Z tego też powodu w optyce najczęściej analizuje się jedynie składową elektryczną pola elektromagnetycznego.

Należy jednak pamiętać, iż pomiary natężenia światła wiążą się z nieodwracalną utratą części informacji na temat rozchodzącego się w przestrzeni światła. Fakt, iż natężenie promieniowania jest równe kwadratowi rzeczywistej amplitudy \bar{E} implikuje całkowitą utratę informacji na temat fazy propagujących fal elektromagnetycznych, co zostanie pokazane poniżej. Jak wiadomo falę świetlną, podobnie, jak każdą falę elektromagnetyczną, możemy opisać funkcją harmoniczną, reprezentującą drgania harmoniczne wektora natężenie pola elektrycznego. W optyce falowej monochromatyczne fale świetlne reprezentowane są przez funkcję zespoloną o następującej postaci [3]:

$$U(\vec{r}, t) = A(\vec{r}) \exp\{i[\omega t + \varphi(\vec{r})]\}, \quad (54)$$

która spełnia równanie falowe (13). Niezależny czasowo człon $U(\vec{r}) = A(\vec{r}) \exp\{i\varphi(\vec{r})\}$ powyższego równania określa się mianem amplitudy zespolonej (fazora), której moduł jest równy rzeczywistej amplitudzie fali w danym punkcie przestrzeni $A(\vec{r})$, a jej argument $\arg[U(\vec{r})] = \varphi(\vec{r})$ nazywamy fazą fali. Widzimy zatem, iż funkcję zespoloną opisaną zależnością (54), możemy przedstawić w następującej postaci:

$$U(\vec{r}, t) = U(\vec{r}) \exp(i\omega t). \quad (55)$$

Amplituda zespolona fali świetlnej zawiera zatem informację na temat amplitudy fali $A(\vec{r})$, czyli niesionej przez nią energii oraz fazy $\varphi(\vec{r})$ opisującej jej rozkład przestrzenny. W pomiarach optycznych stosowane są różne detektory np. oko, fotoemulsja światłoczuła, fotodiody, fotopowielacze, kamery CCD etc., które mierzą natężenie promieniowania świetlnego. Widzimy zatem, iż nie możemy przeprowadzić rejestracji całej amplitudy zespolonej $U(\vec{r}) = A(\vec{r}) \exp\{i\varphi(\vec{r})\}$, a tym samym zapisać pełną informacji o obiekcie, lecz zapisujemy jedynie jej część amplitudową, gdyż natężenie promieniowania jest proporcjonalne do kwadratu modułu amplitudy zespolonej fali świetlnej, czyli

$$I(\vec{r}) = |U(\vec{r})|^2 = U(\vec{r}) \cdot U^*(\vec{r}) = [A(\vec{r})]^2, \quad (56)$$

gdzie symbol * oznacza sprzężenie liczby zespolonej. Tym samym rejestracja natężenia promieniowania pozwala na rejestrację informacji amplitudowej oraz powoduje utratę informacji fazowej na temat propagującej fali świetlnej. W celu odzyskania tej informacji stosuje się różnego rodzaju techniki interferometryczne lub też holograficzne, polegające na specyficznym zakodowaniu informacji fazowej w modulacji amplitudy fali świetlnej.

Jak już to było wspomniane powyżej, pomiarem charakterystyki energetycznej światła białego emitowanego przez źródła światła lub też padającego na dane obiekty, zajmuje się fotometria. W celu bezpośredniego określenia oraz porównania efektywności działania źródeł świetlnych lub też oświetlenia powierzchni, w fotometrii stosuje się pewne podstawowe wielkości fizyczne, które zostaną przedstawione poniżej.

W ogólnym przypadku fotometrię dzielimy na fotometrię energetyczną (obiektywną) oraz fotometrię wizualną (subiektywną), która odnosi się do pomiarów wykonywanych za pomocą odbiorników selektywnych spektralnie, czyli o różnej czułości dla określonych długości fal promieniowania [4, 5]. Z uwagi na fakt, iż pomiary fotometryczne oparte na ocenie wzrokowej mają duże znaczenie praktyczne, stworzono odrębny układ jednostek fotometrii subiektywnej. Przedstawione poniżej wielkości fizyczne będą odnosiły się do obu obszarów fotometrii: subiektywnej i obiektywnej.

Na początku wprowadźmy pojęcie kąta bryłowego Ω , którego jednostką jest steradian (sr). Steradian jest to kąt bryłowy o wierzchołku w środku kuli wycinający z jej powierzchni pole równe kwadratowi promienia tej kuli. Wartość kąta bryłowego wyrażonego w steradianach określa stosunek pola P wyciętego przez ten kąt na powierzchni kuli o promieniu r do kwadratu tego promienia:

$$\Omega = \frac{P}{r^2} [\text{sr}]. \quad (57)$$

Pełny kąt bryłowy jest równy 4π sr. Jedną z podstawowych wielkości fotometrycznych opisującą ilość energii $d\Sigma$ wypromieniowaną w jednostce czasu dt przez źródło światła jest **strumień energii** ϕ_o , zdefiniowany w następujący sposób:

$$\phi_o = \frac{d\Sigma}{dt}. \quad (58)$$

Jednostką strumienia energii świetlnej jest wat (W). Strumień ten będziemy określać mianem obiektywnego strumienia energii, gdyż dotyczy on detektorów rejestrujących światło polichromatyczne – białe, z taką samą czułością dla wszystkich jego składowych.

W celu pomiaru strumienia energii ϕ_S w sposób subiektywny, czyli wizualnie tzn. stosując detektor o określonej czułości spektralnej np. oko ludzkie, konieczne jest uwzględnienie czułości detektora $\eta_{\text{det}}(\lambda)$ na promieniowanie o różnych długościach fali [4]. Czułość tę można zdefiniować jako stosunek ϕ_S subiektywnego (wizualnego) strumienia energii do obiektywnego strumienia energii. Jeżeli dodatkowo wprowadzimy funkcję rozkładu spektralnego strumienia energii:

$$\phi(\lambda) = \frac{\Delta\phi_o}{\Delta\lambda}, \quad (59)$$

wówczas **subiektywny, wizualny strumień energii** może być wyrażony przez następującą zależność:

$$\phi_S = \int_{\lambda_0}^{\lambda_1} \eta_{\text{det}}(\lambda) \phi(\lambda) d\lambda, \quad (60)$$

gdzie całkowanie zachodzi po przedziale spektralnym, dla którego czułość detektora jest różna od zera. Jednostką subiektywnego strumienia energii jest lumen (lm).

Natężenie promieniowania źródła światła (światłość) I_{zr} jest to strumień promieniowania emitowany ze źródła światła w jednostkowym kącie bryłowym. Podobnie, jak w przypadku strumienia energii, w zależności od sposobu pomiaru, wyróżniamy obiektywne natężenie promieniowania źródła światła:

$$I_{\text{zr}}^o = \frac{\phi_o}{\Omega}, \quad (61)$$

którego jednostką jest wat przez steradian (W/sr) oraz **subiektywne natężenie promieniowania źródła światła**:

$$I_{\text{zr}}^S = \frac{\phi_S}{\Omega}, \quad (62)$$

którego jednostką jest kandela (cd).

Kolejną wielkością fotometryczną charakteryzującą źródło światła jest **luminancja** L (**jaskrawość**), którą definiuje się jako strumień promieniowania emitowanego przez jednostkę powierzchni źródła w jednostkowym kącie bryłowym. Podobnie, jak poprzednio, wyróżniamy **luminancję obiektywną**:

$$L_o = \frac{I_{zr}^o}{P} = \frac{\phi_o}{\Omega \cdot P} \left[\frac{W}{sr \cdot m^2} \right], \quad (63)$$

oraz **luminancję subiektywną**:

$$L_o = \frac{I_{zr}^S}{P} = \frac{\phi_S}{\Omega \cdot P} \left[\frac{lm}{sr \cdot m^2} = nt \right] \quad (64)$$

Jednostką luminancji subiektywnej jest nit. Źródło światła ma luminancję równą 1 nitowi, jeżeli 1 m² powierzchni źródła emituje promieniowanie o światłości 1 kandel w kierunku normalnym do powierzchni.

W celu charakteryzacji warunków oświetlenia powierzchni wprowadzono wielkość fizyczną określaną jako oświetlenie i zdefiniowaną przez strumień światła normalnie padającego na jednostkę powierzchni. W przypadku fotometrii obiektywnej wielkość tę nazywamy **natężeniem napromienienia** (także gęstością mocy lub gęstością strumienia energii) i wyrażamy poprzez następującą zależność:

$$E = \frac{\phi_e}{P} \left[\frac{W}{m^2} \right]. \quad (65)$$

W przypadku fotometrii subiektywnej nazywamy ją **natężeniem oświetlenia**:

$$E_S = \frac{\phi_S}{P} \left[\frac{lm}{m^2} = lx \right], \quad (66)$$

którego jednostką jest lux (lx). Natężenie oświetlenia jest równe 1 lx, jeżeli punktowe źródło światła o światłości 1 cd znajduje się w odległości 1 m od oświetlanego przedmiotu (powierzchni).

Dodatkowo w przypadku fotometrii obiektywnej definiuje się kolejną wielkość fizyczną nazywaną **gęstością energii promieniowania**, określającą energię Σ emitowaną przez/lub padającą na jednostkę powierzchni:

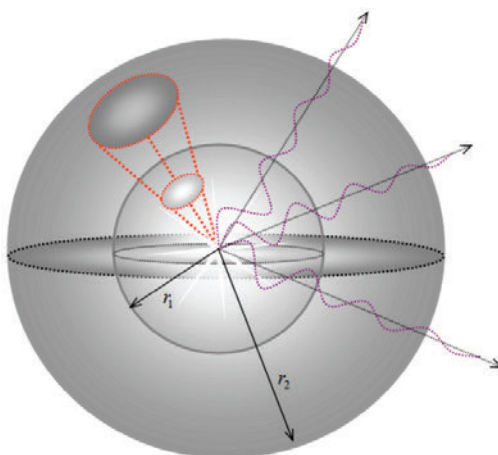
$$GE = \frac{\Sigma}{S} \left[\frac{J}{m^2} \right] \quad (67)$$

Zestawienie podstawowych wielkości fizycznych fotometrii obiektywnej oraz subiektywnej, jak również ich jednostek, zostało przedstawione w tab. 1.

Podstawową relacją przedstawiającą związki pomiędzy wielkościami fotometrycznymi jest prawo odwrotnych kwadratów, które wyraża zasadę zachowania energii wyemitowanej przez źródło światła. Rozpatrzmy zatem przypadek punktowego źródła światła, równomiernie emitującego energię we wszystkich możliwych kierunkach. Dodatkowo założmy, że przestrzeń wokół źródła światła została ograniczona przez dwie powierzchnie sferyczne o promieniach krzywizny równych odpowiednio r_1 oraz r_2 (patrz rys. 3.8).

Table 1. Porównanie podstawowych wielkości fotometrycznych oraz ich jednostek

Fotometria obiektywna		Fotometria subiektywna (wizualna)		
	wielkość fizyczna	jednostka	wielkość fizyczna	jednostka
1	energia promienista – emitowana lub padająca na powierzchnię	[J]	ilość światła	[lm·s]
2	obiektywny strumień energii (moc promienista)	[W]	subiektywny strumień energii (strumień świetlny)	[lm]
3	natężenie promieniowania źródła światła (światłość)	[W/sr]	światłość	[cd]=[lm/sr]
4	luminancja promieniowania (jaskrawość)	[W/sr·m ²]	luminancja	[nt]=[cd/m ²]
5	natężenie napromienienia (gęstość mocy, gęstość strumienia energii, oświetlenie)	[W/m ²]	natężenie oświetlenia	[lm/m ²]
6	gęstość energii promieniowania	[J/m ²]		



Rys. 3.8. Emisja promieniowania przez punktowe źródło światła (wyjaśnienie w tekście)

Przyjmijmy również, że wyrażenia $A_0(r_1)$, $A_0(r_2)$ reprezentują amplitudy fal świetlnych w odległości odpowiednio r_1 oraz r_2 od źródła światła. Zgodnie z zasadą zachowania energii, całkowita energia przechodząca w jednostce czasu przez kolejne powierzchnie ograniczające oddalone o r_1 oraz r_2 od źródła punkowego musi być taka sama. Oczywiście przy założeniu, iż w przestrzeni tej nie ma innych źródeł światła i nie zachodzi zjawisko absorpcji. W dalszych rozważaniach należy pamiętać, iż natężenie jest równe średniej energii padającej na jednostkę po-

wierzchni w jednostce czasu. Jeżeli odwołamy się do równania (53), które mówi, że natężenie promieniowania jest proporcjonalne do kwadratu rzeczywistej amplitudy fali świetlnej i wielkość tę pomnożymy przez pole oświetlonej powierzchni oraz wyciągniemy pierwiastek tego wyrażenia, wówczas otrzymamy następującą zależność:

$$r_1 A_0(r_1) = r_2 A_0(r_2), \quad (68)$$

Ponieważ wartości r_i mogą przybierać dowolne wartości, oznacza to, iż

$$r A_0(r) = \text{const}, \quad (69)$$

czyli amplituda fali musi się zmniejszać proporcjonalnie do odwrotności odległości r_i powierzchni ograniczającej od źródła światła. Stwierdzenie to jest w pełni uzasadnione, jeśli zauważymy, iż punktowe źródło światła generuje falę sferyczną, której amplituda jest równa A/r .

Tym samym zgodnie z równaniem (53), które mówi, iż natężenie jest proporcjonalne do kwadratu amplitudy fali świetlnej, natężenie promieniowania emitowanego przez punktowe źródło światła jest proporcjonalne do $1/r^2$. Przedstawione twierdzenie nazywamy **prawem odwrotnych kwadratów**. Jego postać odnoszącą się do podstawowych wielkości fotometrycznych, jak również opisującą ich wzajemne zależności i związki, możemy przedstawić w następujący sposób:

$$E_i = \frac{\phi_i}{P} = \frac{I_{zr}^i \cdot \Omega}{P} = \frac{I_{zr}^i}{P} \cdot \frac{P}{r^2} = \frac{I_{zr}^i}{r^2}. \quad (70)$$

Oznacza to, że przy stałym natężeniu promieniowania źródła światła (światłości) oświetlenie (natężenie napromieniania, natężenie oświetlenia) maleje wraz z kwadratem odległości od źródła światła.

W przypadku, gdy źródło promieniowania charakteryzuje się równomiernym natężeniem oświetlenia we wszystkich kierunkach, czyli w pełnym kącie bryłowym, wówczas całkowity strumień energii opisany jest zależnością:

$$\phi_C = \Omega_C \cdot I_{zr} = 4\pi I_{zr}. \quad (71)$$

Porównywaniem oraz pomiarem energii światła białego zajmuje się fotometria, z kolei porównywaniem i pomiarem energii poszczególnych składowych długości fali analizowanego światła zajmuje się spektrofotometria.

Natężenie promieniowania I zdefiniowane jest jako uśredniona energia promieniowania padającego na jednostkową powierzchnię w jednostkowym czasie.

Fotometrię dzielimy na fotometrię energetyczną (obiektywną) oraz fotometrię wizualną (subiektywną), która odnosi się do pomiarów wykonywanych za pomocą odbiorników selektywnych spektralnie, czyli o różnej czułości dla określonych długości fal promieniowania.

Do głównych wielkości fizycznych stosowanych w fotometrii obiektywnej należy: energia promienista (emitowana lub padająca na powierzchnię) [J], obiektywny strumień energii (moc promienista) [W], natężenie promieniowania źródła światła (światłość) [W/sr], luminancja promieniowania (jaskrawość) [W/sr·m²], natężenie napromienienia [W/m²], gęstość energii promieniowania [J/m²].

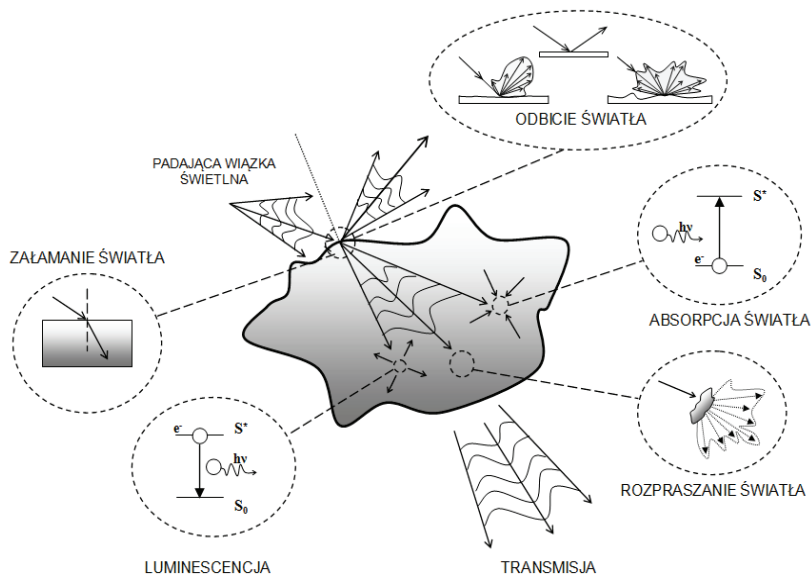
Do głównych wielkości fizycznych stosowanych w fotometrii wizualnej należy: ilość światła [lm·s], subiektywny strumień energii (strumień świetlny) [lm], światłość [cd], luminancja [nt], natężenie oświetlenia [lm/m²].

Zgodnie z prawem odwrotnych kwadratów natężenie promieniowania emitowanego przez punktowe źródło światła jest odwrotnie proporcjonalne do kwadratu odległości od źródła – r^2 .

3.4. Transformacja światła na obiektach materialnych

Propagujące w przestrzeni światło podlega transformacji optycznej w kontakcie z każdym obiektem materialnym, zarówno nieożywionym, jak i ożywionym, znajdującym się na jego drodze. W konsekwencji mamy do czynienia z amplitudowo-fazową modulacją fal świetlnych, która jest zależna od specyficznych, osobniczych cech danego obiektu, które wpływać mogą m.in. na stopień polaryzacji, amplitudę oraz rozkład przestrzenny np. rozbieżność lub też kierunek propagacji wiązki świetlnej. Promieniowanie padające na obiekt może zostać odbite całkowicie lub częściowo, może ulec odbiciu zwierciadlanemu lub też dyfuzyjnemu na granicy ośrodków o różnych współczynnikach załamania (patrz rys. 3.9).

Jednocześnie może ono być również rozproszone przez centra rozpraszające znajdujące się na powierzchni lub wewnątrz tego obiektu lub zostać zaabsorbowane przez różnego rodzaju chromofory [10]. Mamy tym samym do czynienia zarówno ze zmianą początkowego kierunku propagacji światła, jak również niesioną przez nie energią promienistą. Ta część promieniowania, która nie została zaabsorbowana i nie uległa ani odbiciu, ani załamaniu na powierzchni granicznej, może rozchodzić się dalej w ośrodku. Zjawisko to nazywane jest transmisją.



Rys. 3.9. Schematyczna ilustracja transformacji światła na obiekcie materialnym

Światło padające może przejść przez analizowany obiekt (są to tzw. *obiekty przezroczyste, transparentne*) całkowicie (bez strat energii promienistej) lub też częściowo (ze stratami energii promienistej). Gdy mamy do czynienia z silnymi procesami absorpcji, rozpraszania czy odbicia, wiązka świetlna transmitowana przez obiekt może nie zostać w ogóle zaobserwowana (tzw. *obiekty nieprzezroczyste, nietransparentne*).

Fala świetlna staje się nośnikiem informacji przedmiotowej, którą można odzyskać, wykorzystując odpowiednie techniki optycznego przetwarzania informacji w celu dokładnego scharakteryzowania badanych obiektów fizycznych. To intuicyjne spostrzeżenie leży u podstaw metodologii wszystkich optycznych technik diagnostyki, a także terapii medycznych. Każdy obiekt może być scharakteryzowany przez podstawowe parametry fizyczne, jak np. współczynnik załamania światła, współczynnik absorpcji, rozpraszania, transmisji lub też odbicia, które w bezpośredni sposób charakteryzują oddziaływanie tego obiektu ze światłem, a tym samym opisują efektywność transformacji fal świetlnych. Należy podkreślić, iż wszystkie znane klasyczne zjawiska optyczne obserwowalne przy kontakcie światła z materią nieożywioną takie, jak odbicie, rozproszenie, załamanie, dyfrakcja czy też absorpcja światła, zachowują swoją poprawność i mogą być rozpatrywane również w odniesieniu do materii żywej – na przykład narządów, tkanek lub też innych obiektów biologicznych (np. komórek lub bakterii), a charakter (amplitudowy lub też fazowy) transformacji światła na nich jest bezpośrednio związany z ich właściwościami optycznymi i w zależności od tego może mieć różny przebieg.

W przypadku obiektów biologicznych uzyskane efekty optyczne mogą charakteryzować się znacznie większą dynamiką niż w przypadku obiektów nieożywionych.

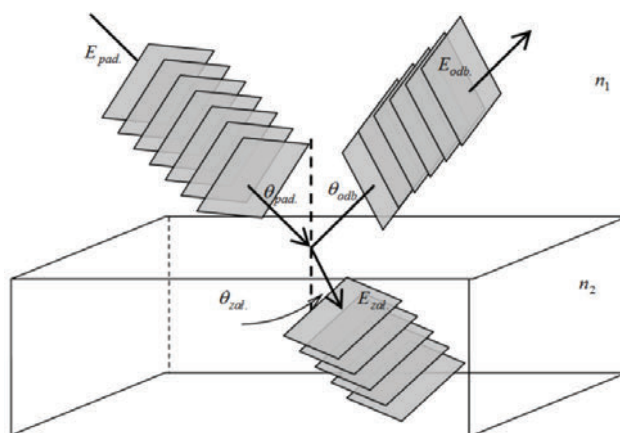
Przyczyną takiego stanu rzeczy jest fakt, iż obiekty te są ośrodkami bardzo silnie anizotropowym zarówno strukturalnie, biochemicznie, jak i optycznie. Złożony skład chemiczny związany z obecnością różnorodnych związków chemicznych m.in. białkowych, lipidowych, chromoforów itp., jak również skomplikowana budowa strukturalna tych obiektów może prowadzić do np. rozpraszania, absorpcji i ugięcia światła, które w ogólnym przypadku prowadzą do osłabienia wiązki świetlnej.

Należy jednak pamiętać, iż w konsekwencji tego oddziaływania, dzięki analizie np. rozkładu przestrzennego światła rozproszonego, indukowanej luminescencji lub też właśnie osłabienia wiązki świetlnej, jesteśmy w stanie w dość precyzyjny sposób scharakteryzować właściwości obiektów biologicznych. Zdobyte w ten sposób informacje mogą znaleźć praktyczne wykorzystanie w nowych technikach diagnostycznych lub terapeutycznych.

Widzimy zatem, iż u podstaw różnych technik optyki biomedycznej leży konieczność scharakteryzowania oddziaływania światła z materią żywą w oparciu o klasyczne zjawiska optyczne. Omówione zatem zostaną tu podstawy fizyczne takich zjawisk jak: załamanie, odbicie, absorpcja, luminescencja oraz rozpraszanie światła.

3.4.1. Załamanie i odbicie światła

Jak wiadomo z podstaw optyki, światło padając na granicę ośrodków o różnych współczynnikach załamania może ulec odbiciu oraz załamaniu.



Rys. 3.10. Odbicie oraz załamanie płaskiej fali świetlnej na granicy ośrodków o różnych współczynnikach załamania (objaśnienia w tekście)

Oba procesy powodują zmianę kierunku propagacji padającej wiązki świetlnej oraz zmianę jej amplitudy. Schematyczne przedstawienie tych zjawisk w przypadku skolimowanej wiązki świetlnej zostało pokazane na rys. 3.10. Widzimy, iż padająca na

granicę ośrodków o różnych współczynnikach załamania wiązka świetlna E_{pad} ulega częściowemu odbiciu E_{odb} , a pozostała jej część $E_{\text{zał}}$ załamuje się i rozprzestrzenia się dalej w drugim ośrodku, przy czym:

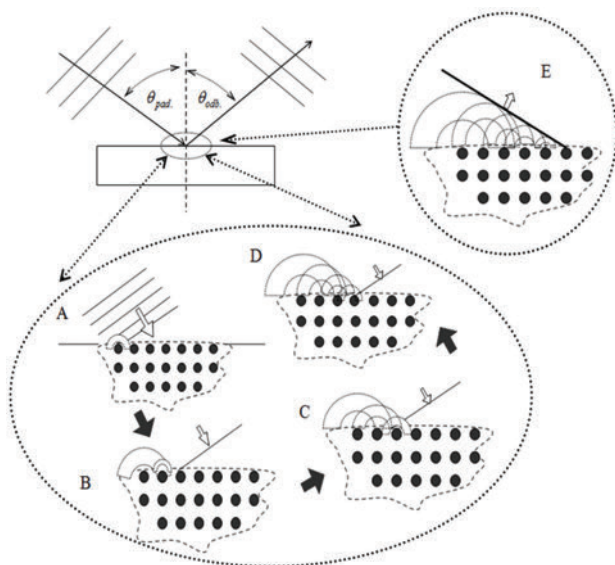
$$E_{\text{pad}} = E_{\text{odb}} + E_{\text{zał}}. \quad (72)$$

Omawiane procesy należą do jednych z podstawowych transformacji światła na obiektach, jak również prowadzą do osłabienia natężenia wiązki świetlnej rozchodzącej się w drugim ośrodku.

3.4.1.1. Odbicie światła

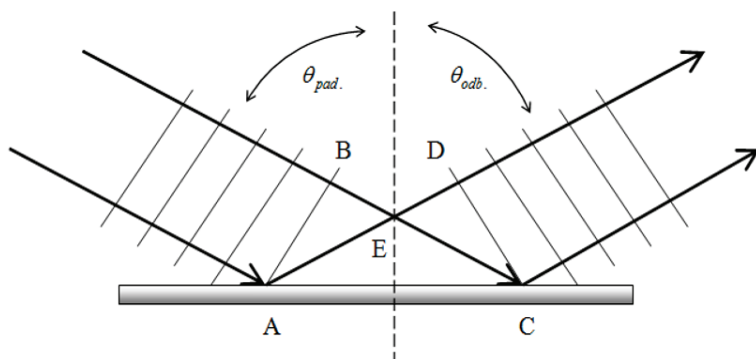
Rozważmy przypadek, w którym skolimowana wiązka świetlna, czyli innymi słowy zbiór fal płaskich, pada na płaską, gładką optycznie powierzchnię ośrodka np. szkła, które dla uproszczenia znajduje się w próżni, pod kątem θ_{pad} w stosunku do normalnej (patrz rys. 3.11). Jak wiadomo każdy ośrodek materialny składa się z atomów, które za pomocą różnego rodzaju wiązań łączą się ze sobą, tworząc cząstki, z których ten ośrodek się składa. Atomy o określonej strukturze elektronowej pod wpływem zewnętrznego, oscylacyjnego pola elektrycznego wprawiane są w ruch, czyli innymi słowy są dipolami elektrycznymi, drgającymi z częstością odpowiadającą wzbudzającemu polu elektrycznemu.

W tym przypadku dipole te stają się wtórnymi źródłami pola elektromagnetycznego. Widzimy zatem, iż omawiany przypadek można sprowadzić do analizy oddziaływania fali elektromagnetycznej z każdym atomem z osobna. Zjawisko odbicia może być zatem rozpatrywane jako wynik rozproszenia promieniowania elektromagnetycznego na atomach ośrodka. W celu uproszczenia prowadzonej analizy ograniczmy się jedynie do oddziaływania fali elektromagnetycznej z jedną warstwą atomów zlokalizowanych tuż przy powierzchni ośrodka, na które pada światło. Atomy ośrodka mogą być traktowane jako elementarne centra rozpraszające (rys. 3.12 A, B, C i D). Wzbudzone atomy stają się wtórnymi źródłami promieniowania elektromagnetycznego, które emitują z powierzchni ośrodka wtórne fale elektromagnetyczne. Ponieważ odległość pomiędzy kolejnymi atomami jest znacznie mniejsza niż długość fali światła padającego na ośrodek, fale świetlne wyemitowane z powrotem do próżni są w fazie, a tym samym interferują konstruktywnie tylko w jednym ściśle określonym kierunku, tworząc wiązkę światła odbitego. Ostatnie stwierdzenie traci swoją słuszność, gdy zastosowane zostanie promieniowanie krótkofalowe np. promieniowanie rentgenowskie, ponieważ wówczas będziemy mieli do czynienia z wiązkami odbitymi w kilku kierunkach. Będzie to miało miejsce również w sytuacji, gdy odległości pomiędzy atomami będą porównywalne lub większe od długości fali stosowanego światła, gdyż w tym przypadku taką strukturę można traktować jak siatkę dyfrakcyjną.



Rys. 3.11. Odbicie wiązki świetlnej na powierzchni ośrodka będącego zbiorem cząsteczek (na podstawie [1])

Tym samym falę odbitą należy traktować jako superpozycję fal świetlnych rozproszonych na każdej cząsteczce powierzchni ośrodka, a wypadkowy front falowy wiązki odbitej stanowi obwiednię elementarnych frontów falowych wyemitowanych przez te nie (rys. 3.11E).



Rys. 3.12. Odbicie wiązki świetlnej na powierzchni granicznej dwóch ośrodków (objaśnienia w tekście)

Kierunek wiązki odbitej jest uzależniony od stałej różnicy faz pomiędzy centrami rozpraszającymi, która z kolei zależy od kąta padania wejściowej fali świetlnej. W celu dokładnego wyznaczenia kąta odbicia przeanalizujemy bardziej poglądowy schemat

(patrz rys. 3.12) przedstawiający omawiany powyżej przypadek. Jeżeli przyjmiemy, że odcinek $|AB|$ pokrywa się z frontem falowym wzbudzającym poszczególne powierzchniowe atomy ośrodka, to wówczas odcinek $|CD|$ reprezentuje wypadkowy front falowy wygenerowany przez wtórne źródła światła. Aby w płaszczyźnie wyznaczonej przez odcinek $|CD|$ nastąpiła konstruktywna superpozycja fal rozproszonych na centrach zlokalizowanych odpowiednio w punktach A i C, czyli innymi słowy, aby były one w fazie, odcinki $|BC|$ oraz $|AD|$ muszą być sobie równe.

Ponieważ $\angle(ACB) = 90^\circ - \theta_{\text{pad}}$, a $\angle(ABC) = 90^\circ$, zatem $\angle(BAC) = \theta_{\text{pad}}$ i analogicznie $\angle(ACD) = \theta_{\text{odb}}$. W konsekwencji prawdziwe są więc zależności:

$$\sin \angle(BAC) = \sin \theta_{\text{pad}} = \frac{|BC|}{|AC|}, \quad (73)$$

$$\sin \angle(ACD) = \sin \theta_{\text{odb}} = \frac{|AD|}{|AC|}. \quad (74)$$

Dodatkowo oba trójkąty $\triangle ABC$ oraz $\triangle CDA$ mają wspólną przeciwprostokątną, zatem ostatecznie:

$$\frac{|BC|}{\sin \theta_{\text{pad}}} = \frac{|AD|}{\sin \theta_{\text{odb}}}. \quad (75)$$

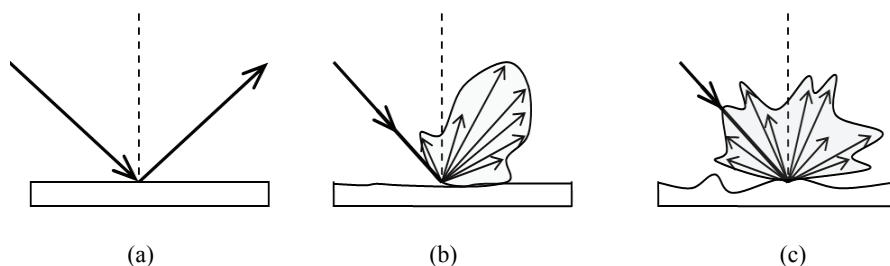
Wszystkie fale świetlne, zarówno padające, jak i odbite, propagują w tym samym ośrodku – próżni, zatem ich prędkość c jest taka sama, więc przy założeniu, że $|BC| = |AD| = c\Delta t$ warunek (75) jest spełniony tylko wtedy, gdy $\sin \theta_{\text{pad}} = \sin \theta_{\text{odb}}$. W konsekwencji uzyskujemy powszechnie znaną w fizyce zależność opisującą prawo odbicia:

$$\theta_{\text{pad}} = \theta_{\text{odb}}, \quad (76)$$

która mówi, iż kąt odbicia jest równy kątowi padania.

W optyce geometrycznej przyjmuje się, iż promień świetlny jest to linia wskazująca kierunek rozchodzenia się energii promieniowania i w przypadku ośrodków izotropowych jest ona również prostopadła do frontu falowego (powierzchni falowej, czoła fali). Przybliżenie to jest stosowane w sytuacji, gdy wszystkie analizowane wymiary są znacznie większe niż długość fali stosowanego światła, zatem możliwe jest przyjęcie założenia, że długość fali dąży do zera. Właśnie do pojęcia promienia odnosi się druga część prawa odbicia, która mówi, iż promień padający, normalna do powierzchni oraz promień odbity leżą w jednej płaszczyźnie nazywanej płaszczyzną padania.

W zależności od stanu struktury powierzchni, na którą pada wiązka świetlna, mamy do czynienia z dwoma podstawowymi rodzajami odbicia: **odbiciem zwierciadlanym (lustrzanym)** oraz **odbiciem dyfuzyjnym**. W przypadku, gdy powierzchnia graniczna dwóch ośrodków o różnych współczynnikach załamania jest chropowata tzn. nierówności powierzchni są większe lub porównywalne z długością fali światła na nią padającego, wówczas mamy do czynienia z rozpraszaniem światła we wszystkich kierunkach, czyli odbiciem dyfuzyjnym (patrz rys. 3.13c). Gdy nierówności powierzchni są małe w porównaniu do długości fali wiązki padającej, czyli mamy do czynienia z powierzchnią bardziej gładką optycznie, wówczas ma miejsce stopniowe ukierunkowywanie się wiązki odbitej (patrz rys. 3.13b). Gdy nierówności te są znacznie mniejsze niż długość fali, czyli w sytuacji gdy mamy do czynienia z powierzchnią gładką optycznie, wówczas zachodzi odbicie tylko w jednym kierunku zdefiniowanym przez prawo odbicia, czyli tzw. odbicie zwierciadlane lub lustrzane (patrz rys. 3.13a). W tym granicznym przypadku możemy stosować pojęcia promienia padającego, odbitego i załamanego.



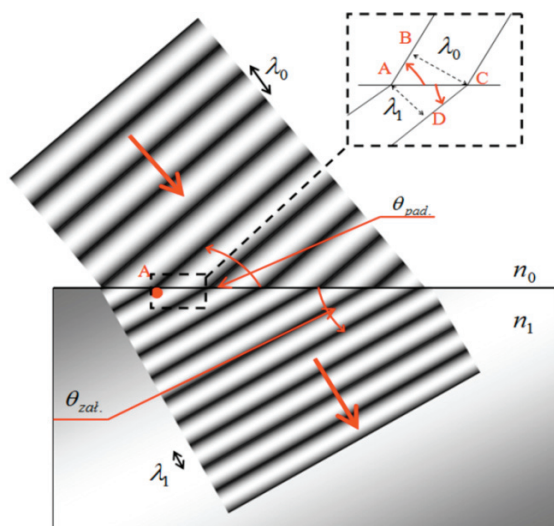
Rys. 3.13. Rodzaje odbicia światła: (a) odbicie zwierciadlane (lustrzane), (b) (c) odbicie dyfuzyjne dla zwiększających się w stosunku do długości fali światła wymiarów nierówności powierzchni

3.4.1.2. Załamanie światła

W poprzednim podrozdziale analizowaliśmy zjawisko odbicia światła, czyli jego transformację na powierzchni rozgraniczającej dwa ośrodki o różnych współczynnikach załamania. Proces ten polegał na zmianie kierunku propagacji światła w wyniku bezpośredniego oddziaływania promieniowania świetlnego z przypowierzchniowymi atomami ośrodka, które pod wpływem oscylacyjnego, zewnętrznego pola elektrycznego stają się dipolami elektrycznymi. W przypadku gładkiej powierzchni wiązka odbita rozprzestrzenia się dalej w tym samym ośrodku w kierunku określonym przez kąt odbicia. Oprócz zmiany kierunku propagacji mamy również do czynienia ze zmniejszeniem się amplitudy wiązki odbitej w stosunku do amplitudy wiązki padającej na granicę ośrodków. Dzieje się tak, ponieważ w tym przypadku mamy do czynienia z podziałem amplitudy wiązki wejściowej, gdyż oprócz generacji wiązki odbitej, część wiązki wejściowej rozprzestrzenia się dalej w drugim ośrodku.

W tej części rozdziału skupimy się na scharakteryzowaniu fali świetlnej rozprzestrzeniającej się w drugim ośrodku oraz na zjawisku załamania światła, zachodzącego na granicy ośrodków.

Proces załamania światła w ośrodku materialnym sprowadza się do wyjaśnienia zmiany prędkości rozchodzenia się fali świetlnej w ośrodkach o różnych współczynnikach załamania światła. Zmiana kierunku propagacji rozchodzącej się w ośrodku wiązki spowodowana jest tym, że wypadkowa prędkość fal świetlnych zależy od rodzaju ośrodka, a dokładniej od jego współczynnika załamania. W celu dokładnego wyjaśnienia tych spostrzeżeń przeanalizujemy schematyczne przedstawienie procesu załamania światła na granicy dwóch ośrodków o współczynnikach załamania równych odpowiednio n_0 oraz n_1 (patrz rys. 3.14). Jak wiadomo, odległości pomiędzy kolejnymi maksimami lub kolejnymi minimami amplitudy fali świetlnej (innymi słowy kolejnymi grzbietami lub dolinami fali) określa okres przestrzenny fali świetlnej, czyli długość fali. W ośrodku o współczynniku załamania n_0 fala świetlna ma długość fali równą λ_0 , jednakże w ośrodku o współczynniku załamania n_1 , jej długość ulega zmianie i wynosi λ_1 .



Rys. 3.14. Załamanie fal świetlnych na granicy ośrodków o różnych współczynnikach załamania (objaśnienia w tekście)

Aby zrozumieć, dlaczego tak się dzieje, odwołajmy się ponownie do przybliżenia zastosowanego w analizie odbicia światła od powierzchni granicznej. Załóżmy, że ośrodek składa się z równomiernie rozmieszczonych atomów, z których każdy działa na inne otaczające go atomy z pewną siłą. Siły te w stanie równowagi ośrodka równoważą się.

W sytuacji, gdy jeden z atomów zostanie wzbudzony np. przez padającą na ośrodek falę elektromagnetyczną będącą źródłem energii, wówczas w wyniku wzajemnego oddziaływania międzyatomowego kolejne atomy będą wzbudzone i zaburzenie będzie się dalej rozprzestrzeniać w ośrodku. Zatem w sytuacji, gdy na granicę ośrodków pada fala świetlna, wówczas wzbudzone atomy stają się dipolami elektrycznymi i zaczynają drgać z częstością równą częstości fali świetlnej, gdyż drgania wzbudzone mają tę samą częstotliwość co źródło wzbudzające. Oznacza to, iż maksima, bądź też minima amplitudy drgań fali świetlnej po obu stronach powierzchni granicznej muszą leżeć w tych samych odległościach, gdyż atomy znajdujące się na powierzchni muszą być poddane działaniu pola elektromagnetycznego o tej samej częstości zmian jego amplitudy pod obu stronach tej powierzchni.

Najkrótsza odległość pomiędzy kolejnymi maksimami fali jest długością fali, równą stosunkowi prędkości fali w ośrodku do jej częstości. Tym samym długość fali wiązki padającej w ośrodku o współczynniku załamania n_0 wynosi $\lambda_0 = 2\pi V_{n_0} / \omega = 2\pi \cdot c / n_0 \omega$, a długość fali w drugim ośrodku wynosi odpowiednio $\lambda_1 = 2\pi V_{n_1} / \omega$, czyli $\lambda_1 = 2\pi \cdot c / n_1 \omega$, gdzie V_{n_i} zgodnie z zależnością (15) przedstawia prędkość fali w ośrodku o współczynniku załamania n_i . Ponieważ częstość drgań musi zostać zachowana, a zmianie ulega prędkość propagacji fali w ośrodku drugim, zatem prawdziwy jest warunek:

$$\frac{2\pi \cdot V_{n_0}}{\lambda_0} = \frac{2\pi \cdot V_{n_1}}{\lambda_1}, \quad (77)$$

stąd otrzymujemy:

$$\frac{\lambda_1}{\lambda_0} = \frac{V_{n_1}}{V_{n_0}} = \frac{cn_0}{cn_1} = \frac{n_0}{n_1}. \quad (78)$$

Ostatecznie uzyskujemy następującą zależność pomiędzy długością fali światła w ośrodku o współczynniku załamania n_1 a długością fali światła rozchodzącego się w ośrodku o współczynniku załamania n_0 :

$$\lambda_1 = \frac{n_0}{n_1} \lambda_0. \quad (79)$$

Z rysunku 3.14 widzimy, że trójkąty $\triangle ABC$ oraz $\triangle CDA$ mają wspólną przeciwprostokątną i dodatkowo $\angle BAC = \theta_{\text{pad}}$ oraz $\angle DCA = \theta_{\text{zal}}$. Zatem możliwe jest bezpośrednio wyznaczenie zależności pomiędzy długościami fal λ_0 oraz λ_1 :

$$\sin \theta_{\text{pad}} = \frac{\lambda_0}{|AC|}, \quad (80)$$

$$\sin \theta_{\text{zał}} = \frac{\lambda_1}{|AC|}, \quad (81)$$

zatem

$$\frac{\lambda_0}{\sin \theta_{\text{pad}}} = \frac{\lambda_1}{\sin \theta_{\text{zał}}} \quad (82)$$

lub

$$\frac{\lambda_1}{\lambda_0} = \frac{\sin \theta_{\text{zał}}}{\sin \theta_{\text{pad}}}. \quad (83)$$

Korzystając z zależności (78), otrzymujemy wyrażenie opisujące prawo załamania światła na granicy dwóch ośrodków o różnych współczynnikach załamania:

$$\frac{\sin \theta_{\text{pad}}}{\sin \theta_{\text{zał}}} = \frac{V_{n0}}{V_{n1}} = \frac{n_1}{n_0} = n_{10} \quad (84)$$

lub inaczej

$$n_0 \sin \theta_{\text{pad}} = n_1 \sin \theta_{\text{zał}}. \quad (85)$$

Powyższe zależności opisują prawo załamania – prawo Snelliusa, które mówi, iż stosunek sinusów kąta padania oraz kąta załamania jest dla danych dwóch ośrodków wielkością stałą – równą stosunkowi prędkości światła w tych ośrodkach lub też jest równy względnemu współczynnikowi załamania ośrodka n_{10} , do którego światło wchodzi względem ośrodka, z którego światło pada na powierzchnię graniczną. Dodatkowo promień załamany, promień padający oraz normalna do powierzchni granicznej w punkcie padania leżą w jednej płaszczyźnie. Kąty załamania oraz odbicia określamy pomiędzy normalną do powierzchni granicznej oraz odpowiednio promieniem załamanym lub też odbitym. Jeżeli ośrodkiem, z którego na powierzchnię graniczną pada światło, jest próżnia (lub w przybliżeniu powietrze), wówczas współczynnik załamania nosi nazwę współczynnika bezwzględnego i wynosi:

$$n = \frac{c}{V_n}. \quad (86)$$

3.4.1.3. Ogólny przypadek transformacji światła w cienkiej warstwie ośrodka

W celu bardziej dokładnej analizy transformacji światła w cienkiej warstwie ośrodka przezroczystego rozważmy następującą sytuację, gdy płytką płasko-rów-

noległa wykonana ze szkła o współczynniku załamania n i grubości d umieszczona w próżni, została oświetlona wiązką świetlną [2]. Dla uproszczenia przyjmijmy, iż wiązka ta pada na płytkę prostopadle do jej powierzchni. W ten sposób ograniczamy do minimum natężenie wiązki odbitej od pierwszej powierzchni granicznej płytki, gdyż w tym przypadku współczynnik odbicia jest równy zeru. Takie założenie pozwoli nam przeanalizować jedynie straty energii wiązki padającej na płytkę wynikające propagacji światła w ośrodku z jakiego wykonana jest ta płytka. Odwołując się do teorii elektromagnetyzmu wiemy, iż ośrodek materialny składa się z atomów zawierających elektrony (swobodne nośniki ładunków), zatem wyjściowa fala świetlna – elektromagnetyczna w znacznej odległości za płytką będzie równa superpozycji pól wytworzonych przez zewnętrzne źródło wzbudzające, które wygenerowało falę padającą na płytkę oraz pól wytworzonych przez każde z wzbudzonych przez oscylacyjne promieniowanie zewnętrzne atomów ośrodka będących dipolami elektrycznymi. Oznacza to, iż atomy do których dotrze rozchodzące się w tym ośrodku promieniowanie elektromagnetyczne staną się wtórnymi źródłami nowego promieniowania elektromagnetycznego. Należy pamiętać, iż wszystkie wtórnie wygenerowane elementarne pola elektryczne posiadają pewne opóźnienie czasowe związane z prędkością propagacji fal elektromagnetycznych w tym ośrodku tzn. opóźnieniem wynikającym ze wzbudzenia kolejnych atomów ośrodka w trakcie propagacji zewnętrznego promieniowania elektromagnetycznego ze skończoną prędkością w tym ośrodku. Jednocześnie zakładamy, że pola generowane przez sąsiednie atomy nie wpływają na siebie, tzn. mamy do czynienia z izolowanymi dipolami elektrycznymi, czyli na atomy ośrodka wpływa jedynie pole wytworzone przez zewnętrzne źródło światła. Widzimy zatem, iż wypadkowe pole elektryczne za płytką może być zapisane w następującej postaci:

$$\bar{E}_{\text{wyj}} = \bar{E}_{\text{pad}} + \sum_m \bar{E}_*, \quad (87)$$

gdzie \bar{E}_* jest elementarnym polem elektrycznym wygenerowanym przez pojedynczy atom ośrodka. Promieniowanie elektromagnetyczne wygenerowane przez źródło zewnętrzne, rozchodzi się w próżni wzdłuż osi z i pada na płytkę płasko-równoległą. Może to być opisane w następujący sposób:

$$E_{\text{pad}} = E_0 \exp\left\{i\omega\left(t - \frac{z}{c}\right)\right\}. \quad (88)$$

Przypomnijmy, iż grubość płytki wynosi d i jest równoznaczna z odległością przebytą przez promieniowanie elektromagnetyczne w tym ośrodku. Jeżeli w omawianej przestrzeni nie byłoby tej płytki, wówczas promieniowanie elektromagnetyczne przebyłoby drogę równą grubości płytki w czasie równym odpowiednio d/c . Jednakże obecność ośrodka o innym współczynniku załamania, sprawia, że promieniowanie elektromagnetyczne rozchodzi się w tym ośrodku z inną prędkością – zależną od

wartości tego współczynnika, czyli równą $V_n = c/n$. Mamy zatem do czynienia ze zmniejszeniem prędkości promieniowania elektromagnetycznego rozchodzącego się w ośrodku materialnym o danym współczynniku załamania światła lub innymi słowy jego opóźnieniem. Widzimy więc, że ta sama droga przebyta przez promieniowanie elektromagnetyczne rozchodzące się w ośrodku z mniejszą prędkością V_n , wymaga dłuższego czasu nd/c , czyli propagująca fala elektromagnetyczna jest opóźniona o wartość $(n-1)d/c$ w stosunku do fali, która rozchodziłaby się w wolnej przestrzeni, gdyby tej płytki nie było. Po opuszczeniu ośrodka promieniowanie elektromagnetyczne rozchodzi się w próżni dalej z początkową prędkością równą c . Po uwzględnieniu opóźnień fazowych wywołanych propagacją promieniowania w ośrodku o innym współczynniku załamania światła niż ośrodek otaczający płytkę, wypadkowe promieniowanie elektromagnetyczne może być przedstawione w następującej postaci:

$$E_{\text{wyj}} = E_0 \exp\left\{i\omega\left[t - (n-1)\frac{d}{c} - \frac{z}{c}\right]\right\} = \exp\left\{-i\omega(n-1)\frac{d}{c}\right\} E_0 \exp\left\{i\omega\left(t - \frac{z}{c}\right)\right\}. \quad (89)$$

Widzimy zatem, iż fala wyjściowa po przejściu przez płytkę jest równa fali rozchodzącej się tak, jakby płytki tej nie było, ale z pewnym przesunięciem fazowym, które jest związane z różnymi prędkościami rozchodzenia się fali w ośrodkach o różnych współczynnikach załamania. Dla małych wartości przesunięcia fazowego $\omega(n-1)d/c$ możemy skorzystać z zależności $e^\theta = 1 + \theta$, przy czym człon eksponencjalny możemy przybliżyć w następujący sposób:

$$\exp\left\{-i\omega(n-1)\frac{d}{c}\right\} = 1 - i\omega(n-1)\frac{d}{c}, \quad (90)$$

Zatem ostatecznie otrzymujemy:

$$E_{\text{wyj}} = E_0 \exp\left\{i\omega\left(t - \frac{z}{c}\right)\right\} - \frac{i\omega(n-1)d}{c} E_0 \exp\left\{i\omega\left(t - \frac{z}{c}\right)\right\}. \quad (91)$$

Promieniowanie elektromagnetyczne w znacznej odległości za płytką jest równe promieniowaniu wyemitowanemu przez zewnętrzne źródło światła, które pada na tą płytkę, oraz promieniowaniu wygenerowanemu przez wzbudzone atomy ośrodka materialnego. Jednocześnie zauważyć należy, iż promieniowanie elektromagnetyczne generowane przez ośrodek zależy od współczynnika załamania światła w tym ośrodku oraz jego grubości (lub też drogi przebytej w ośrodku przez to promieniowanie), jak również od amplitudy fali wyjściowej.

W celu zrozumienia pełnego sensu fizycznego wyrażenia (89) rozszerzymy nasze rozważania na ośrodki absorbujące. Dotychczas nasza analiza światła jako fali elektromagnetycznej, ograniczyła się jedynie do przypadku ośrodka będącego idealnym izolatorem, gdy przewodnictwo właściwe $\sigma = 0$. Jednakże, jeżeli w ośrodku znajdują

się wolne ładunki, wówczas wejściowe promieniowanie elektromagnetyczne może wzbudzić te ładunki kosztem niesionej przez siebie energii, co prowadzi do stopniowego wytlumienia amplitudy promieniowania elektromagnetycznego, czyli pochłaniania energii. W sytuacji, gdy $\sigma \neq 0$, odwołując się do równania (2), otrzymujemy:

$$\text{rot}\bar{H} = \sigma\bar{E} + \varepsilon_0\varepsilon \frac{\partial\bar{E}}{\partial t}, \quad (92)$$

a wiedząc, że

$$\bar{E} = \frac{1}{i\omega} \frac{\partial\bar{E}}{\partial t} = -\frac{i}{\omega} \frac{\partial\bar{E}}{\partial t}, \quad (93)$$

ostatecznie otrzymujemy zależność:

$$\text{rot}\bar{H} = -\frac{i\sigma}{\omega} \frac{\partial\bar{E}}{\partial t} + \varepsilon_0\varepsilon \frac{\partial\bar{E}}{\partial t} = \varepsilon_0 \left(\varepsilon - \frac{i\sigma}{\varepsilon_0\omega} \right) \frac{\partial\bar{E}}{\partial t}. \quad (94)$$

Możliwe jest zatem zdefiniowanie względnej przewodności elektrycznej przewodnika, w następującej postaci:

$$\underline{\varepsilon} = \varepsilon - \frac{i\sigma}{\varepsilon_0\omega},$$

gdzie podkreślenie oznacza liczbę zespoloną. Stosując powyższe wyrażenie, jesteśmy w stanie wyznaczyć zespolony współczynnik załamania przewodnika:

$$\underline{n} = \sqrt{\underline{\varepsilon}} = \sqrt{\varepsilon - \frac{i\sigma}{\varepsilon_0\omega}} = n \sqrt{1 - \frac{i\sigma}{\varepsilon\varepsilon_0\omega}}, \quad (95)$$

gdzie $n = \sqrt{\varepsilon}$. Rozwijając powyższe wyrażenie w szereg i zachowując tylko dwa pierwsze człony, otrzymamy:

$$\underline{n} = n(1 - i\chi) = n - in', \quad (96)$$

gdzie wielkość

$$\chi = \frac{\sigma}{2\varepsilon\varepsilon_0\omega}, \quad (97)$$

jest współczynnikiem absorpcji, opisującym straty energii niesionej przez promieniowanie elektromagnetyczne propagujące w ośrodku. Dodatkowo wielkości n oraz n' są liczbami rzeczywistymi. Widzimy zatem, iż zespolony współczynnik załamania światła \underline{n} uwzględnia zarówno charakterystykę dyspersyjną ośrodka n , wpływającą na prędkość rozchodzenia się w nim promieniowania elektromagnetycznego, jak również

jego właściwości absorpcyjne n' . Liczba falowa w ośrodku absorbującym przybiera następującą postać:

$$\underline{k} = \frac{\omega}{c} \underline{n}. \quad (98)$$

Jeżeli teraz podstawimy zależność (96) opisującą zespolony współczynnik załamania światła w ośrodku zamiast współczynnika załamania n w równaniu (89), który nie uwzględnia zjawiska absorpcji światła w ośrodku, to otrzymamy:

$$E_{\text{wyj}} = \exp\left\{-\omega \frac{d}{c} n'\right\} \exp\left\{-i\omega(n-1)\frac{d}{c}\right\} E_0 \exp\left\{i\omega\left(t - \frac{z}{c}\right)\right\} \quad (99)$$

lub

$$E_{\text{wyj}} = \exp\left\{-\omega \frac{d}{c} n'\right\} \exp\left\{-i\omega(n-1)\frac{d}{c}\right\} E_{\text{pad}}. \quad (100)$$

Pierwszy człon przedstawiający funkcję wykładniczą o ujemnym rzeczywistym wykładniku zależnym od częstości promieniowania elektromagnetycznego ω , współczynnika absorpcji ośrodka χ oraz jego grubości d , będzie przyjmować wartości mniejsze od jedności. Tym samym wyrażenie to opisuje spadek amplitudy fali elektromagnetycznej podczas jej rozchodzenia się w ośrodku materialnym, przy czym przy stałych wartościach n , c , ω oraz χ wartość amplitudy maleje wraz ze wzrostem odległości przebytej przez falę w danym ośrodku. Innymi słowy, zwiększenie grubości płytki będzie prowadziło do większego pochłaniania energii niesionej przez światło.

Ten sam efekt możemy uzyskać przez wprowadzenie światła do ośrodka o większym współczynniku absorpcji, lecz przy zachowaniu stałych wartości pozostałych parametrów. Uogólniając powyższe spostrzeżenia, możemy stwierdzić, że przejściu fali elektromagnetycznej przez absorbujący ośrodek materialny towarzyszy zmniejszenie się jej energii, ze względu na straty wywołane absorpcją ośrodka. Warto również zauważyć, iż człon ten, a tym samym sama absorpcja, ma selektywny charakter, gdyż jest ona zależna od częstości promieniowania elektromagnetycznego, czyli jest to wielkość dyspersyjna. Oznacza to, iż promieniowanie o pewnych konkretnych długościach fali będą przez ośrodek pochłanianie w większym stopniu niż pozostałe składowe spektralne. Widzimy zatem, iż urojona część zespolonego współczynnika załamania n' charakteryzuje absorpcyjne właściwości ośrodka.

Z kolei drugi człon wykładniczy wyrażenia (100) odnosi się do fali, której faza została opóźniona o przesunięcie fazowe $\omega(n-1)d/c$ podczas przechodzenia przez ośrodek materialny o współczynniku załamania n . Reasumując, możemy stwierdzić, iż rozchodzeniu się promieniowania elektromagnetycznego w ośrodku towarzyszy pochłanianie energii, jak również opóźnienie fazowe wywołane przez różnicę współ-

czynników załamania. W ośrodkach materialnych mamy do czynienia zarówno z modulacją amplitudy fal świetlnych, jak również ich fazy, a zmiany zależą od geometrii ośrodka oraz jego właściwości optycznych: współczynnika załamania oraz absorpcji.

Zespolony współczynnik załamania światła \underline{n} uwzględnia zarówno charakterystykę dyspersyjną ośrodka n , wpływającą na prędkość rozchodzenia się w nim promieniowania elektromagnetycznego, jak również jego właściwości absorpcyjne n' .

Przejściu fali elektromagnetycznej przez absorbujący ośrodek materialny towarzyszy zmniejszenie się jej energii, ze względu na straty wywołane absorpcją ośrodka. Zależą one od wartości współczynnika absorpcji ośrodka oraz drogi przebytej w nim przez promieniowanie elektromagnetyczne.

Absorpcja ma selektywny charakter, gdyż jest ona zależna od częstości promieniowania elektromagnetycznego, czyli jest to wielkość dyspersyjna.

Rozchodzeniu się promieniowania elektromagnetycznego w ośrodku towarzyszy pochłanianie energii, jak również opóźnienie fazowe wywołane przez różnicę współczynników załamania. W ośrodkach materialnych mamy do czynienia zarówno z modulacją amplitudy fal świetlnych, jak również ich fazy, a zmiany zależą od geometrii ośrodka oraz jego właściwości optycznych: współczynnika załamania oraz absorpcji.

3.4.1.4. Parametry fizyczne ilościowo charakteryzujące odbicie i załamanie światła

Wykorzystanie światła we wszelkiego rodzaju pomiarach optycznych, jak również w diagnostyce i terapii medycznej, wymaga uwzględnienia strat energii świetlnej. Problem ten jest istotny między innymi przy konstrukcji układów optycznych, gdyż konieczne jest uwzględnienie strat wywołanych odbiciami światła na powierzchniach elementów optycznych. Uwzględnić trzeba również właściwości absorpcyjne materiałów, z jakich wykonane są poszczególne elementy optyczne. W diagnostyce i terapii medycznej problem strat energii świetlnej również odgrywa ważną rolę, gdyż różnego rodzaju efekty terapeutyczne lub diagnostyczne wymagają dostarczenia do struktur biologicznych wiązek świetlnych o określonej gęstości energii, bo w zależności od dostarczonej energii świetlnej – dawki energii promieniowania świetlnego – możemy doprowadzić do efektów termicznych, fotochemicznych, biostymulacyjnych, ablacyjnych, bądź też kawitacyjnych. Dodatkowo należy podkreślić, iż różnego rodzaju struktury biologiczne charakteryzują się silną anizotropią struktury

ralną oraz anizotropią przestrzenną właściwości optycznych np. współczynnika załamania lub też współczynnika absorpcji, od których uzależnione są straty energii promieniowania świetlnego. W niniejszym podrozdziale opisane zostaną podstawowe wielkości fizyczne pozwalające w ilościowy sposób scharakteryzować właściwości odbiciowe oraz transmisyjne badanych obiektów.

W wyniku odbicia światła od powierzchni granicznej wiązka świetlna może tracić od kilku do kilkunastu procent swojej wejściowej wartości energii. Jednocześnie propagacja światła w ośrodku prowadzić może również do osłabienia wiązki świetlnej, spowodowanego absorpcją w ośrodku. W optyce do opisanego zarówno właściwości odbiciowych, jak i transmisyjnych stosuje się amplitudowe, bądź też energetyczne współczynniki odbicia oraz transmisji, które wyznacza się na podstawie równań Fresnela.

3.4.1.4.1. Amplitudowe współczynniki odbicia i transmisji

Określenie współczynników amplitudowych związane jest z bezpośrednim porównaniem amplitud fal świetlnych padających na powierzchnię graniczną dwóch ośrodków z amplitudami fal odbitych bądź też załamanych, które uwzględniają również polaryzację. Współczynniki te zostały częściowo wprowadzone już wcześniej (patrz podrozdział 3.2.2), lecz w celu przeprowadzenia kompleksowej analizy zostaną one tutaj przypomniane. W pierwszej kolejności założymy, iż fala świetlna pada na ośrodek, który jest optycznie gęstszy niż ośrodek, w którym się ona początkowo rozchodzi ($n_2 > n_1$). W tym przypadku na powierzchni granicznej zachodzić będzie odbicie zewnętrzne.

Amplitudowy współczynnik odbicia r opisany jest przez stosunek amplitudy fali odbitej E_{odb} od powierzchni rozgraniczającej dwa ośrodki o różnych współczynnikach załamania do amplitudy fali padającej E_{pad} na tę powierzchnię:

$$r = \frac{E_{\text{odb}}}{E_{\text{pad}}}. \quad (101)$$

W przypadku światła spolaryzowanego wyróżnić możemy dwa amplitudowe współczynniki odbicia r_{\perp} , r_{\parallel} odnoszące się odpowiednio do składowej wektora natężenia pola elektrycznego drgającego w płaszczyźnie prostopadłej i równoległej do płaszczyzny padania. Przypomnijmy, że płaszczyzna padania jest wyznaczona przez normalną do powierzchni rozgraniczającej dwa ośrodki oraz kierunki wektorów falowych fali padającej oraz odbitej. Zgodnie z relacjami Fresnela współczynniki te opisane są następującymi zależnościami:

$$r_{\perp} = \left(\frac{E_{\text{odb}}}{E_{\text{pad}}} \right)_{\perp} = \frac{n_1 \cos \theta_{\text{pad}} - n_2 \cos \theta_{\text{zał}}}{n_1 \cos \theta_{\text{pad}} + n_2 \cos \theta_{\text{zał}}}, \quad (102)$$

$$r_{\parallel} = \left(\frac{E_{\text{oddb}}}{E_{\text{pad}}} \right)_{\parallel} = \frac{n_2 \cos \theta_{\text{pad}} - n_1 \cos \theta_{\text{zał}}}{n_1 \cos \theta_{\text{zał}} + n_2 \cos \theta_{\text{pad}}}, \quad (103)$$

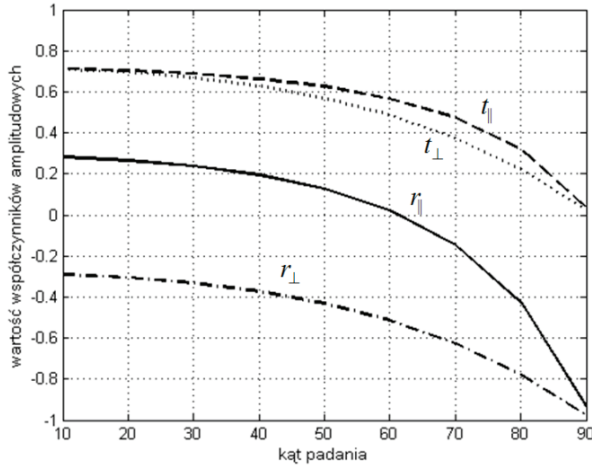
gdzie E_{pad} , E_{oddb} są amplitudami wektora natężenia pola elektrycznego odpowiednio wiązki padającej i odbitej, θ_{pad} , $\theta_{\text{zał}}$ kątami padania i załamania wiązki świetlnej, a n_1 , n_2 współczynnikami załamania odpowiednio ośrodka wejściowego oraz ośrodka, na który pada wiązka świetlna. Po uwzględnieniu prawa załamania powyższe zależności mogą być uproszczone do postaci:

$$r_{\perp} = -\frac{\sin(\theta_{\text{pad}} - \theta_{\text{zał}})}{\sin(\theta_{\text{pad}} + \theta_{\text{zał}})}, \quad (104)$$

$$r_{\parallel} = \frac{\tan(\theta_{\text{pad}} - \theta_{\text{zał}})}{\tan(\theta_{\text{pad}} + \theta_{\text{zał}})}. \quad (105)$$

Znak „-” w wyrażeniu (104) związany jest z przyjętą konwencją znaków opisujących kierunki drgania wektora natężenia pola elektrycznego w stosunku do płaszczyzny padania. Innymi słowy oznacza to, iż prostopadła do płaszczyzny padania składowa wektora natężenia pola elektrycznego fali padającej w wyniku odbicia doznaje przesunięcia w fazie o wartość π radianów, gdy ośrodek, w którym rozchodzi się fala świetlna po załamaniu na powierzchni granicznej, ma większy współczynnik załamania światła niż współczynnik załamania ośrodka, w którym początkowo propagowała. Innymi słowy mamy do czynienia ze zmianą zwrotu drgań składowej prostopadłej wektora natężenia pola elektrycznego. W przypadku amplitudowego współczynnika odbicia składowej równoległej do płaszczyzny padania dla pewnego obszaru kątów, jego wartość jest dodatnia (patrz rys. 3.15). Jednakże, gdy $\theta_{\text{pad}} + \theta_{\text{zał}} = 90^\circ$, wówczas wiązka odbita i załamana są do siebie prostopadłe, a dodatkowo nie będzie fali odbitej o składowej wektora natężenia pola elektrycznego równoległego do płaszczyzny padania. Z analizy przeprowadzonej w podrozdziale 3.2.2, dotyczącym polaryzacji światła, widzimy, iż wartość współczynnika r_{\parallel} jest dodatnia dla zakresu kąтового rozpoczynającego się od kąta padania równego 0° aż do pewnego granicznego kąta θ_p , dla którego współczynnik ten przyjmuje wartość równą zero. Kąt ten określa się mianem kąta Brewstera lub też kąta polaryzacji (np. dla $n_2/n_1 = 1,5 - \theta_p^\circ = 56,3^\circ$). W tym przypadku światło odbite od powierzchni granicznej nie zawiera składowej wektora natężenia pola elektrycznego równoległej do płaszczyzny padania i jest ono całkowicie spolaryzowane liniowo. Dla kątów padania większych niż θ_p współczynnik przyjmuje wartości coraz bardziej ujemne. Ujemna wartość oznacza, że składowa wektora natężenia pola elektrycznego rów-

noległa do płaszczyzny padania w wyniku odbicia doznaje przesunięcia w fazie o wartość π radianów.



Rys. 3.15. Zależność amplitudowych współczynników odbicia oraz transmisji od kąta padania światła na granicę ośrodków o współczynnikach załamania ($n_1 = 1$; $n_2 = 1,8$)

Amplitudowy współczynnik transmisji opisany jest przez stosunek amplitudy fali załamanej $E_{\text{zał}}$ na powierzchni rozgraniczającej dwa ośrodki o różnych współczynnikach załamania do amplitudy fali padającej E_{pad} na tę powierzchnię:

$$t = \frac{E_{\text{zał}}}{E_{\text{pad}}} \quad (106)$$

Podobnie, jak w przypadku amplitudowego współczynnika odbicia, w przypadku światła spolaryzowanego, wyróżnić można dwa amplitudowe współczynniki transmisji t_{\perp} , t_{\parallel} odnoszące się odpowiednio do składowej wektora natężenia pola elektrycznego drgającego w płaszczyźnie prostopadłej, bądź też równoległej do płaszczyzny padania. Zgodnie z relacjami Fresnela współczynniki te opisane są następującymi zależnościami:

$$t_{\perp} = \left(\frac{E_{\text{zał}}}{E_{\text{pad}}} \right)_{\perp} = \frac{2n_1 \cos \theta_{\text{pad}}}{n_1 \cos \theta_{\text{pad}} + n_2 \cos \theta_{\text{zał}}}, \quad (107)$$

$$t_{\parallel} = \left(\frac{E_{\text{zał}}}{E_{\text{pad}}} \right)_{\parallel} = \frac{2n_1 \cos \theta_{\text{pad}}}{n_1 \cos \theta_{\text{zał}} + n_2 \cos \theta_{\text{pad}}}, \quad (108)$$

gdzie sens fizyczny poszczególnych wielkości fizycznych jest taki sam, jak w przypadku amplitudowych współczynników odbicia.

Również w tym przypadku, powyższe zależności można uprościć, korzystając z prawa załamania tak, iż otrzymujemy:

$$t_{\perp} = \frac{2 \sin \theta_{\text{zał}} \cos \theta_{\text{pad}}}{\sin(\theta_{\text{pad}} + \theta_{\text{zał}})}, \quad (109)$$

$$t_{\perp} = \frac{2 \sin \theta_{\text{zał}} \cos \theta_{\text{pad}}}{\sin(\theta_{\text{pad}} + \theta_{\text{zał}}) \cos(\theta_{\text{pad}} - \theta_{\text{zał}})}. \quad (110)$$

Analizując rys. 3.15, widzimy, iż wartości amplitudowych współczynników transmisji obu składowych fali świetlnej, prostopadłej i równoległej do płaszczyzny padania, przyjmują wartości dodatnie z przedziału $\langle 0, 1 \rangle$. Dzieje się tak, ponieważ w przypadku transmisji – przechodzenia światła do drugiego ośrodka, nie mamy do czynienia ze zmianą zwrotu wektora natężenia pola elektrycznego wiązki transmitowanej w stosunku do zwrotu wektora natężenia pola elektrycznego wiązki padającej. Jednocześnie wartość zero odpowiada sytuacji, gdy fala padająca na granicę ośrodków jest całkowicie odbijana, podczas gdy wartość tego współczynnika jest równa jeden, fala padająca rozchodzi się jedynie w drugim ośrodku, ponieważ nie mamy tu do czynienia z odbiciem światła. Wartość amplitudowego współczynnika transmisji przyjmuje maksymalną wartość dla $\theta_{\text{pad}} = 0^\circ$, czyli dla wiązki normalnie padającej na powierzchnię graniczną, co jest zrozumiałe, gdyż w tym przypadku amplitudowy współczynnik odbicia przyjmuje wartość minimalną. Wraz ze wzrostem wartości kąta padania amplitudowy współczynnik transmisji maleje tak, iż w granicznym przypadku dla kąta padania równego 90° jest on równy zero. W tym przypadku cała część światła padającego na granicę dwóch ośrodków zostaje odbita od ich powierzchni rozgraniczającej. Tym samym wraz ze wzrostem kąta padania wiązki świetlnej na powierzchni granicznej maleje natężenie światła rozchodzącego się w drugim ośrodku.

Rozpatrzmy teraz pewne szczególne przypadki zależne od wartości kąta padania oraz stosunku współczynników załamania ośrodków. Gdy kąt padania w stosunku do normalnej do powierzchni granicznej zbliża się do 0° , wówczas wyrażenie (105) upraszcza się, zatem ostatecznie otrzymujemy zależność:

$$r_{\parallel} \Big|_{\theta_{\text{pad}}=0} = -r_{\perp} \Big|_{\theta_{\text{pad}}=0} = \frac{\sin(\theta_{\text{pad}} - \theta_{\text{zał}})}{\sin(\theta_{\text{pad}} + \theta_{\text{zał}})} \Big|_{\theta_{\text{pad}}=0}. \quad (111)$$

Powyższa równość amplitudowych współczynników odbicia spowodowana jest tym, że dla $\theta_{\text{pad}} = 0^\circ$ płaszczyzna padania nie jest już definiowalna, dlatego też współczynnik ten jest równy $\pm r$, gdzie $r = r_{\parallel} \Big|_{\theta_{\text{pad}}=0} = -r_{\perp} \Big|_{\theta_{\text{pad}}=0}$.

Dodatkowo, odwołując się do bardziej ogólnej postaci amplitudowych współczynników odbicia (102) i (103) uzyskujemy:

$$r_{\parallel} \Big|_{\theta_{\text{pad}}=0^{\circ}} = -r_{\perp} \Big|_{\theta_{\text{pad}}=0^{\circ}} = \frac{n_2 \cos \theta_{\text{pad}} - n_1 \cos \theta_{\text{zał}}}{n_1 \cos \theta_{\text{zał}} + n_2 \cos \theta_{\text{pad}}} \Big|_{\theta_{\text{pad}}=0^{\circ}}, \quad (112)$$

zatem, gdy $\theta_{\text{pad}} \rightarrow 0^{\circ}$, wówczas $\cos \theta_{\text{pad}} \rightarrow 1$ oraz $\cos \theta_{\text{zał}} \rightarrow 1$, powyższa zależność upraszcza się do następującej postaci:

$$r_{\parallel} \Big|_{\theta_{\text{pad}}=0^{\circ}} = -r_{\perp} \Big|_{\theta_{\text{pad}}=0^{\circ}} = \frac{n_2 - n_1}{n_1 + n_2}. \quad (113)$$

W przypadku wiązki świetlnej prostopadle padającej na granicę ośrodków, zależności opisujące amplitudowe współczynniki transmisji upraszczają się tak, iż otrzymujemy:

$$t_{\parallel} \Big|_{\theta_{\text{pad}}=0^{\circ}} = -t_{\perp} \Big|_{\theta_{\text{pad}}=0^{\circ}} = \frac{2n_1}{n_1 + n_2}. \quad (114)$$

Widzimy zatem, iż w tym przypadku oba współczynniki zależą bezpośrednio od współczynnika załamania światła ośrodka, w którym początkowo rozchodzi się światło oraz od współczynnika załamania światła ośrodka, na który to światło pada. Jednocześnie widzimy, iż znając przynajmniej jeden ze współczynników załamania światła na podstawie wartości amplitudowych współczynników odbicia lub transmisji możemy w tym przypadku wyznaczyć drugi współczynnik załamania światła, co jest powszechnie wykorzystywane w pomiarach optycznych. Wzajemne relacje wiążące amplitudowe współczynniki odbicia i transmisji możemy scharakteryzować następująco:

- dla składowych wektora natężenia pola elektrycznego prostopadłych do płaszczyzny padania i dla wszystkich kątów padania prawdziwa jest relacja:

$$t_{\perp} + (-r_{\perp}) = 1, \quad (115)$$

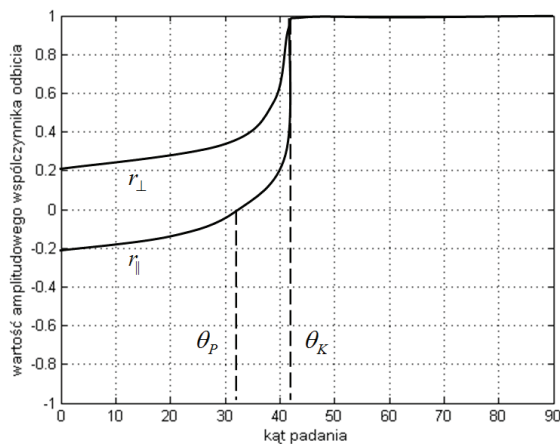
- dla składowych wektora natężenia pola elektrycznego równoległych do płaszczyzny padania dla $\theta_{\text{pad}} = 0^{\circ}$ prawdziwa jest relacja:

$$t_{\parallel} + r_{\parallel} = 1. \quad (116)$$

Powyższe relacje są wyrazem zasady zachowania energii, gdyż w sytuacji, gdy w rozważanych ośrodkach nie następuje pochłanianie energii propagujących w nich wiązek świetlnych, suma energii niesionej przez wiązkę odbitą, jak również wiązkę załamaną i transmitowaną w drugim ośrodku jest równa energii wiązki padającej na granicę ośrodków o różnych współczynnikach załamania.

Omawiane przypadki ograniczały się do analizy odbicia zewnętrznego, gdy ośrodek, na który pada fala świetlna jest optycznie gęstszy niż ośrodek, w którym się ona początkowo rozchodzi ($n_2 > n_1$). Inaczej jest natomiast, gdy mamy do czynienia z odbiciem wewnętrznym tzn. gdy wiązka padająca na granicę ośrodków rozchodzi się początko-

wo w ośrodku gęstszym optycznie niż ośrodek, na który pada ($n_2 < n_1$) np. $n_1 = 1,5$, $n_2 = 1$, wówczas $\theta_{\text{zał}} > \theta_{\text{pad}}$. Przypadek ten jest często analizowany w kontekście propagacji światła np. we włóknach światłowodowych. W tym przypadku, w odróżnieniu od odbicia zewnętrznego, wyrażenie (104) opisujące r_{\perp} przyjmuje zawsze wartości dodatnie (patrz rys. 3.16), zatem nie mamy do czynienia ze zmianą zwrotu wektora natężenia pola elektrycznego, czyli przesunięciem fazowym o π radianów w stosunku do wektora natężenia pola elektrycznego wiązki padającej na granicę ośrodków. Dla kątów większych od kąta krytycznego θ_K , dla którego kąt załamania jest równy 90° , wartość tego współczynnika jest równa jedności. Dla wartości $\theta_{\text{pad}} > \theta_K$ przesunięcie fazowe pomiędzy wektorami natężenia wiązki odbitej i padającej stopniowo wzrasta tak, iż osiąga wartość równą π radianów dla $\theta_{\text{pad}} = 90^\circ$.



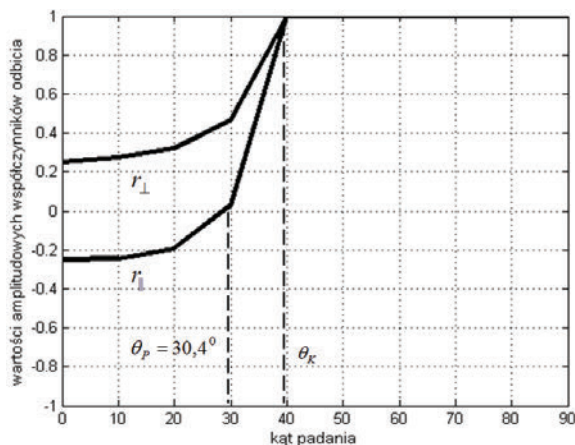
Rys. 3.16. Zależność amplitudowych współczynników odbicia od kąta padania na granicy ośrodków o współczynnikach załamania $n_1 = 1,5$, $n_2 = 1$

Z kolei współczynnik r_{\parallel} przyjmuje początkowo wartości ujemne i dla $\theta_{\text{pad}} = 0^\circ$ jest on równy $-r_{\perp}(\theta_{\text{pad}} = 0^\circ)$. Dla większych kątów padania współczynnik ten wzrasta tak, iż wartość równą zero przyjmuje dla kąta Brewstera (w naszym przypadku $n_1 = 1,5$, $n_2 = 1$: $\theta_p = 33,7^\circ$), a następnie od pewnego kąta krytycznego, podobnie jak w przypadku współczynnika r_{\perp} , jest on równy jedności. Widzimy zatem, iż w zakresie kątów $\theta_{\text{pad}} = \langle 0^\circ, \theta_p \rangle$ mamy do czynienia ze zmianą zwrotu wektora natężenia pola elektrycznego w stosunku do wiązki padającej na granicę ośrodków.

W zakresie $\theta_{\text{pad}} = \langle \theta_p, \theta_K \rangle$ jest ono równe zero, a następnie dla $\theta_{\text{pad}} > \theta_K$ przesunięcie fazowe pomiędzy wektorami natężenia wiązki odbitej i padającej stopniowo wzrasta tak, iż osiąga wartość równą π radianów dla $\theta_{\text{pad}} = 90^\circ$.

Warto zauważyć, iż kąty Brewstera w przypadku wewnętrznego θ_p° i zewnętrznego θ_p odbicia na granicy tych samych ośrodków są komplementarne, czyli $\theta_p^\circ = 90 - \theta_p$. Podobnie jest podczas wewnętrznego odbicia na granicy dwóch ośrodków o innych współczynnikach załamania np.: $n_1 = 1,7$; $n_2 = 1$ (patrz rys. 3.17).

Widzimy wówczas, że zmieniają się jedynie początkowe wartości amplitudowych współczynników odbicia dla $\theta_{\text{pad}} = 0^\circ$. Zmienia się też wartość kąta Brewstera, dla którego $r_{\parallel} = 0$ oraz wartość kąta krytycznego. Wraz ze wzrostem różnicy współczynników załamania kąty te maleją.



Rys. 3.17. Zależność amplitudowych współczynników odbicia od kąta padania na granicy ośrodków o współczynnikach załamania $n_1 = 1,7$, $n_2 = 1$

Analizowane przypadki odbicia wewnętrznego i zewnętrznego można odnieść do przypadku odbicia światła na powierzchniach granicznych np. płytki płasko-równoległej o współczynniku załamania n_2 umieszczonej w ośrodku o współczynniku załamania n_1 ($n_2 > n_1$). Wówczas odbicie zewnętrzne zachodzi na pierwszej powierzchni granicznej, a odbicie wewnętrzne na drugiej, wyjściowej powierzchni granicznej płytki.

Wraz ze wzrostem kąta padania wiązki świetlnej na powierzchnię graniczną maleje natężenie światła rozchodzącego się w ośrodku.

Odbicie zewnętrzne zachodzi, gdy ośrodek, na który pada fala świetlna jest optycznie gęstszy niż ośrodek, w którym się ona początkowo rozchodzi ($n_2 > n_1$).

Odbicie wewnętrzne zachodzi, gdy wiązka padająca na granicę ośrodków rozchodzi się początkowo w ośrodku gęstszym optycznie niż ośrodek, na który pada ($n_2 < n_1$).

W przypadku odbicia zewnętrznego amplitudowy współczynnik odbicia r_{\perp} rośnie wraz ze wzrostem kąta padania. Amplitudowy współczynnik odbicia r_{\parallel} początkowo maleje wraz ze wzrostem kąta padania tak, iż osiąga minimum dla kąta Brewstera, a następnie wzrasta wraz ze wzrostem kąta padania.

Dla kąta padania równego kątowi Brewstera światło odbite od powierzchni granicznej nie zawiera składowej wektora natężenia pola elektrycznego równoległej do płaszczyzny padania i jest ono całkowicie spolaryzowane liniowo.

Ujemne wartości amplitudowych współczynników odbicia oznaczają, że składowe wektora natężenia pola elektrycznego w wyniku odbicia doznają przesunięcia w fazie o wartość π radianów.

W przypadku odbicia wewnętrznego amplitudowy współczynnik odbicia r_{\perp} przyjmuje zawsze wartości dodatnie. Dla kątów większych od kąta krytycznego θ_K , wartość tego współczynnika jest równa jedności. Z kolei współczynnik r_{\parallel} przyjmuje początkowo wartości ujemne i dla $\theta_{\text{pad}} = 0^\circ$ jest on równy $-r_{\perp}(\theta_{\text{pad}} = 0^\circ)$. Dla większych kątów padania współczynnik ten wzrasta tak, iż wartość równą zero przyjmuje dla kąta Brewstera, a następnie od pewnego kąta krytycznego, podobnie jak w przypadku współczynnika r_{\perp} , jest on równy jedności.

Dla wiązek rozchodzących się w przeciwnych kierunkach i padających na granicy ośrodków o różnych współczynnikach załamania, kąty Brewstera w przypadku wewnętrznego θ_p° i zewnętrznego θ_p odbicia na granicy tych samych ośrodków są komplementarne, czyli $\theta_p^\circ = 90 - \theta_p$.

3.4.1.4.2. Energetyczne współczynniki odbicia i transmisji

Zdefiniowane wcześniej amplitudowe współczynniki odbicia i załamania mogą być z powodzeniem wykorzystane do charakteryzacji właściwości transmisyjno-odbiciowych badanych obiektów, jednakże odnoszą się one do stosunków amplitud odpowiednich fal świetlnych podczas, gdy w praktyce pomiarowej wielkości te są niemierzalne. Bezpośrednie pomiary transformacji światła na obiektach odnoszą się do pomiaru natężenia fal świetlnych, czyli kwadratu ich amplitud lub innymi słowy parametrów energetycznych, charakteryzujących wiązkę świetlną lub też oświetlaną powierzchnię. Oznacza to, iż powszechnie stosowane w optyce detektory rejestrują bezpośrednio natężenie wiązek transmitowanych przez ośrodek lub też odbitych od jego powierzchni, a pośrednio ich amplitudę. Dopiero po zmierzeniu natężenia wiązki możliwe jest określenie współczynników amplitudowych. Widzimy zatem, iż z prak-

tycznego punktu widzenia konieczne jest wprowadzenie i zdefiniowanie nowych energetycznych współczynników odbicia i transmisji, które powszechnie określane są odpowiednio mianem reflektancji i transmitancji. Parametry te możemy zdefiniować jako stosunki kwadratów amplitud odpowiednich wiązek świetlnych lub też stosunek mocy promienistych (strumieni energii) tych wiązek, bądź też poprzez stosunek natężenia tych wiązek.

Z poprzedniego podrozdziału wiemy, iż amplitudowy współczynnik odbicia jest równy zeru dla $\theta_{\text{pad}} = 90^\circ$, z kolei dla kąta padania równego $\theta_{\text{pad}} = 0^\circ$ amplitudowy współczynnik transmisji jest równy zero. Z tego też powodu poniżej analizować będziemy pośrednie kąty padania tak, aby oba współczynniki pozostały niezerowe.

Jeżeli na granicę ośrodków pod kątem θ_{pad} pada wiązka świetlna o kołowym przekroju poprzecznym, wówczas oświetlona powierzchnia odpowiada już kształtem przekrojowi poprzecznemu samej wiązki, lecz ma kształt elipsy, której oś długa jest zależna od wartości kąta padania wiązki. Zatem wycinek oświetlonej powierzchni granicznej ma pole powierzchni P , a kierunki rozchodzenia się wiązki odbitej i załamanej są określone zgodnie z prawem załamania i odbicia światła, odpowiednio przez kąty $\theta_{\text{zał}}$ oraz θ_{odb} , wówczas, jeśli znane są wartości natężenia kolejnych wiązek: $I_0, I_{\text{odb}}, I_{\text{zał}}$, to efektywne przekroje poprzeczne odpowiednich wiązek wynoszą $P \cos \theta_{\text{pad}}, P \cos \theta_{\text{odb}}, P \cos \theta_{\text{zał}}$. Moc promienista (strumień energii), czyli ilość energii przepływająca w jednostce czasu jest równa odpowiednio $I_{\text{pad}} P \cos \theta_{\text{pad}}, I_{\text{odb}} P \cos \theta_{\text{odb}}, I_{\text{zał}} P \cos \theta_{\text{zał}}$.

Widzimy zatem, iż energetyczny współczynnik odbicia możemy zdefiniować jako stosunek parametrów energetycznych wiązki odbitej do parametrów energetycznych wiązki padającej:

$$R \equiv \frac{I_{\text{odb}} P \cos \theta_{\text{odb}}}{I_{\text{pad}} P \cos \theta_{\text{pad}}} \stackrel{\theta_{\text{pad}} = \theta_{\text{odb}}}{=} \frac{I_{\text{odb}}}{I_{\text{pad}}}. \quad (117)$$

Natężenie światła jest równe uśrednionemu czasowo wektorowi Poytinga, zatem $I = (V_n \varepsilon_n / 2) E^2$. Ponieważ wiązka odbita oraz padająca propagują w tym samym ośrodku, więc $V_{n1} = V_{n2}$, $\varepsilon_{n1} = \varepsilon_{n2}$. Dodatkowo zakładając, że $\mu_0 = \mu = 1$, stosunek natężenia tych wiązek możemy zapisać w następujący sposób:

$$R \equiv \frac{I_{\text{odb}}}{I_{\text{pad}}} = \frac{0,5 V_{n1} \varepsilon_{n1} E_{\text{odb}}^2}{0,5 V_{n2} \varepsilon_{n2} E_{\text{pad}}^2} = \frac{0,5 V_{n1} \varepsilon_{n1} E_{\text{odb}}^2}{0,5 V_{n1} \varepsilon_{n1} E_{\text{pad}}^2} = \left(\frac{E_{\text{odb}}}{E_{\text{pad}}} \right)^2 = r^2. \quad (118)$$

Energetyczny współczynnik odbicia R (reflektancja) jest zatem równy stosunkowi kwadratu amplitudy fali odbitej do padającej lub inaczej – jest równy kwadratowi amplitudowego współczynnika odbicia.

Jeżeli natomiast będziemy analizować wiązkę załamana, rozchodzącą się w ośrodku o współczynniku załamania n_2 , wówczas natężenie wiązki wyjściowej jest określone przez energetyczny współczynnik transmisji T , wyrażony następująco:

$$T \equiv \frac{I_{\text{zał}} P \cos \theta_{\text{zał}}}{I_{\text{pad}} P \cos \theta_{\text{pad}}}. \quad (119)$$

Ponieważ wiązka padająca i załamana znajdują się w ośrodkach o różnych współczynnikach załamania, zatem pamiętając, że $V_{n1}/V_{n2} = n_2/n_1$ oraz $n_i = \sqrt{\varepsilon_i}$ powyższe równanie możemy przekształcić w następujący sposób:

$$T \equiv \frac{I_{\text{zał}} P \cos \theta_{\text{zał}}}{I_{\text{pad}} P \cos \theta_{\text{pad}}} = \frac{0,5V_{n1} \varepsilon_1 \cos \theta_{\text{zał}} \left(\frac{E_{\text{zał}}}{E_{\text{pad}}} \right)^2}{0,5V_{n2} \varepsilon_2 \cos \theta_{\text{pad}}} = \frac{n_2 n_1^2 \cos \theta_{\text{zał}} \left(\frac{E_{\text{zał}}}{E_{\text{pad}}} \right)^2}{n_1 n_2^2 \cos \theta_{\text{pad}}}. \quad (120)$$

Ostatecznie więc otrzymujemy:

$$T = \frac{n_1 \cos \theta_{\text{zał}} \left(\frac{E_{\text{zał}}}{E_{\text{pad}}} \right)^2}{n_2 \cos \theta_{\text{pad}}} = \frac{n_1 \cos \theta_{\text{zał}}}{n_2 \cos \theta_{\text{pad}}} t^2. \quad (121)$$

Energetyczny współczynnik transmisji T (transmitancja) jest zatem równy stosunkowi kwadratów amplitud fal załamanej i padającej, który dodatkowo jest zależny od współczynników załamania ośrodków, w jakich fale propagują oraz kosinusów kątów, definiujących kierunek ich rozchodzenia się. Jest on również proporcjonalny do kwadratu amplitudowego współczynnika transmisji. Współczynnik ten przyjęto również określać mianem transmitancji. Dodatkowo zależność powyższego wyrażenia od współczynników załamania oraz kątów załamania i padania, jest spowodowana faktem, iż w ośrodkach tych energia jest transportowana z różną prędkością, a inny kierunek rozchodzenia się wiązek w tych ośrodkach sprawia, że obie wiązki mają inne przekroje poprzeczne.

Warto dodatkowo zauważyć, że w przypadku wiązki padającej normalnie do powierzchni granicznej oba współczynniki reflektancji oraz transmitancji są stosunkami natężenia odpowiednich wiązek świetlnych – odbitej i padającej oraz załamanej i padającej. Ponieważ zgodnie z zasadą zachowania energii, strumień energii wiązki padającej jest równy sumie strumieni energii wiązki odbitej i załamanej, zatem w łatwy sposób można pokazać, że:

$$R + T = 1 \quad (122)$$

przy założeniu, że nie ma strat energii promienistej spowodowanej absorpcją światła w ośrodku.

Uwzględniając polaryzację światła poszczególnych prostopadłych oraz równoległych do płaszczyzny padania składowych wektora natężenia pola elektrycznego

wiązek świetlnych, powyższe współczynniki energetyczne możemy zapisać w następująco:

$$R_{\perp} = r_{\perp}^2, \quad (123)$$

$$R_{\parallel} = r_{\parallel}^2, \quad (124)$$

$$T_{\perp} = \left(\frac{n_2 \cos \theta_{\text{zał}}}{n_1 \cos \theta_{\text{pad}}} \right) t_{\perp}^2, \quad (125)$$

$$T_{\parallel} = \left(\frac{n_2 \cos \theta_{\text{zał}}}{n_1 \cos \theta_{\text{pad}}} \right) t_{\parallel}^2. \quad (126)$$

Jednocześnie podobnie, jak w ogólnym przypadku:

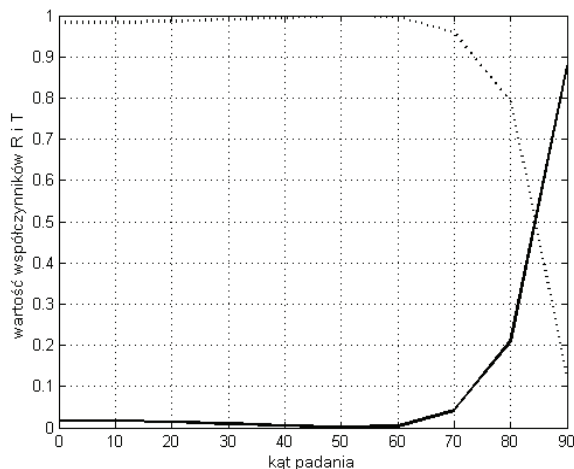
$$R_{\parallel} + T_{\parallel} = 1, \quad (127)$$

$$R_{\perp} + T_{\perp} = 1. \quad (128)$$

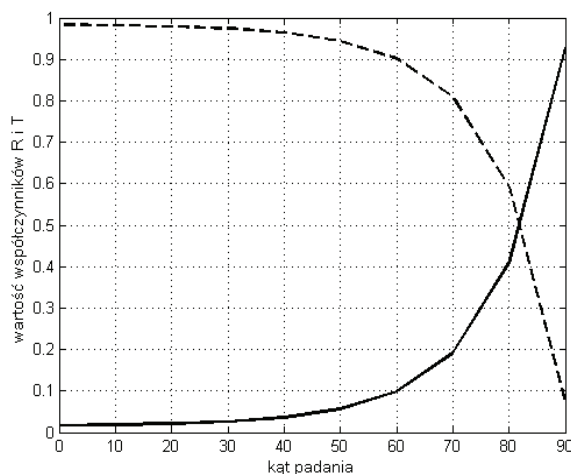
Przykładowe zależności energetycznych współczynników odbicia i transmisji dla obu składowych prostopadłych oraz równoległych do płaszczyzny padania, dla ośrodków o współczynnikach załamania $n_1 = 1$ oraz $n_2 = 1,9$, zostały przedstawione na rys. 3.18 oraz rys. 3.19.

Widać, że wraz ze wzrostem kąta padania maleje współczynnik T_{\perp} , współczynnik R_{\perp} rośnie. Jednocześnie widzimy, iż dla składowych fali równoległych do płaszczyzny padania zachodzą zależności, omówione wcześniej w przypadku współczynników amplitudowych.

Wartość współczynnika R_{\parallel} początkowo rośnie dla $\theta_{\text{pad}} > 0^\circ$, następnie maleje i spada do zera, co ma miejsce dla kąta padania równego kątowi Brewstera oraz znowu rośnie do wartości granicznej dla kąta padania równego 90° . Jednocześnie wartość współczynnika T_{\parallel} stopniowo rośnie wraz ze wzrostem wartości kąta padania tak, iż współczynnik ten przyjmuje wartość maksymalną dla kąta Brewstera, a następnie dąży do minimum. Jest to zrozumiałe, gdyż w tym przypadku składowa równoległa do płaszczyzny padania nie jest odbijana, lecz w całości wnika do drugiego ośrodka. Proces ten jest odzwierciedleniem zasady zachowania energii. Z kolei w przypadku współczynników R_{\perp} , T_{\perp} mamy do czynienia z odwrotnie proporcjonalnymi zmianami tych parametrów tzn. wzrostem współczynnika odbicia oraz spadkiem współczynnika transmisji dla rosnących wartości kąta padania. Jednocześnie dla $\theta_{\text{pad}} = 0^\circ$ współczynnik transmisji przyjmuje wartość maksymalną, a dla $\theta_{\text{pad}} = 90^\circ$ maksymalną wartość osiąga współczynnik odbicia.



Rys. 3.18. Zależność współczynników R_{\parallel} (linia ciągła) oraz T_{\parallel} (linia przerywana) od kąta padania wiązki świetlnej na granicę ośrodków o współczynnikach załamania $n_1 = 1$, $n_2 = 1,9$

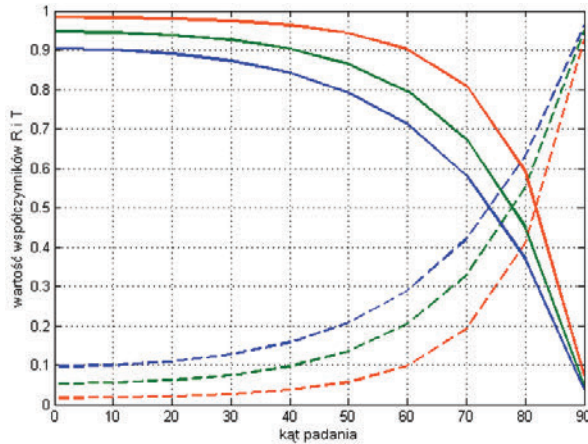


Rys. 3.19. Zależność współczynników R_{\perp} (linia ciągła) oraz T_{\perp} (linia przerywana) od kąta padania wiązki świetlnej na granicę ośrodków o współczynnikach załamania $n_1 = 1$, $n_2 = 1,9$

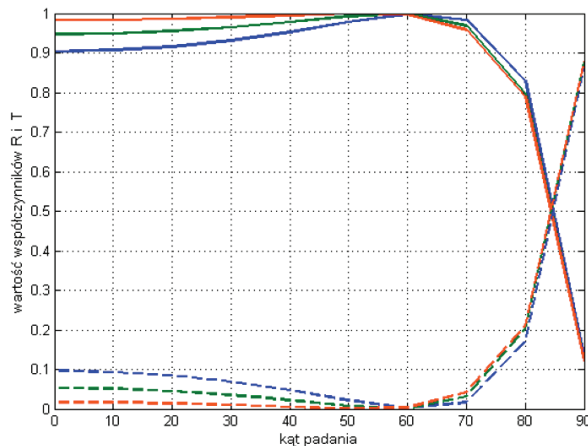
Widzimy zatem, iż w tym przypadku przebiegi kątowe obu współczynników ulegają odwrotnie proporcjonalnym zmianom, co również związane jest z zasadą zachowania energii. Jeżeli rośnie refleksja, wówczas znaczna część energii jest niesiona przez fale odbite, a transmitancja wtedy maleje.

Wartości omawianych wielkości zależą od różnicy współczynników załamania ośrodków, na których powierzchnię graniczną pada światło (patrz rys. 3.20 oraz rys. 3.21). W sytuacji, gdy światło przechodzi z ośrodka o mniejszym współczynniku załamania do ośrodka o większym współczynniku załamania, wraz ze wzrostem różnicy

współczynników załamania, rośnie wartość reflektancji, a maleje wartość transmitancji światła w ośrodku o wyższym współczynniku załamania dla obu składowych wiązki świetlnej prostopadłych i równoległych do płaszczyzny padania. Jednocześnie w przypadku składowej równoległej do płaszczyzny padania (patrz rys. 3.21), odpowiadające jej charakterystyki kątowe reflektancji oraz transmitancji zmieniają się, gdyż mamy do czynienia ze zmianą wartości kąta Brewstera, który jest w bezpośredni sposób zależny od stosunku współczynników załamania obu ośrodków.



Rys. 3.20. Zależność współczynników R_{\perp} (linia przerywana) oraz T_{\perp} (linia ciągła) od kąta padania wiązki oraz różnego stosunku współczynników załamania ośrodków: $n_1 = 1, n_2 = 1,9$ (linie niebieskie), $n_1 = 1, n_2 = 1,6$ (linie zielone), $n_1 = 1, n_2 = 1,3$ (linie czerwone)



Rys. 3.21. Zależność współczynników R_{\parallel} (linia przerywana) oraz T_{\parallel} (linia ciągła) od kąta padania wiązki oraz różnego stosunku współczynników załamania ośrodków: $n_1 = 1, n_2 = 1,9$ (linie niebieskie), $n_1 = 1, n_2 = 1,6$ (linie zielone), $n_1 = 1, n_2 = 1,3$ (linie czerwone)

Warto również zauważyć, że dla normalnego padania wiązki świetlnej na powierzchnię graniczną, możliwe jest uproszczenie zależności opisujących powyższe wielkości do następujących postaci:

$$R = R_{\perp} = R_{\parallel} = \left(\frac{n_2 - n_1}{n_2 + n_1} \right)^2, \quad (129)$$

$$T = T_{\perp} = T_{\parallel} = \frac{4n_1n_2}{(n_1 + n_2)^2}. \quad (130)$$

Dzięki znajomości wartości współczynników załamania tych ośrodków możliwe jest bezpośrednie określenie reflektancji oraz transmitancji światła, jak również strat energii świetlnej wiązki przechodzącej przez granicę ośrodków o różnych współczynnikach załamania.

Bezpośrednie pomiary transformacji światła na obiektach odnoszą się do pomiaru natężenia fal świetlnych, czyli kwadratu ich amplitud lub innymi słowy parametrów energetycznych, charakteryzujących wiązkę świetlną lub też oświetlaną powierzchnię. Z tego powodu, ze względów praktycznych do charakteryzacji właściwości odbiciowo-transmisyjnych wykorzystuje się energetyczne współczynniki odbicia i transmisji (reflektancję, transmitancję).

W przypadku współczynników R_{\perp} , T_{\perp} mamy do czynienia z odwrotnie proporcjonalnymi zmianami tych parametrów tzn. wzrostem reflektancji oraz spadkiem transmitancji dla rosnących wartości kąta padania. Jednocześnie dla $\theta_{\text{pad}} = 0^{\circ}$ transmitancja przyjmuje wartość maksymalną, a dla $\theta_{\text{pad}} = 90^{\circ}$ maksymalną wartość osiąga reflektancja.

W przypadku współczynnika R_{\parallel} jego wartość początkowo rośnie dla $\theta_{\text{pad}} > 0^{\circ}$, następnie maleje i spada do zera, co ma miejsce dla kąta padania równego kątowi Brewstera oraz znowu rośnie do wartości granicznej dla $\theta_{\text{pad}} = 90^{\circ}$.

Wartość współczynnika T_{\parallel} stopniowo rośnie wraz ze wzrostem wartości kąta padania tak, iż współczynnik ten przyjmuje wartość maksymalną dla kąta Brewstera, a następnie dąży do minimum.

Gdy światło przechodzi z ośrodka o mniejszym współczynniku załamania do ośrodka o większym współczynniku załamania, wraz ze wzrostem różnicy współczynników załamania pomiędzy tymi ośrodkami rośnie wartość reflektancji, a wartość transmitancji maleje.

3.5. Absorpcja promieniowania elektromagnetycznego oraz zjawisko luminescencji

W poprzednim podrozdziale poruszyliśmy problem strat energii fali świetlnej przechodzącej przez ośrodek materialny. Każdy ośrodek może być scharakteryzowany zespolonym współczynnikiem załamania (równanie (96)), który uwzględnia właściwości absorpcyjne ośrodka, w którym rozchodzi się światło. W ogólnym przypadku światło rozchodzące się w ośrodku materialnym traci część niesionej przez siebie energii w wyniku oddziaływania z atomami znajdującymi się w tym ośrodku. W wyniku tego procesu amplituda fali świetlnej ulega wykładniczemu osłabieniu (pierwszy człon równania (100)), które jest uzależnione od współczynnika absorpcji. Wzbudzenie ośrodka promieniowaniem świetlnym może prowadzić do emisji promieniowania (luminescencji), różnych reakcji fotochemicznych lub fototermicznych. W celu określenia strat energii świetlnej wywołanej rozchodzeniem się światła przez ośrodki o różnych współczynnikach załamania, których powierzchnie charakteryzują się różną geometrią oraz różnymi współczynnikami odbicia i transmisji, konieczne jest przeanalizowanie strat energii świetlnej uzależnionych od strat fresnelowskich na powierzchniach granicznych, łamiących, od współczynnika odbicia powierzchni odbiciowych oraz od przepuszczalności – transmitancji. Poniżej opisane zostaną zagadnienia omawiające podstawy fizyczne procesu absorpcji, ilościowej charakteryzacji tego zjawiska, jak również reemisji zaabsorbowanej energii świetlnej, czyli luminescencji, gdyż jest ona szeroko wykorzystywana w nowoczesnych technikach pomiarowych oraz diagnostycznych.

3.5.1. Absorpcja światła i jej opis ilościowy

W celu dokładnego opisu procesu absorpcji, odwołując się do korpuskularnej natury światła wykorzystanej przez Einsteina do wyjaśnienia zjawiska fotoelektrycznego zewnętrznego, oddziaływanie światła z materią rozpatrywać będziemy jako oddziaływanie fotonów z pojedynczymi atomami tworzącymi ośrodek. W tym ujęciu światło należy traktować jako strumień fotonów, czyli cząstek o zerowej masie niosących kwant energii promieniowania świetlnego. Energia pojedynczego fotonu jest bezpośrednio związana z częstotliwością drgań promieniowania elektromagnetycznego i może być opisana następującą zależnością:

$$E = h\nu = h \frac{c}{\lambda}, \quad (131)$$

gdzie h jest stałą Plancka ($h = 6,6260693 \cdot 10^{-34}$ Js), a ν częstotliwością promieniowania.

Zgodnie z zasadami mechaniki kwantowej obiekty materialne możemy traktować jako zbiór atomów o określonej strukturze elektronowej, która odpowiada za ich oddziaływanie ze światłem. W warunkach stacjonarnych każdy atom posiada tylko

pewne określone wartości energii, które mogą przyjmować związane elektrony. Elektrony te posiadają ujemne wartości energii, które są znacznie mniejsze niż wartość energii elektronów swobodnych o dodatniej energii. Widzimy zatem, iż aby elektron związany stał się elektronem swobodnym musimy dostarczyć mu dodatkowej energii.

Absorpcja energii świetlnej prowadzi do wzbudzenia atomów do wyższego stanu energetycznego, co zachodzi po spełnieniu tzw. warunku rezonansu, czyli możliwa jest jedynie absorpcja fotonów o energii dopasowanej do różnicy energii pomiędzy stanem podstawowym a wzbudzonym atomu. W wyniku wzbudzenia dojść może do różnych reakcji, np. do wytworzenia ciepła, zainicjowania reakcji fotochemicznych czy też luminescencji. Wzbudzenie atomów ośrodka możemy uzyskać na drodze chemicznej, elektrycznej, mechanicznej lub za pomocą promieniowania elektromagnetycznego. Substancje posiadające zdolność absorpcji promieniowania elektromagnetycznego nazywamy chromoforami. W przypadku tkanek do głównych absorberów zaliczyć można min. oksyhemoglobinę (O_2Hb), dezoksyhemoglobinę (Hb), wodę oraz melaninę, białka zawarte w kolagenie i elastynie, DNA oraz kwasy tłuszczowe [11].

Zdolność różnych obiektów fizycznych do absorpcji promieniowania elektromagnetycznego zależy od wielu czynników, głównie od struktury atomowej danego ośrodka, grubości warstwy absorbującej, długości fali, temperatury czy stężenia. W różnych ośrodkach obserwuje się pewne charakterystyczne dla nich cechy absorpcji. Gazy jednoatomowe absorbują promieniowanie bardzo selektywnie, dla ściśle określonych długości fal. Przy absorpcji przez cząstki występują zazwyczaj pasma absorpcji, czyli zespoły wielu bliskich linii widmowych będące rezultatem wzajemnego nakładania się wzbudzeń stanów elektronowych, oscylacyjnych i rotacyjnych cząstek. W cieczech i ciałach stałych dyskretna struktura pasm absorpcyjnych najczęściej nie jest obserwowana.

Wielkości fizyczne, które opisują ilościowo zjawiska absorpcji i transmisji nazywano **absorbancją (osłabieniem)** i **transmitancją (pochłanianiem, współczynnikiem transmisji)** [10].

Transmitancja T , podobnie, jak już to było omawiane wcześniej, oznacza stosunek natężenia $I_{wyj.}$ wiązki promieniowania przepuszczonego przez próbkę do natężenia I_0 wiązki padającej:

$$T = \frac{I_{wyj.}}{I_0} \quad \text{lub} \quad T_{[\%]} = \frac{I_{wyj.}}{I_0} \times 100. \quad (132)$$

Wielkość ta będzie miała wartość maksymalną $T = 1$ ($T_{[\%]} = 100\%$), gdy światło będzie przechodzić przez próbkę niepochlaniającą światła, podczas gdy osiągnie wartość minimalną $T = 0$, gdy światło zostanie całkowicie pochłonięte przez badaną próbkę. Transmitancja nie jest funkcją pozwalającą na określenie prostoliniowej zależności stężenia substancji pochłaniającej światło. Umożliwia to jednak inna wielkość opisująca pochłanianie światła – absorbancja.

Absorbancja A to logarytm dziesiętny odwrotności transmitancji:

$$A = \log \frac{1}{T} = \log \frac{100}{T_{[\%]}} . \quad (133)$$

Wielkość tą, określającą w sposób ilościowy zjawisko absorpcji światła, często określa się również mianem ekstynkcji. Obie powyższe wielkości są bezwymiarowe.

Zjawisko absorpcji jest fundamentem współczesnych technik spektroskopii optycznej, która jest metodą badawczą służącą do określenia składu oraz stężenia rozcieńczonych związków chemicznych. Ogólnie rzecz biorąc, zgodnie z **prawem Beera**, absorbancja, czyli pochłanianie światła przez roztwór jest proporcjonalne do stężenia znajdujących się w nim chromoforów.

Do opisu absorpcji w najprostszym przypadku, gdy występuje duże rozcieńczenie i małe natężenie światła, stosuje się **prawo Lamberta–Beera**. Prawo to odnosi się do substancji absorbujących rozmieszczonych w nieabsorbującym ośrodku.

Absorbancja A wiązki świetlnej przechodzącej przez dany ośrodek jest wówczas proporcjonalna do stężenia c_m znajdujących się tam absorberów oraz drogi optycznej d przebytej przez fale świetlne w tym ośrodku:

$$A = \log_{10} \frac{I_{wyj.}}{I_0} = a \cdot d \cdot c , \quad (134)$$

gdzie I_0 jest natężeniem światła padającego, $I_{wyj.}$ to natężenie światła po przejściu przez ośrodek, a jest współczynnikiem właściwym absorpcji, c oznacza stężenie substancji absorbujących, natomiast d jest odległością pomiędzy punktami wejścia i wyjścia światła w ośrodku. Widzimy zatem, iż dla jednostkowej wartości stężenia substancji absorbującej oraz drogi optycznej przebytej przez światło w badanej próbce absorbancja jest wprost proporcjonalna do współczynnika absorpcji właściwej $A = a$.

Współczynnik właściwy absorpcji a można określić jako stosunek absorbancji do grubości warstwy absorbującej d wyrażonej w centymetrach i stężenia substancji absorbującej c wyrażonego w gramach/litr. W konsekwencji współczynnik a jest wyrażony w następujących jednostkach: $l \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

Jeżeli znane jest stężenie molowe c_m (mol/l) substancji absorbującej, wówczas można wyrazić absorbancję A poprzez stężenie molowe:

$$A = \ln \frac{I_{wyj.}}{I_0} = \varepsilon \cdot d \cdot c_m , \quad (135)$$

Współczynnik molowy absorpcji ε to współczynnik zdefiniowany jako współczynnik absorpcji (właściwej) a , ale stężenie substancji absorbującej c_m wyrażone jest w molach/litr, więc w konsekwencji jednostką jest $l \text{ cm}^{-1} \text{ mol}^{-1}$. Współczynnik molowy absorpcji ε , zależy od temperatury, jest wielkością charakterystyczną danej substancji i jest funkcją długości fali. Również w tym przypadku dla jednostkowego stę-

zenia cm oraz drogi optycznej d , absorbancja jest wprost proporcjonalna do molowego współczynnika absorpcji $A = \varepsilon$.

W praktyce laboratoryjnej często spotykamy się z koniecznością określenia właściwości absorpcyjnych substancji będący mieszaniną różnego rodzaju chromoforów - absorberów. Aby określić absorbancję wieloskładnikowej mieszaniny substancji pochłaniających światło należy zastosować tzw. prawo addytywności absorpcji, które mówi, iż absorbancja roztworu, w którym znajdują się różne stężenia $c_1, c_2, c_3 \dots$ chromoforów, należy dodać absorbancje wszystkich składników tej mieszaniny:

$$A_w = A_1 + A_2 + \dots = (a_1 c_1 + a_2 c_2 + \dots) d = (\varepsilon_1 c_{1[\text{mol/l}]} + \varepsilon_2 c_{2[\text{mol/l}]} + \dots) d. \quad (136)$$

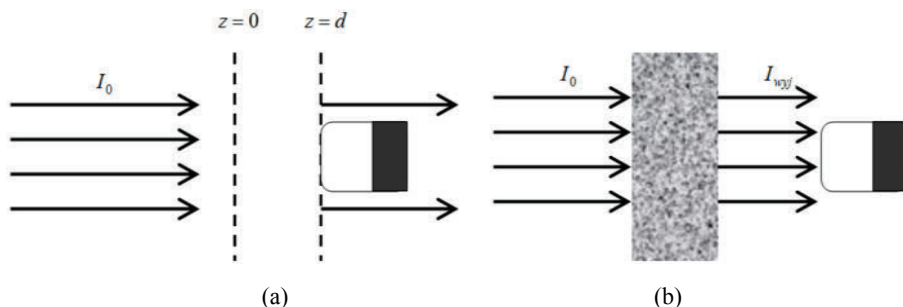
Jeżeli przez dany obiekt np. płytkę płasko-równoległą (lub kuletę) o grubości d , wykonaną z materiału o współczynniku absorpcji μ_a i pochłaniającą światło, przepuścimy wiązkę światła o natężeniu I_0 , wówczas możliwy będzie pomiar natężenia światła $I_{wyj.}$ po przejściu przez ten obiekt za pomocą detektora (detektor promieniowania zlokalizowany bezpośrednio za płytką w odległości $z = d$ (patrz rys. 3.22). Prawdziwa zatem będzie zależność:

$$\ln \frac{I_{wyj.}}{I_0} = -\mu_a \cdot d.$$

Równanie opisujące **prawo Bouguera** bezpośrednio wynika z zależności opisującej natężenie wiązki świetlnej, która przebyła drogę d w ośrodku o liniowym współczynniku absorpcji μ_a :

$$I_{wyj.} = I_0 e^{-\mu_a d}. \quad (137)$$

Parametr μ_a oznacza **liniowy współczynnik absorpcji** wyrażony w cm^{-1} . Opisuje on straty natężenia światła na jednostkowej drodze na skutek absorpcji. Współczynnik ten można również zdefiniować jako odwrotność grubości warstwy absorbującej, po przebyciu której natężenie światła zmaleje e -krotnie.



Rys. 3.22. Schemat ilościowego pomiaru absorpcji światła:
(a) pomiar koncepcyjny, (b) praktyczna realizacja (opis w treści)

Należy pamiętać jednak, że absorpcja promieniowania przez dane ciało ma charakter ściśle selektywny tzn. ma miejsce dla określonych długości fali promieniowania, co ma związek z warunkiem rezonansu, zatem współczynnik absorpcji charakteryzujący związki chemiczne jest wielkością dyspersyjną $\mu_a = f(\lambda)$. Jeżeli stężenie mierzonej substancji jest równomierne w całej próbce, to współczynnik ten można zdefiniować jako iloczyn stężenia c [mol/l] i charakterystycznego dla danej substancji molowego współczynnika absorpcji ε [$l \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$].

Wielkość $1/\mu_a$ nazywa się średnią drogą swobodną δ_a przebytą przez foton przed aktem absorpcji i można dzięki niej wyznaczyć głębokość wnikania promieniowania świetlnego do ośrodka. Średnia droga swobodna przebyta przed aktem absorpcji jest to odległość przebyta przez foton w warstwie badanej substancji, po przejściu której natężenie światła zmniejszy się e razy. Dla przykładu w oknie optycznym 600–900 nm dla tkanek pozbawionych melaniny wynosi ona od 3 do 6 mm. W przypadku światła ultrafioletowego głębokość penetracji wynosi około 0,5 do 1,5 mm, a w zakresie zieleni i żółci około 1 do 3 mm.

Na efektywność absorpcji światła najistotniejszy wpływ ma grubość poszczególnych warstw badanego ośrodka oraz występowanie w nim substancji absorbujących. W przypadku tkanek *in vivo* bierze się również pod uwagę gęstość sieci naczyń krwionośnych oraz wielkość przepływu krwi, zawartość wody oraz obecność barwników w strukturach tkankowych. W mikroskali, na zdolność absorpcji światła w układach najistotniejszy wpływ mają: aminokwasy, kwasy nukleinowe, melanina, hemoglobina, bilirubina, związki sterydowe, rodopsyna i inne fotoakceptory. Większość z nich skutecznie pochłania promieniowanie ultrafioletowe, pozostałe zaś promieniowanie widzialne (hemoglobina, melanina, rodopsyna, cytochromy), a niektóre podczerwone. Również organizmy roślinne i bakteryjne zawierają chromofory. Szczególnie bogate w substancje absorbujące są organizmy fotosyntezujące.

Substancje posiadające zdolność absorpcji promieniowania elektromagnetycznego nazywamy **chromoforami**.

Zjawisko absorpcji światła w sposób ilościowo opisać można za pomocą określenia transmitancji oraz absorbancji.

Współczynnik właściwy absorpcji a można określić jako stosunek absorbancji do grubości warstwy absorbującej d , wyrażonej w centymetrach i stężenia substancji absorbującej c , wyrażonego w gramach/litr. W konsekwencji współczynnik a jest wyrażony w następujących jednostkach $l \text{ cm}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

Współczynnik molowy absorpcji ε to współczynnik zdefiniowany jak współczynnik właściwy absorpcji a , przy czym stężenie substancji absorbu-

jącej c_m wyrażone jest w molach/litr, więc w konsekwencji jego jednostką jest $\text{l cm}^{-1} \text{mol}^{-1}$.

Liniowy współczynnik absorpcji wyrażony w cm^{-1} . Opisuje on straty natężenia światła na jednostkowej drodze na skutek absorpcji. Współczynnik ten można również zdefiniować jako odwrotność grubości warstwy absorbującej, po przebyciu której natężenie światła zmaleje e -krotnie. Jeżeli stężenie mierzonej substancji jest równomierne w całej próbce, to współczynnik ten można zdefiniować jako iloczyn stężenia c [mol/l] i charakterystycznego dla danej substancji molowego współczynnika absorpcji ε [$\text{l mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$].

W zależności od tego czy stężenie substancji absorbującej jest wyrażone w g/l lub też mol/l, we wzorach opisujących absorbancję stosuje się odpowiednio właściwy współczynnik absorpcji lub molowy współczynnik absorpcji.

3.5.2. Luminescencja

Absorpcja energii świetlnej przez dany ośrodek prowadzić może do wzbudzenia atomów do wyższego stanu energetycznego, czego konsekwencją mogą być efekty termiczne, fotochemiczne, bądź też w niektórych przypadkach luminescencja. Zgodnie z definicją Wawilowa: „*luminescencja jest emisją promieniowania elektromagnetycznego o natężeniu większym od natężenia promieniowania cieplnego w danej temperaturze i czasie trwania dłuższym od okresu emitowanej fali świetlnej*” [11, 12]. Może się zatem zdarzyć, że pod wpływem zaabsorbowanego promieniowania dojdzie do emisji kwantu promieniowania elektromagnetycznego przy przechodzeniu elektronu ze stanu wzbudzonego do stanu o niższej energii.

Przejścia energetyczne w cząstce po zaabsorbowaniu energii świetlnej mogą być zobrazowane za pomocą diagramu Jabłońskiego¹ (patrz rys. 3.23). Struktura energetyczna cząsteczki jest opisana przez jej konfigurację elektronową, która oprócz podstawowego stanu singletowego S_0 scharakteryzowana jest również zwykle przez kilka wyższych energetycznie stanów singletowych S_1 o antyrównoległe ustawionych spinach elektronów na powłoce oraz stany trypletowe o równoległe ustawionych spinach elektronów. Przejścia pomiędzy stanami singletowymi i trypletowymi są mało prawdopodobne.

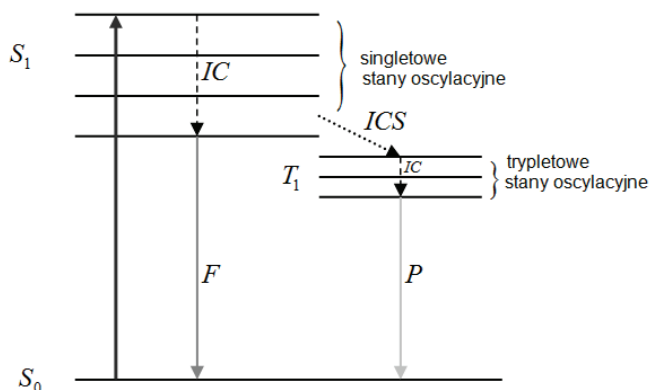
Każda cząstka w ramach określonej konfiguracji elektronowej może posiadać różne stany oscylacyjne, które wynikają z drgań atomów w tej cząstce. Atom, któ-

¹ Aleksander Jabłoński (1898–1980) – polski fizyk, profesor Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu, opisał zjawisko luminescencji w oparciu o graficzne diagramy, które obecnie są powszechnie wykorzystywane w nauce do opisu tego procesu.

ry zaabsorbował foton rezonansowy, czyli o energii dopasowanej do różnicy energetycznej pomiędzy stanem podstawowym S_0 a dowolnym stanem oscylacyjnym elektronowego stanu wzbudzenia S_1 , ulega wzbudzeniu czyli ekscytacji. W przypadku form pierścieniowych cząsteczek organicznych (np. jak porfiryny) energia wzbudzenia ze stanu podstawowego (S_0) do pierwszego wzbudzonego stanu singletowego (S_1) odpowiada długościom fal z zakresu ultrafioletu i światła widzialnego (300–800 nm).

Po czasie relaksacji ciało traci część uzyskanego nadmiaru energii podczas przechodzenia do najniższego stanu oscylacyjnego należącego do danego poziomu elektronowego. Następnie, w sposób bezpromienisty molekula może przejść na najniższy położony stan wzbudzenia S_1 .

Gdy zostanie wyemitowany foton o energii $h\nu = E_{S_1} - E_{S_0}$, to elektron powraca na jeden z poziomów oscylacyjnych stanu podstawowego. Ten rodzaj powrotu atomu do stanu równowagi poprzez emisję promieniowania świetlnego określamy mianem *fluorescencji*. W ośrodku składającym się ze zbioru wielu atomów część zaabsorbowanej energii przekształcana jest na ciepło lub inicjuje inne procesy, które w konsekwencji prowadzą do tego, że reemitowany foton ma mniejszą energię niż foton zaabsorbowany. Z tego też powodu promieniowanie wyemitowane w procesie fluorescencji jest zawsze przesunięte w kierunku fal dłuższych niż długość fali promieniowania wzbudzającego.



Rys. 3.23. Diagram Jabłońskiego: S_0 – singletowy stan podstawowy, S_1 – singletowy stan wzbudzony, T_1 – trypletowy stan wzbudzony, linie ciągłe – przejścia promienne, linie przerywane – przejścia, F – fluorescencja, P – fosforescencja, IC – konwersja wewnętrzna, ICS – wewnętrzne przejście interkombinacyjne singlet–tryplet

Prawo, które mówi, że długość fali promieniowania fluorescencyjnego jest zawsze większa od długości fali promieniowania wzbudzającego fluorescencję nazywane jest prawem Stokesa. Czas zaniku fluorescencji nie przekracza kilku nanosekund.

W przypadku, gdy energia wzbudzonej cząsteczki jest przekazywana otoczeniu w wyniku zderzeń z innymi molekułami, następuje *konwersja wewnętrzna*, czyli bez-

promienisty (bez emisji promieniowania świetlnego) zanik poziomu wzbudzonego. Efektywność i wydajność tego procesu zmniejsza się wraz ze wzrostem przerwy energetycznej pomiędzy poziomem wzbudzonym a podstawowym. Przejścia singlet–tryplet są mało prawdopodobne, ale nie niemożliwe. Zatem atom może przejść do własnego stanu trypletowego lub też przekazać swoją energię innemu atomowi. Proces transferu energii singlet–tryplet określamy mianem wewnętrznej konwersji interkombinacyjnej (*ICS – inter-system crossing*), gdyż prowadzi on do zmiany kierunku spinów elektronów. Emisję fotonu przy przejściu ze stanu trypletowego do stanu podstawowego (singletowego) nazywamy wówczas *fosforescencją*. W porównaniu z fluorescencją, podczas fosforescencji emitowane jest promieniowanie świetlne o długościach fal przesuniętych znacznie dalej w obszar fal dłuższych, a czas jej zaniku jest znacznie dłuższy (o kilka rzędów) niż czas zaniku fluorescencji i wynosi kilka mikro- lub milisekund.

Oba rodzaje reemisji promieniowania świetlnego przez wzbudzone atomy cząstki, czyli fluorescencję oraz fosforescencję, określamy mianem luminescencji. Ze względu na sposób wzbudzenia wyróżniamy kilka rodzajów luminescencji:

- fotoluminescencja – wywołana promieniowaniem elektromagnetycznym, np. laserem lub promieniowaniem lampy halogenowej, ksenonowej, deuterowej lub innej,
- elektroluminescencja – wywołana polem elektrycznym, np. przy przepływie elektronów w złączu *p–n*,
- chemiluminescencja – świecenie następuje w wyniku wzbudzenia reakcjami chemicznymi,
- bioluminescencja – wywołana procesami biologicznymi,
- radioluminescencja – wywołana promieniowaniem jonizującym,
- rentgenoluminescencja – świecenie następuje w wyniku wzbudzenia promieniami X,
- tryboluminescencja – występuje w wyniku wzbudzenia siłami tarcia i elektrostatycznymi,
- sonoluminescencja – wywołana falami ultradźwiękowymi,
- katodoluminescencja – wzbudzenie strumieniem elektronów,
- elektrochemiluminescencja – wywołana procesami chemicznymi i polem elektrycznym [13].

W przypadku, gdy energia fotonu wyemitowanego przez atom różni się od energii zaabsorbowanego fotonu, mamy do czynienia ze zjawiskiem Ramana. Jeżeli energia fotonu wyemitowanego promieniowania jest mniejsza niż energia fotonu wzbudzającego, wówczas mamy do czynienia z przejściami stokesowskimi. Gdy energia wyemitowanego fotonu jest większa niż energia fotonu powodującego fotoekscytację, mamy do czynienia z przejściami antystokesowskimi. Zagadnienia te są również opisane w rozdziale 4 niniejszego podręcznika: *Podstawowe pojęcia fotochemii i fotobiologii*.

Każda cząsteczka posiada energię elektronową, oscylacyjną i rotacyjną.

Energia elektronowa informuje o położeniu elektronów, rodzajach utworzonych wiązań i odległościach między jądrami atomów.

Energia oscylacyjna związana jest z ruchem molekuł, czyli ich zbliżaniem i oddalaniem się od siebie.

Energia rotacyjna cząsteczki to ruchy obrotowe molekuł.

Jeżeli cząsteczka we wzbudzonym stanie oscylacyjnym, pozbywa się nadmiaru energii wypromieniowując kwant energii świetlnej i powraca do stanu podstawowego, wówczas zjawisko to określamy mianem **luminescencji**.

Fluorescencja zachodzi, gdy emisja promieniowania kończy się jednocześnie z zanikiem wzbudzenia. Natężenie fluorescencji zależy od natężenia światła wzbudzającego oraz budowy chemicznej molekuly. Zachodzi w wyniku przejścia pomiędzy wzbudzonym i podstawowym stanem singletowym.

Fosforescencja charakteryzuje się dłuższym czasem emisji promieniowania po zakończeniu wzbudzenia. Jest to przejście ze wzbudzonego stanu tripletowego do stanu podstawowego.

Zgodnie z **prawem Stokes'a** długość fali wyemitowanego promieniowania w wyniku utraty części energii przez cząsteczki ulega przesunięciu w kierunku fal dłuższych względem długości fali światła zaabsorbowanego.

Długości fal wyemitowane na drodze fosforescencji są przesunięte znacznie bardziej w kierunku dłuższych długości fal w stosunku do promieniowania wzbudzającego niż w przypadku fluorescencji.

3.6. Interferencja fal świetlnych

Zgodnie z zasadą Huygensa każdy punkt obiektu materialnego, na który pada fala świetlna, staje się źródłem wtórnej, sferycznej fali świetlnej. Tym samym wypadkowy rozkład przestrzenny światła będący transformacją wejściowej fali świetlnej na analizowanym obiekcie jest superpozycją wtórnych fal świetlnych generowanych przez każdy jego punkt. Powyższe założenie odnosi się również do ogólnego przypadku promieniowania elektromagnetycznego i było ono uprzednio wykorzystane do wyja-

śnienia zjawiska odbicia oraz załamania światła na powierzchni granicznej, które opierało się na opisie oddziaływania fali elektromagnetycznej z atomami ośrodka. Widzimy zatem, iż superpozycja lub też nakładanie się fal świetlnych odgrywa ważną rolę w opisie transformacji światła na obiektach materialnych. W tym podrozdziale opisane zostaną podstawy fizyczne wektorowej superpozycji fal świetlnych. Przeanalizowany zostanie również ogólny przypadek interferencji fal świetlnych oraz jego szczególne przypadki, np. uwzględniające wpływ różnych wielkości fizycznych charakteryzujących nakładające się fale świetlne na zajście zjawiska interferencji. Z uwagi na fakt, iż niniejszy podrozdział stanowi jedynie wstęp do podstawowych zagadnień optycznych, a nie szczegółowe i wyczerpujące rozważania na ich temat, przedstawiona zostanie prosta analiza matematyczna wpływu różnych wartości częstości kołowych, faz początkowych oraz stanu polaryzacji nakładających się fal, co umożliwi zrozumienie fundamentalnych warunków zajścia zjawiska interferencji przez Czytelników nie posiadających specjalistycznego wykształcenia z zakresu optyki. Tym samym nie wprowadzono tu powszechnie stosowanych w optyce wielkości fizycznych, takich jak stopień koherencji (spójności), które wykorzystywane są w bardziej szczegółowych rozważaniach obejmujących istotne zagadnienia koherencji przestrzennej i czasowej fal świetlnych. W celu zapoznania się z tą problematyką odsyłamy Czytelników do bardziej specjalistycznej literatury tematu [1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 15, 16].

3.6.1. Elementy wektorowej superpozycji fal świetlnych

Jak wiadomo fala elektromagnetyczna jest wynikiem wzajemnego sprzężenia pola magnetycznego oraz pola elektrycznego. Wektory natężenia pola elektrycznego i magnetycznego drgają we wzajemnie prostopadłych kierunkach i dodatkowo płaszczyzna tych drgań jest prostopadła do kierunku wektora falowego, który określa kierunek propagacji fali elektromagnetycznej. Dokładne określenie kierunku drgań wektora natężenia pola elektrycznego wymaga zastosowania opisu wektorowego fali świetlnej, dlatego też omówienie zagadnienia superpozycji lub też nakładania się fal rozpoczniemy od najogólniejszego przypadku, nie wprowadzając żadnych założeń odnośnie relacji pomiędzy ich częstościami kołowymi, wartościami fazy początkowej czy też kierunkami drgań wektora natężenia pola elektrycznego obu wiązek świetlnych. Założymy jedynie, że mamy do czynienia z dwiema falami monochromatycznymi. Innymi słowy rozważane będzie zjawisko nakładania się fal świetlnych, oraz zdefiniowane będą wielkości fizyczne charakteryzujące te fale, które warunkują występowanie efektów interferencyjnych.

Wiadomo z poprzednich rozdziałów, że monochromatyczna fala świetlna może zostać wyrażona poprzez wektor natężenia pola elektrycznego. W ogólnym przypadku wektor ten możemy przedstawić w następującej postaci:

$$\bar{E}_i(\bar{r}, t) = \bar{E}_{oi}(\bar{r}, t) \cos(\bar{k}_i \cdot \bar{r} - \omega_i t + \varphi_{oi}), \quad (138)$$

gdzie $\bar{E}_{oi}(\bar{r}, t)$ jest wektorem amplitudy drgań wektora natężenia pola elektrycznego, \bar{k}_i wektorem falowym charakteryzującym kierunek propagacji, ω_i częstością kołową, φ_{oi} fazą początkową, natomiast wektor \bar{r} opisuje dowolny punkt w przestrzeni (x, y, z) , do którego docierają obie fale świetlne. W celu uproszczenia dalszej analizy zauważmy, iż

$$\bar{E}_i(\bar{r}, t) = E_i(\bar{r}, t) \cos(\bar{k}_i \cdot \bar{r} - \omega_i t + \varphi_{oi}) \hat{e}_i(\bar{r}, t), \quad (139)$$

gdzie $\hat{e}_i(\bar{r}, t)$ jest jednostkowym wektorem (wersorem) opisującym kierunek drgań wektora natężenia pola elektrycznego $\bar{E}_i(\bar{r}, t)$ w płaszczyźnie jego drgań. Możliwe jest zatem wprowadzenie zespolonego opisu wektora natężenia pola elektrycznego w następującej postaci:

$$\bar{E}_i(\bar{r}, t) = \underline{E}_i(\bar{r}, t) \hat{e}_i(\bar{r}, t) = |\bar{E}_i(\bar{r}, t)| \exp\{i\varphi_i(\bar{r}, t)\} \exp\{-i\omega_i t\} \hat{e}_i(\bar{r}, t), \quad (140)$$

gdzie amplituda $E(\bar{r}, t)$ wektora natężenia pola elektrycznego może być w ogólnym przypadku wielkością zespoloną $E_i(\bar{r}, t) = \underline{E}_i(\bar{r}, t) = |\bar{E}_i(\bar{r}, t)| \exp\{i\varphi_i(\bar{r}, t)\} \exp\{-i\omega_i t\}$ opisującą przestrzenne i czasowe zmiany amplitudy oraz fazy pola elektrycznego, a $\varphi_i(\bar{r}, t) = \bar{k}_i \cdot \bar{r} + \varphi_{oi}$. Widzimy zatem, iż superpozycja fal świetlnych będzie zależała od wzajemnych relacji pomiędzy amplitudami, fazami, częstościami kołowymi, jak również kierunkiem drgań wektorów natężenia pola elektrycznego wszystkich nakładających się fal świetlnych.

Rozważając superpozycję fal świetlnych możemy napisać, że wypadkowy wektor natężenia pola elektrycznego w określonym punkcie przestrzeni oraz określonym momencie czasu, zgodnie z zasadą superpozycji pola elektromagnetycznego, będzie sumą wektorową wszystkich składowych wektorów natężenia pola elektrycznego nakładających się monochromatycznych fal świetlnych:

$$\bar{E}_n(\bar{r}, t) = \sum_{i=1}^2 \bar{E}_i(\bar{r}, t) = \bar{E}_1(\bar{r}, t) + \bar{E}_2(\bar{r}, t) = \bar{E}_1 + \bar{E}_2. \quad (141)$$

Ponieważ z wykorzystaniem konwencjonalnych detektorów wielkością obserwowalną jest jedynie natężenie obu fal, lub też natężenie oświetlenia, zatem chwilowe natężenie światła jest równe kwadratowi amplitudy wypadkowego wektora natężenia pola elektrycznego:

$$I(\bar{r}, t) = |\bar{E}_n(\bar{r}, t)|^2. \quad (142)$$

Powyższa zależność opisuje zmienny w czasie rozkład przestrzenny natężenia światła na powierzchni detektora, tym samym w celu jego rejestracji konieczne jest czasowe uśrednienie tej wielkości. W równaniu (140) wprowadzono zespolony zapis wektora

natężenia pola elektrycznego, zatem odwołując się do właściwości liczb zespolonych – kwadrat modułu liczby zespolonej jest równy iloczynowi tej liczby oraz jej sprzężenia zespolonego, otrzymujemy ostatecznie następującą zależność, opisującą natężenie wypadkowego wektora natężenia pola elektrycznego:

$$\begin{aligned}
 I(\bar{r}) &= \langle I(\bar{r}, t) \rangle_t = \left\langle |\bar{E}_n(\bar{r}, t)|^2 \right\rangle_t = \left\langle \bar{E}_n(\bar{r}, t) \cdot \bar{E}_n^*(\bar{r}, t) \right\rangle_t = \\
 &= \left\langle \sum_{i=1}^2 \bar{E}_i(\bar{r}, t) \cdot \sum_{i=1}^2 \bar{E}_i^*(\bar{r}, t) \right\rangle_t = \\
 &= \left\langle (\bar{E}_1 + \bar{E}_2) \cdot (\bar{E}_1 + \bar{E}_2)^* \right\rangle_t = \left\langle (\bar{E}_1 + \bar{E}_2) \cdot (\bar{E}_1^* + \bar{E}_2^*) \right\rangle_t = \\
 &= \left\langle \bar{E}_1 \bar{E}_1^* + \bar{E}_2 \bar{E}_2^* + \bar{E}_1 \bar{E}_2^* + \bar{E}_1^* \bar{E}_2 \right\rangle_t. \tag{143}
 \end{aligned}$$

W powyższych przekształceniach skorzystaliśmy z właściwości mówiącej, iż sprzężenie sumy liczb zespolonych jest równe sumie sprzężeń tych liczb. Dodatkowo, jeśli zauważymy, że iloczyn liczby zespolonej oraz jej sprzężenia jest równy kwadratowi jej modułu, to $I_1(\bar{r}) = \langle \bar{E}_1 \bar{E}_1^* \rangle_t$ oraz $I_2(\bar{r}) = \langle \bar{E}_2 \bar{E}_2^* \rangle_t$. Jednakże w wyrażeniu tym występuje jeszcze dodatkowo suma członów mieszanych, która może być wyrażona w następujący sposób:

$$\begin{aligned}
 \bar{E}_1 \bar{E}_2^* + \bar{E}_1^* \bar{E}_2 &= |\bar{E}_1(\bar{r}, t)| |\bar{E}_2(\bar{r}, t)| \hat{e}_1(\bar{r}, t) \hat{e}_2(\bar{r}, t) \exp\{i([\varphi_1(\bar{r}) - \varphi_2(\bar{r})] + i[\omega_1 - \omega_2]t)\} \\
 &+ |\bar{E}_1(\bar{r}, t)| |\bar{E}_2(\bar{r}, t)| \hat{e}_1(\bar{r}, t) \hat{e}_2(\bar{r}, t) \exp\{-i([\varphi_1(\bar{r}) - \varphi_2(\bar{r})] + i[\omega_1 - \omega_2]t)\}. \tag{144}
 \end{aligned}$$

Widzimy zatem, iż rozkład przestrzenny natężenia obu nakładających się fal świetlnych, nie będzie równy jedynie algebraicznej sumie natężeń obu fal, lecz możliwe będzie zaobserwowanie również dodatkowych efektów zależnych od wzajemnych relacji pomiędzy parametrami charakteryzującymi te fale, takimi jak: różnica faz, częstotści kołowych oraz kierunek drgań tych fal. Właśnie te wielkości warunkują możliwość zajścia interferencji obu nakładających się fal świetlnych, czyli periodycznej modulacji rozkładu natężania obu fal.

Iloczyn skalarny wektorów jednostkowych $\hat{e}_1; \hat{e}_2$ opisujących czasowo-przestrzenne zmiany kierunku drgań wektorów natężenia pola elektrycznego obu fal jest równy kosinusowi $\cos(\hat{e}_1(\bar{r}, t); \hat{e}_2(\bar{r}, t))$ kąta wyznaczonego w danym punkcie przestrzeni obserwacji powstałej w płaszczyźnie przecięcia się kierunków propagacji obu fal, gdzie zachodzi ich nakładanie się, pomiędzy rzutami tych wektorów na tę płaszczyznę. Korzystając z zależności Eulera:

$$\cos x = \frac{e^{ix} + e^{-ix}}{2}$$

wyrażenie (143) przybiera postać:

$$2|\bar{E}_1(\bar{r}, t)| |\bar{E}_2(\bar{r}, t)| \cos[\varphi_1(\bar{r}) - \varphi_2(\bar{r}) + (\omega_2 - \omega_1)t] \cos[\hat{e}_1(\bar{r}, t), \hat{e}_2(\bar{r}, t)].$$

Ostatecznie równanie (142), opisujące uśrednione czasowo natężenie oświetlenia na powierzchni detektora, może być opisane przez następującą zależność:

$$I(\bar{r}) = I_1(\bar{r}) + I_2(\bar{r}) + 2|\bar{E}_1(\bar{r})| |\bar{E}_2(\bar{r})| \cos[\varphi_1(\bar{r}) - \varphi_2(\bar{r}) + (\omega_2 - \omega_1)t] \cos[\hat{e}_1(\bar{r}), \hat{e}_2(\bar{r})]. \quad (145)$$

lub też

$$I(\bar{r}) = I_1(\bar{r}) + I_2(\bar{r}) + 2\sqrt{I_1(\bar{r})I_2(\bar{r})} \cos[\varphi_1(\bar{r}) - \varphi_2(\bar{r}) + (\omega_2 - \omega_1)t] \cos[\hat{e}_1(\bar{r}), \hat{e}_2(\bar{r})]. \quad (146)$$

Pierwsze dwa wyrażenia równania (146) opisują sumę algebraiczną natężeń obu nakładających się fal świetlnych. Ostatnie wyrażenie z kolei jest zależne od różnicy faz, częstości kołowych, jak również wzajemnej relacji pomiędzy kierunkami drgań nakładających się fal świetlnych. Widzimy zatem, iż w wyniku superpozycji dwóch fal świetlnych, obserwowany rozkład przestrzenny natężenia jest równy sumie natężeń obu fal, która może być dodatkowo modulowana przestrzennie przez człon interferencyjny z amplitudą modulacji równą $2\sqrt{I_1 I_2}$. Jednakże zajście zjawiska interferencji uwarunkowane jest od wyżej wymienionych wielkości charakteryzujących obie nakładające się fale.

Z uwagi na fakt, iż we wzorze (145) występują jawne zależności od czasu, tym samym funkcja kosinus może przyjmować losowe wartości, a w konsekwencji czasowego uśredniania człon modulujący może być całkowicie wyeliminowany i prążki interferencyjne nie będą obserwowalne, a tym samym zjawisko interferencji nie zajdzie. Należy jednak pamiętać, że dotychczas prowadzone rozważania teoretyczne miały na celu określenie czynników wpływających na możliwość jej zajścia.

W przypadku fal niekoherentnych superpozycja obu fal świetlnych jest zawsze równa algebraicznej sumie ich natężeń, ponieważ w tym przypadku losowe i zmienne czasowo wielkości charakteryzujące obie fale sprawiają, iż człon interferencyjny odpowiedzialny za modulację natężenia oświetlenia w obrazie interferencyjnym zanika. Z kolei dla fal koherentnych wartości wypadkowego natężenia nakładających się fal mogą przyjmować wartości znacznie większe, pośrednie lub też mniejsze niż algebraiczna suma ich natężeń w zależności od drogi optycznej przebytej przez te fale, ich amplitud oraz stanu polaryzacji tak, iż obserwujemy specyficzny rozkład prążków interferencyjnych. To właśnie poprzez ten człon modulujący w sposób matematyczny możemy opisać zjawisko powstawania w płaszczyźnie obserwacji periodycznych prążków interferencyjnych w wyniku nakładania się fal świetlnych, jednakże efekt ten zachodzi jedynie w specyficznych i ściśle określonych warunkach. W zależności od

relacji fazowych pomiędzy interferującymi falami świetlnymi, ich stanem polaryzacji, różniącą faz początkowych, oraz różnicą pomiędzy ich częstościami kołowymi możemy obserwować szereg efektów począwszy od różnej struktury przestrzennej rejestrowanych prążków, zmiany ich kontrastu, czy też ich całkowitego zaniku w przypadku fal niekoherentnych. Zjawisko interferencji zachodzi dla fal koherentnych, gdy rozkład natężenia nakładających się fal zależy od różnicy faz lub też dróg optycznych przebytych przez te fale, a także ich amplitud.

W dalszej części rozważymy wpływ poszczególnych wielkości fizycznych charakteryzujących nakładające się fale świetlne na możliwość zajścia zjawiska interferencji fal świetlnych.

3.6.2. Interferencja monochromatycznych i jednakowo spolaryzowanych fal świetlnych

W poprzedniej części omówiliśmy najbardziej ogólny przypadek nakładania się fal monochromatycznych o dowolnym kierunku drgania ich wektorów natężenia pola elektrycznego. W tej części rozważymy pewien szczególny przypadek, gdy wygenerowane przez nieskończenie daleko odległe, punktowe źródło światła obie płaskie fale świetlne są monochromatyczne i są scharakteryzowane przez tą samą częstość kołową, co oznacza, że $\omega_1 = \omega_2 = \omega$, a $\omega_2 - \omega_1 = 0$. Dodatkowo założmy, że kierunki drgań wektorów natężenia pola elektrycznego obu fal są jednakowe. Ostatni warunek oznacza, że oba wektory jednostkowe mają ten sam zwrot oraz kierunek, tym samym kąt pomiędzy wersorami \hat{e}_1, \hat{e}_2 jest równy zero stopni, a zatem $\cos(\hat{e}_1, \hat{e}_2) = 1$. Zależność opisująca rozkład przestrzenny natężenia światła powstały w wyniku nakładania się fal o zerowej wartości fazy początkowej przyjmuje następującą postać:

$$I(\vec{r}, t) = I_1(\vec{r}) + I_2(\vec{r}) + 2\sqrt{I_1(\vec{r})I_2(\vec{r})} \cos[\varphi_1(\vec{r}) - \varphi_2(\vec{r})], \quad (147)$$

gdzie

$$\varphi_1(\vec{r}) - \varphi_2(\vec{r}) = k(ns_1 - ns_2) = \frac{2\pi}{\lambda} n(s_1 - s_2).$$

Widzimy zatem, iż w rozważanym przypadku człon interferencyjny opisujący generację prążków interferencyjnych jest zależny jedynie od stałej w czasie różnicy faz pomiędzy obiema falami. Jak wiadomo, różnica ta zależy od długości fali oraz różnicy dróg optycznych przebytych przez obie fale wygenerowane przez to samo punktowe źródło światła, a tym samym od dróg geometrycznych s_1, s_2 przebytych przez obie wiązki w danym ośrodku, jak również od jego współczynnika załamania światła n . Rozkład przestrzenny prążków interferencyjnych zdeterminowany jest również przez proces propagacji tych fal w danym ośrodku.

Z reguły obraz interferencyjny ma postać specyficznego rozkładu ciemnych i jasnych prążków interferencyjnych o periodycznym charakterze. Tym samym rejestrowane zarówno jasne, jak i ciemne prążki interferencyjne należy traktować jako powierzchnie stałego natężenia światła $I = \text{const.}$ dla określonej różnicy faz pomiędzy nakładającymi się falami. Dodatkowo warunek takiej samej monochromatyczności oraz jednakowego stanu polaryzacji obu interferujących płaskich fal świetlnych, eliminuje z wyrażenia (144) zależności czasowe, zatem w tym przypadku obserwuje się stabilny czasowo rozkład prążków interferencyjnych i uśrednianie czasowe jest zbędne.

Rozważmy dodatkowo pewne szczególne przypadki powyższego równania (147). W ogólnym przypadku, gdy natężenia obu wiązek nie są jednakowe, wówczas w zależności od wartości różnicy faz interferujących fal świetlnych wyróżniamy dwa podstawowe rodzaje interferencji:

- **konstruktywną** dla $\Delta\varphi(\vec{r}) = \varphi_1(\vec{r}) - \varphi_2(\vec{r}) = m2\pi$ dla $m = 0, 1, 2, 3, \dots$, wówczas obserwujemy jasne prążki interferencyjne (maksima interferencyjne):

$$I(\vec{r}) = I_1(\vec{r}) + I_2(\vec{r}) + 2\sqrt{I_1(\vec{r})I_2(\vec{r})}, \quad (148)$$

- **destruktywną** dla $\Delta\varphi(\vec{r}) = \varphi_1(\vec{r}) - \varphi_2(\vec{r}) = (2m + 1)\pi$, wówczas obserwujemy ciemne prążki interferencyjne (minima interferencyjne):

$$I(\vec{r}) = I_1(\vec{r}) + I_2(\vec{r}) - 2\sqrt{I_1(\vec{r})I_2(\vec{r})}. \quad (149)$$

W sytuacji, gdy natężenia obu wiązek są jednakowe $I_1(\vec{r}) = I_2(\vec{r}) = I_0$, otrzymujemy:

$$I(\vec{r}) = 2I_0[1 + \cos[\varphi_1(\vec{r}) - \varphi_2(\vec{r})]]. \quad (150)$$

Tym samym, w przypadku interferencji konstruktywnej otrzymujemy:

$$I(\vec{r}) = I_{\max}(\vec{r}) = 4I_0. \quad (151)$$

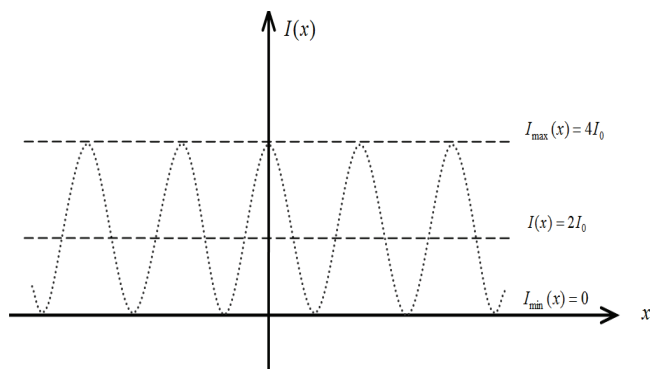
Z kolei, w przypadku interferencji destruktywnej:

$$I(\vec{r}) = I_{\min}(\vec{r}) = 0. \quad (152)$$

Dla innych wartości różnicy faz natężenie przyjmuje wartości pośrednie z zakresu od 0 do $4I_0$. Jednowymiarowy przypadek rozkładu przestrzennego natężenia interferujących fal świetlnych został przedstawiony na rys. 3.24.

Korzystając z zależności trygonometrycznej $1 + \cos x = 2\cos^2(x/2)$, wyrażenie (150) przyjmuje postać:

$$I(\vec{r}) = 4I_0 \cos^2 \left[\frac{\varphi_1(\vec{r}) - \varphi_2(\vec{r})}{2} \right]. \quad (153)$$



Rys. 3.24. Jednowymiarowy rozkład przestrzenny widma interferencyjnego dwóch wiązek o takim samym natężeniu

Tym samym, w przypadku rozważanych fal świetlnych generowanych przez to samo punktowe źródło światła, uzyskujemy stabilny czasowo obraz interferencyjny – rozkład prążków interferencyjnych zależy od różnicy faz, lub też dróg optycznych przebytych przez te fale w danym ośrodku, a o obu tworzących go falach mówimy, iż są one koherentne (spójne). W celu charakteryzacji prążków interferencyjnych wprowadza się pojęcie kontrastu prążków opisującego widzialność prążków interferencyjnych, który wyrażony jest w następujący sposób:

$$K = \frac{I_{\max} - I_{\min}}{I_{\max} + I_{\min}}. \quad (154)$$

Wielkość ta w sposób oczywisty zależy od ekstremalnych wartości natężenia I_{\max} oraz I_{\min} . Im większa jest różnica pomiędzy wartościami natężeń, tym większa jest widzialność prążków i ich kontrast. Wielkość ta w sposób oczywisty zależy również od amplitud obu interferujących fal świetlnych. Tym samym ich wartości w bezpośredni sposób warunkują widzialność (kontrast) obserwowanego obrazu interferencyjnego.

W wyniku superpozycji dwóch fal świetlnych, obserwowany rozkład przestrzenny natężenia jest równy sumie natężeń obu fal. Jest on dodatkowo modulowany przestrzennie przez człon interferencyjny z amplitudą modulacji równą $2\sqrt{I_1 I_2}$, jednakże jego obecność, a tym samym możliwość zajścia interferencji jest uwarunkowana przez różnicę faz pomiędzy nakładającymi się falami świetlnymi, kierunek drgań wektorów natężenia pola elektrycznego obu fal, czyli ich stan polaryzacji, jak również przez ich częstotliwości kołowe, a tym samym długości fali.

Gdy różnica faz pomiędzy dwiema nakładającymi się falami jest całkowitą wielokrotnością 2π wówczas mamy do czynienia z występowaniem maksimów interferencyjnych, czyli **zachodzi interferencja konstruktywna**.

Gdy różnica faz pomiędzy dwiema nakładającymi się falami jest nieparzystą wielokrotnością π wówczas mamy do czynienia z występowaniem minimów interferencyjnych, czyli **zachodzi interferencja destruktywna**.

3.6.3. Warunki stabilnej interferencji fal świetlnych

Dotychczas rozważaliśmy jedynie najprostszy przypadek superpozycji dwóch monochromatycznych fal płaskich o jednakowym stanie polaryzacji i częstotliwości kołowej. Teraz zajmiemy się dokładną analizą wpływu wielkości, takich jak częstotliwość kołowa, stan polaryzacji, czy też wartość fazy początkowej na możliwość zajścia zjawiska interferencji oraz uzyskania stabilnego czasowo obrazu interferencyjnego.

Jak wiadomo, wpływ stanu polaryzacji obu interferujących fal świetlnych na obraz interferencyjny związany jest z wzajemną relacją pomiędzy przestrzennymi drganiami wektorów natężenia pola elektrycznego obu nakładających się fal świetlnych. W naszym przypadku efekt ten jest zależny od kąta pomiędzy kierunkami drgań wektorów natężenia pola elektrycznego obu fal, a dokładniej mówiąc kąta pomiędzy ich rzutami na płaszczyznę obserwacji, w której przecinają się kierunki propagacji obu fal, i jest on scharakteryzowany przez $\cos[\hat{e}_1(\vec{r}), \hat{e}_2(\vec{r})]$. Załóżmy, iż obie nakładające się fal mają tę samą częstotliwość kołową, a wektory natężenia pola elektrycznego obu fal drgają we wzajemnie prostopadłych kierunkach. Oznacza to, iż kąt pomiędzy wersorami \hat{e}_1, \hat{e}_2 , a tym samym ich rzutami na płaszczyznę obserwacji, jest równy 90° , czyli $\cos(\hat{e}_1, \hat{e}_2) = 0$. Widzimy zatem, iż w omawianej sytuacji, różne stany polaryzacji obu wiązek prowadzą do całkowitego wyeliminowania z równań (145) i (146) członu interferencyjnego tak, iż rejestrowany rozkład przestrzenny natężenia światła będzie równy:

$$I(\vec{r}) = I_1(\vec{r}) + I_2(\vec{r}). \quad (155)$$

W tym przypadku niezależnie od monochromatyzmu obu wiązek oraz wartości różnicy faz, prążki interferencyjne nie będą obserwowalne. Uzmysławia nam to również, że sama monochromatyczność fal świetlnych nie jest jedynym i wystarczającym warunkiem zajścia interferencji i utworzenia stabilnego czasowo obrazu interferencyjnego. W omawianym przypadku wyrażenie (155) ogranicza się jedynie do algebraicznej sumy natężeń obu nakładających się fal świetlnych, tym samym mamy do czynienia z falami niekoherentnymi.

W ogólnym przypadku, gdy kąt γ pomiędzy wersorami \hat{e}_1, \hat{e}_2 będzie się losowo zmieniał w czasie w przedziale od 0 do 2π , rozkład przestrzenny prążków interferencyjnych będzie przybierał wartości pośrednie pomiędzy wartościami:

$$I_{\max}(\bar{r}) = I_1(\bar{r}) + I_2(\bar{r}) + 2\sqrt{I_1(\bar{r})I_2(\bar{r})}\cos[\varphi_1(\bar{r}) - \varphi_2(\bar{r})],$$

a

$$I_{\min}(\bar{r}) = I_1(\bar{r}) + I_2(\bar{r}) - 2\sqrt{I_1(\bar{r})I_2(\bar{r})}\cos[\varphi_1(\bar{r}) - \varphi_2(\bar{r})],$$

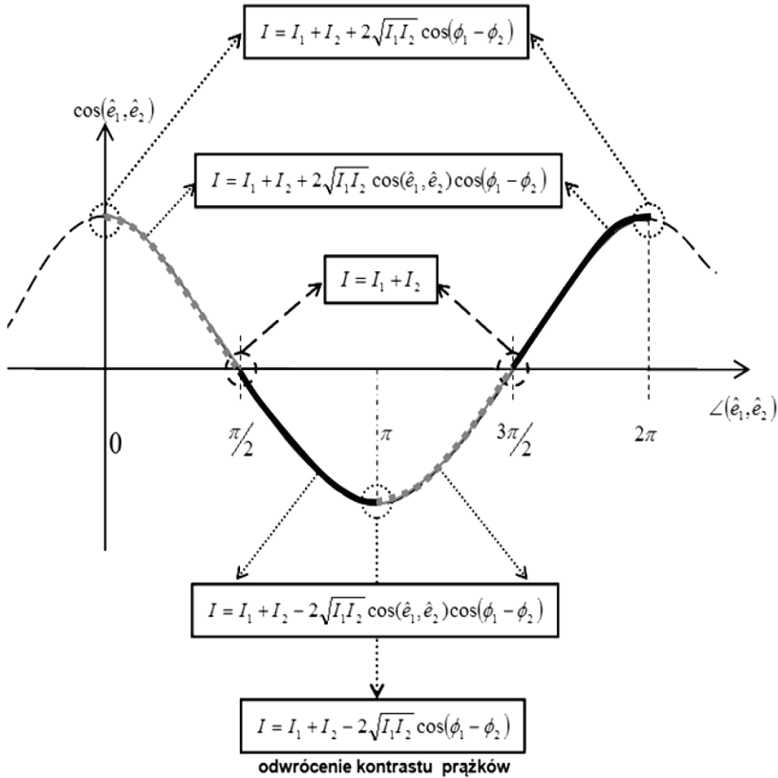
choć w zależności od różnicy faz obu nakładających się fal graniczne wartości mogą przyjąć, jeszcze bardziej ekstremalne wartości. W sytuacji, gdy kąt $\gamma = \gamma(t)$ zmienia się losowo, niemożliwe będzie uzyskanie stabilnego czasowo obrazu interferencyjnego opisującego zależność różnicy faz pomiędzy obiema nakładającymi się falami, gdyż człon modulacji będzie się zmieniał w sposób losowy. Tym samym ze względu na jawną zależność wartości kąta γ od czasu, możemy zastąpić wyrażenie $\cos(\hat{e}_1, \hat{e}_2)$ przez jego średnią czasową $\langle \cos(\hat{e}_1, \hat{e}_2) \rangle_t = 0$, co oznacza, że równanie superpozycji fal upraszcza się do algebraicznej sumy natężeń obu wiązek, gdyż człon interferencyjny został wyeliminowany. Widzimy zatem, iż stan polaryzacji nakładających się fal jest krytycznym czynnikiem warunkującym zajście zjawiska interferencji.

Nieco odmienna sytuacja ma miejsce w przypadku ustalonego w czasie kąta γ pomiędzy wersorami \hat{e}_1, \hat{e}_2 , gdyż wówczas wpływ różnych stanów polaryzacji interferujących fal świetlnych prowadzić będzie do zmiany amplitudy modulacji widma interferencyjnego $\pm 2\sqrt{I_1(\bar{r})I_2(\bar{r})}|\cos(\hat{e}_1, \hat{e}_2)|$, jednakże nie spowoduje to całkowitego zaniku prążków interferencyjnych. Należy jednak zauważyć, będzie to skutkowało znacznym obniżeniem kontrastu prążków interferencyjnych w zależności od wartości kąta γ (patrz rys. 3.25). Wraz wzrostem kąta γ w przedziale $(0, \pi/2)$ mamy do czynienia ze spadkiem kontrastu prążków interferencyjnych dla amplitudy modulacji równej $2\sqrt{I_1I_2}\cos(\hat{e}_1, \hat{e}_2)$, która wraz z wyrażeniem $\cos(\hat{e}_1, \hat{e}_2)$ przyjmuje coraz mniejsze wartości.

Ten sam efekt pojawia się, gdy omawiany kąt rośnie w przedziale $(\pi, 3\pi/2)$, chociaż wówczas mamy do czynienia z odwróceniem kontrastu prążków (tzn. poprzednio jasne prążki są teraz prążkami ciemnymi), o czym świadczy zmiana znaku amplitudy modulacji, ponieważ w tym przypadku ma ona postać $-2\sqrt{I_1I_2}\cos(\hat{e}_1, \hat{e}_2)$.

Z kolei wraz ze wzrostem wartości kąta γ w przedziałach $(\pi/2, \pi)$ oraz $(3\pi/2, 2\pi)$ w obu przypadkach następuje zwiększenie kontrastu prążków interferencyjnych, czyli wzrost ich widzialności. Oczywiście będzie to miało miejsce jedynie dla pośrednich, stałych w czasie, wartości kąta γ z przedziału $(0, 2\pi)$, gdyż w granicznych przypad-

kach dla $\gamma = (2m + 1)\pi/2$ ($m = 0, 1, \dots$) mamy do czynienia z całkowitym wyeliminowaniem członu interferencyjnego i rejestracją jedynie sumy natężeń obu nakładających się wiązek.



Rys. 3.25. Związek pomiędzy widmem interferencyjnym a zmianą wartości kąta pomiędzy wektorami natężenia pola elektrycznego obu interferujących wiązek (linia przerywana – spadek kontrastu prążków, linia ciągła – wzrost kontrastu prążków)

Ważnym czynnikiem wpływającym na zjawisko interferencji fal świetlnych jest również wartość częstości kołowej nakładających się fal świetlnych. Rozważmy zatem przypadek, gdy obie nakładające się fale świetlne są jednakowo spolaryzowane $\cos(\hat{e}_1, \hat{e}_2) = 1$, lecz ich częstości nie są sobie równe tzn. $\omega_1 \neq \omega_2$, czyli $\omega_1 - \omega_2 \neq 0$. Wówczas wzór opisujący superpozycję tych fal przybiera następującą postać:

$$I(\vec{r}, t) = I_1(\vec{r}) + I_2(\vec{r}) + 2\sqrt{I_1(\vec{r})I_2(\vec{r})} \cos[\varphi_1(\vec{r}) - \varphi_2(\vec{r}) + (\omega_2 - \omega_1)t]. \quad (156)$$

W wyrażeniu tym występuje jawna zależność od czasu, zatem w tej sytuacji różne wartości częstości kołowej prowadzą do czasowych oscylacji harmonicznych natężenia obu nakładających się fal. Natężenie $I(\vec{r}, t)$ jest zatem modulowane czasowo przez

człon kosinusoidalny i zmienia się z różnicą częstości kołowych ($\omega_1 - \omega_2$) oraz stałą w czasie różnicą faz $\Delta\varphi(\vec{r}) = \varphi_1(\vec{r}) - \varphi_2(\vec{r})$ dla każdego punktu przestrzeni. Niemożliwe zatem staje się zarejestrowanie stabilnego czasowo widma interferencyjnego, gdyż wartość natężenia oscyluje wokół wartości $I_1(\vec{r}) + I_2(\vec{r})$ z częstością $\omega_1 - \omega_2$, i mamy do czynienia z tzw. optycznym dudnieniem. Widzimy zatem, iż również w tym przypadku po uśrednieniu czasowym wypadkowego natężenia obu fal w płaszczyźnie obserwacji otrzymujemy superpozycję jedynie natężeń obu fal świetlnych. Tym samym również warunek jednakowej polaryzacji obu fal nie jest wystarczający do utworzenia stabilnego czasowo rozkładu prążków interferencyjnych, bez spełnienia dodatkowych warunków odnośnie częstości kołowych, lub też długości fali, obu nakładających się fal świetlnych.

Ważnym, aczkolwiek nieanalizowanym dotychczas czynnikiem, który ma również wpływ na warunki stabilnej interferencji, jest wartość faz początkowych dwóch nakładających się fal świetlnych. Do tej pory zakładaliśmy, iż $\varphi_i(\vec{r}, t) = \vec{k}_i \cdot \vec{r} + \varphi_{oi}$, jednak w powyższych wzorach nie przedstawialiśmy jawnej zależności równania interferencyjnego od wartości faz początkowych fal świetlnych. W najogólniejszym przypadku równanie (146) możemy napisać w następującej postaci:

$$I(\vec{r}) = I_1(\vec{r}) + I_2(\vec{r}) + 2\sqrt{I_1(\vec{r})I_2(\vec{r})} \cos[k(ns_1 - ns_2) + (\varphi_{01} - \varphi_{02}) + (\omega_2 - \omega_1)t] \cos[\hat{e}_1(\vec{r}), \hat{e}_2(\vec{r})]. \quad (157)$$

W przypadku, gdy fale te są emitowane przez to samo punktowe źródło światła, wówczas fazy początkowe są stałe w czasie, a tym samym wpływ ich wartości na obserwowalne widmo interferencyjne jest pomijalny. Jednakże, w sytuacji, gdy obie fale świetlne pochodzą z dwóch całkowicie niezależnych źródeł światła lub źródła rozciągniętego przestrzennie, wówczas są one emitowane w postaci szeregu ciągów falowych o skończonych długościach i losowo zmieniających się fazach początkowych. Tym samym różnica faz początkowych przybiera losowe wartości z całego przedziału kąowego $\langle 0, 2\pi \rangle$ i należy uwzględnić wpływ tego zjawiska na zachodzącą interferencję fal świetlnych. Uwzględniając losową zmianę wartości faz początkowych, średnia czasowa kosinusa ich różnicy wynosi $\langle \cos(\varphi_{01} - \varphi_{02}) \rangle_t = 0$, zatem również w tym przypadku wzór interferencyjny (157) zostanie ograniczony jedynie do algebraicznej sumy natężeń obu fal świetlnych, a tym samym nie zaobserwujemy zjawiska interferencji, gdyż człon modulujący zostanie wyeliminowany. Z tego też powodu niezwykle trudno jest uzyskać widmo interferencyjne powstałe w wyniku nakładania się fal świetlnych pochodzących od dwóch różnych źródeł światła. Zastosowanie punktowego źródła światła poprzez ograniczenie jego rozmiarów przestrzennych sprawia, że fazy początkowe generowanych ciągów falowych są stałe w czasie a kontrast powstających prążków interferencyjnych wzrasta.

Ostatecznie widzimy zatem, iż interferencja fal świetlnych zależy od tego, czy są one monochromatyczne, mają taką samą częstość kołową, od ich stanów polaryzacji oraz faz początkowych, które związane są z źródłem światła emitującym te fale. Żaden warunek z osobna nie gwarantuje zajścia zjawiska interferencji oraz obserwacji prążków interferencyjnych o wysokim kontraście. Fale świetlne zdolne do utworzenia stabilnego w czasie widma interferencyjnego przyjęło się określać mianem fal koherentnych (spójnych).

Gdy wzajemny kierunek drgań wektorów natężeń pola elektrycznego nakładających się fal jest prostopadły lub też zmienia się on w sposób całkowicie przypadkowy, wówczas rozkład przestrzenny natężenia światła jest w tym przypadku równy sumie natężeń obu fal. Wyjątkiem jest sytuacja, gdy kierunek jest ustalony i stały w czasie, wówczas możemy obserwować różnego rodzaju efekty związane ze spadkiem kontrastu prążków interferencyjnych lub też odwróceniem ich kontrastu. Niemonochromatyczność lub też zmienne w czasie wartości faz początkowych, również uniemożliwiają rejestrację stabilnego widma interferencyjnego, a tym samym zajścia zjawiska interferencji fal świetlnych.

W przypadku fal koherentnych obserwowalne widmo interferencyjne zależy od różnicy faz pomiędzy nakładającymi się falami świetlnymi oraz ich amplitud. W zależności od tej różnicy faz możemy obserwować interferencję konstruktywną, destruktywną lub też przypadki pośrednie. Koherencja fal świetlnych oznacza zatem, iż muszą mieć one taką samą częstość kołową (długość fali)- być monochromatyczne, różnica faz początkowych nie może zmieniać się w czasie, a płaszczyzna polaryzacji powinna być taka sama. Tym samym za fale koherentne możemy uważać monochromatyczne i spolaryzowane fale wyemitowane przez to samo punktowe źródło światła, które są w stanie utworzyć stabilny rozkład prążków interferencyjnych. Z tego też powodu wszystkie interferencyjne metody pomiarowe polegają na uzyskaniu dwóch wiązek świetlnych poprzez podział amplitudy lub też czoła fali świetlnej wygenerowanej przez to samo źródło.

W pierwszym przypadku wykorzystywane są zjawiska odbicia i załamania światła na granicy dwóch ośrodków o różnych współczynnikach załamania, gdyż w tym przypadku zawsze część światła ulega odbiciu a część jest transmitowana, czyli mamy do czynienia z podziałem amplitudy fal. Z kolei podział czoła fali możemy uzyskać w wyniku oświetlenia np. nieprzeźroczystego ekranu zawierającego dwa punktowe otwory. Techniki podziału amplitudy lub czoła fali świetlnej są powszechnie stosowane w pomiarach optycznych. Przykładem w przypadku podziału amplitudy fali mogą być metody uzyskiwania prążków jednakowej grubości oraz nachylenia, a w przypadku podziału czoła fali – doświadczenie Younga, bipryzmat Fresnela lub też zwierciadło Lloyda. Z uwagi na charakter niniejszej pracy zagadnienia te nie zostaną tu wyczerpująco przeanalizowane, jednakże z uwagi na duży potencjał aplikacyjny technik interferometrycznych polecamy Czytelnikom dokładniejsze zapoznanie się z tym tematem [1, 3, 4, 6, 8].

Koherencja (spójność) fal świetlnych oznacza, zdolność obu nakładających się fal do interferencji. Fale te muszą być monochromatyczne, mieć stałą w czasie różnicę faz oraz taką samą płaszczyznę polaryzacji.

W przypadku fal koherentnych widmo interferencyjne zależy od różnicy faz pomiędzy nakładającymi się falami świetlnymi oraz ich natężenia.

Dla fal koherentnych w zależności od różnicy faz możemy obserwować interferencję konstruktywną, destruktywną lub też przypadki pośrednie.

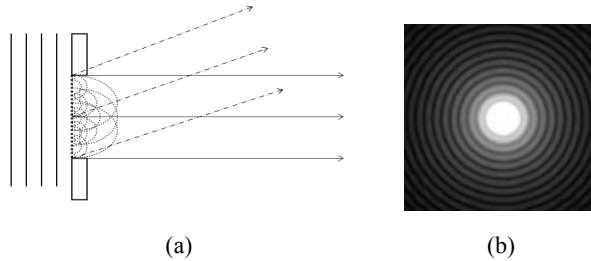
Fale niekoherentne nie tworzą widm interferencyjnych, rozkład natężenia wypadkowego jest równy sumie natężeń obu fal.

3.7. Dyfrakcja światła

Istnieje wiele sytuacji, w których transformacja światła na obiektach odbiega od klasycznej teorii optyki geometrycznej. Doskonale jest to uwidocznione w przypadku oświetlenia monochromatyczną wiązką skolimowaną apertury o rozmiarach porównywalnych lub większych niż długość fali stosowanego światła. Obserwacja rozkładu przestrzennego światła, które uległo transformacji na takim obiekcie w istotny sposób odbiega od przewidywań optyki geometrycznej, która zakłada, iż niezależnie od położenia płaszczyzny obserwacji za obiektem, rozkład ten powinien mieć taki sam rozmiar oraz kształt, jak analizowana apertura. Jednakże, gdy pod uwagę weźmiemy dyfrakcję (ugięcie) światła, czyli zmianę kierunku rozchodzenia się światła po przejściu przez analizowany obiekt w stosunku do początkowego kierunku wiązki oświetlającej, wówczas zrozumiałe staje się, iż założenia optyki geometrycznej są w tym przypadku niepoprawne, a rozkład natężenia światła w płaszczyźnie obserwacji znacznie odbiega od przewidywanego. Według Sommerfelda (jednego z twórców skalarnej teorii dyfrakcji), za dyfrakcję uważać należy każde odstępstwo od prostoliniowego biegu światła, którego nie jesteśmy w stanie wytłumaczyć zjawiskiem odbicia lub załamania. Zgodnie z zasadą Huygensa, każdy punkt apertury, do której dojdzie czoło fali świetlnej stanie się źródłem wtórnych fal świetlnych, lecz wygenerowane fale świetlne będą miały różne fazy (rys. 3.26a).

W konsekwencji nakładające się wtórne fale świetlne będą interferować zarówno konstruktywnie, jak i destruktywnie. Różnica faz pomiędzy tymi falami dla składowych wygenerowanych równoległe do osi optycznej będzie równa zero, dlatego wszystkie będą w fazie i nastąpi interferencja konstruktywna. W przypadku składowych wypromieniowanych w każdym innym kierunku będziemy mieli do czynienia

z różną od zera różnicą faz między nimi, zatem będziemy mieli do czynienia efektami interferencji konstruktywnej lub destruktywnej, w zależności od wartości różnicy faz pomiędzy nimi. Z tego też powodu obserwowany rozkład przestrzenny natężenia światła za aperturą będzie odzwierciedlał kształt apertury, jednakże pojawią się też liczne prążki interferencyjne, co stoi w sprzeczności z optyką geometryczną.



Rys. 3.26. Dyfrakcja fali płaskiej na aperturze kołowej (a) oraz jej obraz dyfrakcyjny (b) w znacznej odległości od apertury

Gdy rozmiary apertury są znacznie większe niż długość fali oświetlającego ją światła, wówczas przyjąć można, iż $\lambda \rightarrow 0$, co odpowiada głównemu założeniu optyki geometrycznej, w tym przypadku obserwowany za aperturą rozkład natężenia światła odpowiada kształtowi przesłony.

Za dyfrakcją uważać należy każde odstępstwo od prostoliniowego biegu światła, którego nie jesteśmy w stanie wytłumaczyć zjawiskiem odbicia lub załamania.

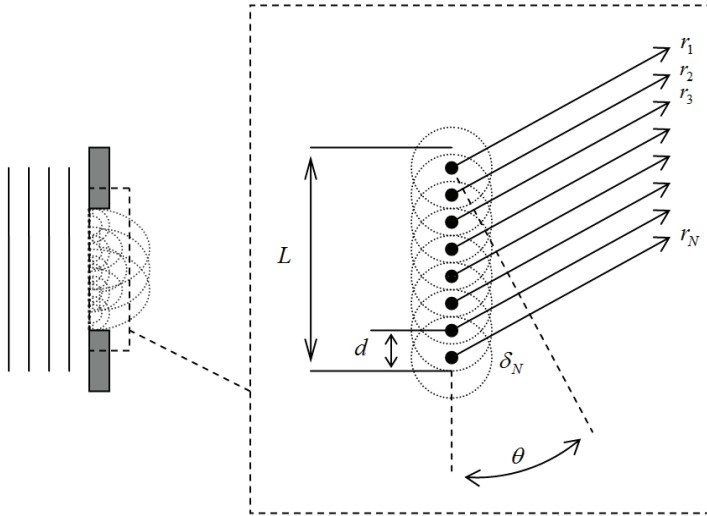
Zgodnie z zasadą Huygensa, każdy punkt przestrzeni, do którego dojdzie czoło fali świetlnej stanie się źródłem wtórnych sferycznych fal świetlnych, lecz wygenerowane fale świetlne będą miały różne fazy.

W wyniku dyfrakcji światła na aperturze mamy do czynienia ze zmianą kierunku propagacji wtórnych fal świetlnych w stosunku do fali padającej na obiekt. Zachodzące wzajemne nakładanie się fal wtórnych powoduje, że obserwowane rozkłady natężenia światła ugiętego na aperturze w znaczny sposób różnią się od kształtu samej apertury.

3.7.1. Dyfrakcja na nieskończenie cienkiej szczelinie

Rozważmy teraz bardziej dokładnie przypadek dyfrakcji światła na nieskończenie cienkiej szczelinie. Jak już wspomniano wcześniej, dyfrakcję możemy wyjaśnić jako rezultat interferencji fal świetlnych wygenerowanych pod pewnym kątem θ przez

wtórne źródła światła, którymi są wszystkie punkty szczeliny. Taki zbiór źródeł możemy traktować jako zbiór koherentnych oscylatorów generujących promieniowanie świetlne o takim samym stanie polaryzacji. Rozpatrzmy zatem przypadek N oscylatorów rozmieszczonych w odległości d od siebie wzdłuż nieskończenie cienkiej szczeliny o długości L (patrz rys. 3.27).



Rys. 3.27. Liniowy układ oscylatorów rozmieszczonych od siebie w odległości d w płaszczyźnie nieskończenie cienkiej szczeliny o długości L

Załóżmy, że względna faza sąsiadujących źródeł świetlnych jest równa zero oraz amplitudy generowanego przez te źródła promieniowania są jednakowe. W płaszczyźnie obserwacji, zlokalizowanej za szczeliną, obserwujemy wówczas superpozycję fal świetlnych wygenerowanych przez każdy oscylator:

$$E = E_o \exp\{i(kr_1 - \omega t)\} + E_o \exp\{i(kr_2 - \omega t)\} + \dots + E_o \exp\{i(kr_N - \omega t)\}. \quad (158)$$

Powyższą zależność możemy również zapisać w następującej postaci:

$$E = E_o e^{\{ikr_1\}} e^{\{-i\omega t\}} \cdot \left[1 + e^{\{ik(r_2-r_1)\}} + e^{\{ik(r_3-r_1)\}} + \dots + e^{\{ik(r_N-r_1)\}} \right]. \quad (159)$$

Wyrażenie $\delta_N = (N-1)\delta = k(r_N - r_1)$ reprezentuje różnicę faz pomiędzy falami generowanymi przez pierwszy i N -ty oscylator. Różnicę dróg optycznych przebytych przez te fale w ośrodku o współczynniku załamania n w stosunku do drogi przebytej przez fale wytworzone przez pierwszy oscylator wyrazić możemy poprzez $\Delta r_N = N(nd \sin \theta)$, zatem elementarna różnica faz wynosi $\delta = kd \sin \theta$. Zależność (159) możemy więc zapisać w następujący sposób:

$$E = E_o e^{\{ikr_1\}} e^{\{-i\omega t\}} \cdot \left[1 + e^{\{i\delta\}} + e^{\{i2\delta\}} + \dots + e^{\{i(N-1)\delta\}} \right]. \quad (160)$$

Korzystając z właściwości ciągu geometrycznego:

$$a_1 + a_1q + a_1q^2 + \dots + a_1q^{N-1},$$

gdzie wyraz początkowy $a_1 = 1$, a iloraz ciągu $q = e^{i\varphi}$, sumę N początkowych wyrazów możemy wyznaczyć zgodnie z zależnością:

$$\sum_{i=1}^N a_i = \frac{a_1(1-q^N)}{1-q}.$$

Zatem suma ta w naszym przypadku przybiera postać:

$$\left[1 + e^{i\delta} + e^{i2\delta} + \dots + e^{i(N-1)\delta}\right] = \frac{1 - e^{iN\delta}}{1 - e^{i\delta}}.$$

Wyrażenie to po następujących przekształceniach może być zapisane jako:

$$\frac{1 - e^{iN\delta}}{1 - e^{i\delta}} = \frac{e^{iN\delta/2} (e^{-iN\delta/2} - e^{iN\delta/2})}{e^{i\delta/2} (e^{-i\delta/2} - e^{i\delta/2})} = e^{i(N-1)\delta/2} \frac{(e^{-iN\delta} - e^{iN\delta/2})}{(e^{-i\delta/2} - e^{i\delta/2})},$$

dotatkowo, jeśli skorzystamy z wzoru Eulera:

$$\sin x = \frac{e^{-ix} - e^{ix}}{2i},$$

otrzymamy

$$\frac{1 - e^{iN\delta}}{1 - e^{i\delta}} = e^{i(N-1)\delta/2} \frac{2i(e^{-iN\delta/2} - e^{iN\delta/2})}{2i(e^{-i\delta/2} - e^{i\delta/2})} = e^{i(N-1)\delta/2} \frac{\sin(N\delta/2)}{\sin(\delta/2)}.$$

W konsekwencji superpozycję fal świetlnych możemy zapisać w następującej postaci:

$$E = E_o e^{i(kr_1)} e^{-i\omega t} \cdot e^{i(N-1)\delta/2} \frac{\sin(N\delta/2)}{\sin(\delta/2)}. \quad (161)$$

Zatem natężenie w płaszczyźnie obserwacji będzie opisane zależnością:

$$I = |E|^2 = EE^* = I_o \frac{\sin^2(N\delta/2)}{\sin^2(\delta/2)}, \quad (162)$$

gdzie $I_o = E_o^2$. Z uwagi na fakt, iż w wyrażeniu (162) występują funkcje sinus o okresowym przebiegu, zatem również rozkład przestrzenny natężenia interferujących fal świetlnych będzie miał charakter okresowy tzn. będzie się składał ze zbioru maksimum oraz minimum natężenia światła, których lokalizacja przestrzenna będzie uzależniona od różnicy faz pomiędzy nimi, jak również od kąta, pod jakim

zostały ugięte fale padające na obiekt. Pierwsze minimum natężenia pojawia się dla $\delta = 2\pi / N$. Innymi słowy minimum to uzyskujemy dla $kd \sin \theta^- = 2\pi / N$. Otrzymujemy wówczas

$$Nd \sin \theta^- = \lambda . \quad (163)$$

Wyrażenie Nd opisuje rozmiar szczeliny. W tym wypadku różnice faz fal pochodzących od wszystkich oscylatorów zmieniają się w zakresie od 0 do 2π . Oznacza to, iż pomimo, że przyczynki od skrajnych oscylatorów są w fazie, to jednak wypadkowa amplituda pochodząca od wszystkich oscylatorów rozmieszczonych wzdłuż szczeliny o długości $L = Nd$ jest równa zero, gdyż wszystkie one wzajemnie się znoszą. W ogólnym przypadku zależność opisująca, pod jakim kątem θ_m^- możemy zaobserwować kolejne minima natężenia ma następującą postać:

$$\sin \theta_m^- = m \frac{\lambda}{L} , \quad (164)$$

gdzie $m = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$

Warto zauważyć, że wraz ze wzrostem długość szczeliny L , przy tej samej długości fali λ stosowanego światła, zmniejsza się będzie wartość kąta θ_m^- , a tym samym minima natężenia będą przesuwać się w kierunku głównego maksimum. Efekt ten można również zaobserwować, zmniejszając długość fali λ , lecz przy zachowanym rozmiarze szczeliny L . Odwrotne zmiany powyższych parametrów sprawią, iż minima będą przesuwać się w przeciwną stronę.

Z kolei maksima natężenia będziemy obserwować, gdy różnica dróg optycznych fal świetlnych wyemitowanych przez sąsiadujące oscylatory będzie całkowitą wielokrotnością długości fali stosowanego światła, wówczas wszystkie przyczynki pochodzące od zbioru oscylatorów będą w fazie:

$$d \sin \theta_m^+ = m\lambda . \quad (165)$$

Pierwsze maksimum pojawia się, gdy różnica faz jest równa zero $\varphi = 0^\circ$, co jest równoznaczne z biegiem wiązki promieni równoległych wzdłuż osi optycznej $\theta = 0^\circ$. Tym samym w zależności (162) otrzymujemy wówczas wyrażenie typu 0/0, jednakże dla nieskończenie małej różnicy faz stosunek kwadratów sinusów jest równy N^2 . Zatem pierwsze maksimum natężenia przyjmuje wartość $N^2 I_0$, gdyż wszystkie składowe fale świetlne są w fazie i następuje ich konstruktywna interferencja.

Podobnie, jak w przypadku minimów, możliwe jest określenie warunku na kąt θ_m^+ , pod jakim zaobserwujemy kolejne maksima:

$$\sin \theta_m^+ = m \frac{\lambda}{d}, \quad (166)$$

gdzie $m = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$

Można zauważyć, że w sytuacji gdy odległość d pomiędzy elementarnymi oscylatorami będzie mniejsza niż λ długość fali stosowanego światła, wówczas może istnieć tylko jedno maksimum zerowego rzędu ($m = 0$). Dzieje się tak, ponieważ funkcja sinus może przyjmować wartości jedynie z przedziału od 0 do 1, dlatego zależność (166) ma sens jedynie dla $m = 0$, gdyż dla $d < \lambda$ stosunek $\lambda/d > 1$.

Gdy różnice faz fal pochodzących od wszystkich oscylatorów zmieniają się w zakresie od 0 do 2π , wówczas $Nd \sin \theta^- = \lambda$. Oznacza to, iż pomimo, że przyczynki od skrajnych oscylatorów są w fazie, to jednak wypadkowa amplituda pochodząca od wszystkich oscylatorów rozmieszczonych wzdłuż szczeliny o długości $L = Nd$ jest równa zero, gdyż wszystkie drgania wzajemnie się znoszą. Obserwujemy wówczas minima dyfrakcyjne.

Minima natężenia światła ugiętego na szczelinie obserwujemy pod kątami $\sin \theta_m^- = m \lambda / L$, gdzie $m = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$

Gdy różnica dróg optycznych fal świetlnych wyemitowanych przez sąsiadujące oscylatory będzie całkowitą wielokrotnością długości fali stosowanego światła, wówczas $d \sin \theta_m^+ = m \lambda$ i obserwujemy wtedy maksima dyfrakcyjne.

Maksima natężenia światła ugiętego na szczelinie obserwujemy pod kątami $\sin \theta_m^+ = m \lambda / d$, gdzie $m = \pm 1, \pm 2, \pm 3, \dots$

3.7.2. Elementy skalarnej teorii dyfrakcji

W ogólnym przypadku do opisu dyfrakcji światła należy stosować wektorową teorię dyfrakcji, która wywodzi się z wektorowego opisu promieniowania elektromagnetycznego. W przypadku, gdy struktury uginające światło są znacznie większe niż długość fali, wówczas możliwe jest odrzucenie wektorowego, kierunkowego opisu zjawiska dyfrakcji światła i zastąpienie go skalarną teorią dyfrakcji. Teoria ta należy do podstawowych zagadnień obejmujących optykę falową, fourierowską, gdzie światło przedstawia się za pomocą odpowiednich przestrzennych i czasowych funkcji skalarnych. W niniejszej części przedstawione zostaną dwa podstawowe przybliżenia skalarnej teorii dyfrakcji: Fresnela i Fraunhofera, które znalazły szerokie zastosowanie w analizie dyfrakcji światła. Oba przybliżenia są uproszczeniem bardziej ogólnych przybliżeń

Kirchhoffa, Kirchhoffa–Helmholtza, Kirchhoffa–Fresnela czy też Rayleigha–Sommerfelda, wynikających z przyjętych założeń co do geometrii układu oraz położenia płaszczyzny obserwacji. Ze względu na charakter niniejszej pracy powyższe przybliżenia nie zostaną tu przedstawione, dlatego też zainteresowanym zaleca się zapoznanie ze specjalistycznymi pozycjami literaturowymi np. [3, 7, 14, 15, 16].

Z uwagi na fakt, iż niezwykle istotną rolę w skalarnej teorii dyfrakcji odgrywa przekształcenie Fouriera, zostanie ono przedstawione w pierwszej kolejności. Najpierw wprowadzone jednak zostaną pewne podstawowe pojęcia oraz nomenklatura, które ułatwią zrozumienie dalszej części, opisującej przybliżenia dyfrakcyjne.

W skalarnej teorii dyfrakcji każde zaburzenie optyczne możemy przedstawić za pomocą odpowiedniej funkcji skalarnej $U(\vec{r}, t)$, która spełnia skalarnie równanie fali o następującej postaci:

$$\nabla^2 U(\vec{r}, t) = \frac{1}{V_n^2} \frac{\partial^2 U(\vec{r}, t)}{\partial t^2}. \quad (167)$$

Funkcję tę można interpretować jako jedną ze składowych wektora natężenia pola elektrycznego bądź wektora natężenia pola magnetycznego (równania (8), (9)). Tym samym zaburzenie optyczne możemy zapisać w następującej postaci:

$$U(\vec{r}, t) = U(\vec{r}) \exp\{-i\omega t\}, \quad (168)$$

gdzie rozkład przestrzenny wielkości $U(\vec{r})$ określamy mianem pola optycznego, amplitudy zespolonej bądź też rozkładem przestrzennym amplitudy zespolonej. Wówczas amplitudy zespolone fal świetlnych możemy zapisać w następującej postaci:

- fala monochromatyczna: $U(\vec{r}, t) = U(\vec{r}) \exp\{-i\omega t\}$,
- fala płaska: $U(\vec{r}) = A \exp\{i\vec{k}\vec{r}\} = A \exp\{i(k_x r_x + k_y r_y + k_z r_z)\}$,
- fal sferyczna: $U(\vec{r}) = \frac{A}{r} \exp\{i\vec{k}\vec{r}\}$.

W powyższych zależnościach, w przypadku fali płaskiej i sferycznej, opuszczono człon eksponentyjny, opisujący zależność czasową, gdyż obie funkcje są monochromatyczne.

W konsekwencji natężenie fali monochromatycznej, czyli moc promienista przypadająca na jednostkę powierzchni, jest niezależna od czasu i opisana zależnością:

$$I(\vec{r}) = |U(\vec{r})|^2 = U(\vec{r})U^*(\vec{r}).$$

3.7.2.1. Przekształcenie Fouriera

W ogólnym przypadku dwuwymiarowej funkcji $f(x, y)$ definicję przekształcenia lub też transformaty Fouriera przedstawić można w następujący sposób:

$$F(f_x, f_y) = \mathfrak{T}\{f(x, y)\} = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} f(x, y) \exp\{-i2\pi(xf_x + yf_y)\} dx dy, \quad (169)$$

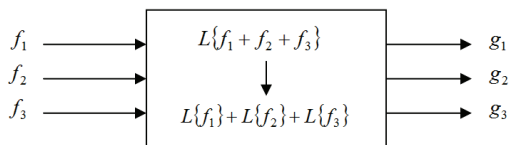
gdzie wielkości f_x, f_y określają częstotliwości przestrzenne, a ich wymiar jest równy m^{-1} , natomiast wyrażenie $F(f_x, f_y)$ przedstawia transformatę Fouriera lub też widmo Fouriera funkcji $f(x, y)$. Z kolei odwrotną transformatę Fouriera opisuje zależność:

$$f(x, y) = \mathfrak{T}^{-1}\{F(f_x, f_y)\} = \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} F(f_x, f_y) \exp\{i2\pi(xf_x + yf_y)\} df_x df_y. \quad (170)$$

Dostatecznymi warunkami realizowalności transformacji Fouriera są [7, 14]:

- bezwzględna całkowalność funkcji podcałkowej,
- skończona liczba punktów i ekstremów,
- brak skoków do nieskończoności.

W teorii optycznego przetwarzania informacji wiele układów optycznych możemy traktować jako układy liniowe, czyli takie, które umożliwiają przeniesienie związków pomiędzy sygnałami wejściowymi na ich odpowiedzi wyjściowe, będące wynikiem transformacji przeprowadzanej przez rozpatrywany układ. Tym samym, jeżeli dany sygnał wejściowy przedstawimy w postaci liniowej kombinacji sygnałów składowych, każda z tych składowych będzie przez układ przetwarzana w ten sam sposób. Proces ten został przedstawiony na rys. 3.28. Operator $L\{\dots\}$ opisuje transformację, jaką przeprowadza układ na każdej składowej sygnału wejściowego f_1, f_2, f_3 . W konsekwencji na wyjściu uzyskujemy odpowiedzi układu na te sygnały $g_1 = L\{f_1\}, g_2 = L\{f_2\}, g_3 = L\{f_3\}$. Operację $L\{\dots\}$ przekształcającą każdą elementarną składową sygnału wejściowego, w optyce przyjęto określać mianem tzw. odpowiedzi impulsowej lub punktowej funkcji rozmycia w przestrzeni (x, y) lub też funkcji przenoszenia układu w przestrzeni (f_x, f_y) , która określa cechy transformującego ce analizowanego układu optycznego.



Rys. 3.28. Schemat działania układu liniowego

W kontekście układów liniowych widzimy zatem, iż niekiedy pomocny jest rozkład skomplikowanego i trudnego do analizy sygnału wejściowego na bardziej proste jego składowe tak, aby możliwe było wyznaczenie odpowiedzi układu na każdą elementarną składową i złożenie ich w odpowiedź tego układu na całkowity sygnał. Od-

wrotną transformatę Fouriera (167) należy zatem rozumieć jako reprezentację sygnału $f(x, y)$ w postaci liniowej kombinacji, w tym przypadku całki elementarnych funkcji postaci $\exp\{i2\pi(xf_x + yf_y)\}$. Liczba zespolona $F(f_x, f_y)$ pełni tu jedynie rolę funkcji wagowej, która musi zostać dodana do tej elementarnej funkcji o częstościach przestrzennych (f_x, f_y) w celu odtworzenia całkowitego sygnału wejściowego $f(x, y)$. Opisana metoda w optyce wykorzystywana jest m.in. do rozłożenia skomplikowanych zaburzeń optycznych na liniową kombinację fal płaskich, czyli innymi słowy na widmo kątowe tego zaburzenia [3, 7, 15, 14].

Każde zaburzenie optyczne można traktować jako liniową kombinację fal płaskich.

Operację przekształcającą każdą elementarną składową sygnału wejściowego, w optyce przyjęto określać mianem **odpowiedzi impulsowej** lub **punktowej funkcji rozmycia** w przestrzeni (x, y) lub też **funkcji przenoszenia układu** w przestrzeni (f_x, f_y)

Odwrotną transformatę Fouriera należy rozumieć jako reprezentację sygnału $f(x, y)$ w postaci liniowej kombinacji, w tym przypadku całki elementarnych funkcji postaci $\exp[i2\pi(xf_x + yf_y)]$. Liczba zespolona $F(f_x, f_y)$ pełni tu jedynie rolę funkcji wagowej, która musi zostać dodana do tej elementarnej funkcji o częstościach przestrzennych (f_x, f_y) w celu odtworzenia całkowitego sygnału wejściowego $f(x, y)$.

3.7.2.2. Przybliżenie Fresnela

W zależności od położenia płaszczyzny obserwacji w stosunku do płaszczyzny przedmiotowej, w której zlokalizowana jest struktura dyfrakcyjna, stosowane są różne przybliżenia dyfrakcyjne. W głównej mierze związane jest to z tym, iż wraz ze wzrostem odległości pomiędzy obiektem uginającym światło (np. aperturą) a płaszczyzną obserwacji, efekty dyfrakcyjne stają się bardziej dostrzegalne. Obserwowane przestrzenne rozkłady natężenia światła ugiętego, czyli widma dyfrakcyjne, podlegają ciągłym, znacznym zmianom, a podobieństwa pomiędzy nimi a aperturą stopniowo zanikają. Jednakże od pewnego położenia płaszczyzny obserwacji wraz ze wzrostem odległości od apertury, zmianie ulega jedynie rozmiar widma dyfrakcyjnego, a nie jego kształt.

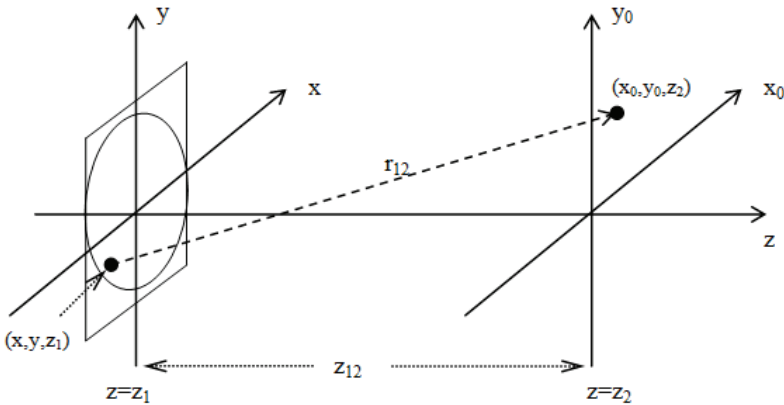
W celu określenia warunków, dla których realizowalne staje się przybliżenie Fresnela, zostanie ono bezpośrednio wyznaczone z całki dyfrakcyjnej Rayleigha–Sommerfelda po wprowadzeniu kilku uproszczeń, wynikających z przyjętych założeń. Taki tok postępowania jest w zupełności uzasadniony, jeśli zauważymy, iż przybliżenie Rayleigha–Sommerfelda pozwala na opisanie zjawiska dyfrakcji w całej prze-

strzeni obserwacji, z kolei przybliżenia Fresnela oraz Fraunhofera są jego szczególnymi przypadkami.

Przestrzenna konfiguracja płaszczyzny przedmiotowej (x, y) oraz obserwacji (x_0, y_0) została przedstawiona na rys. 3.29. Dla układów liniowych całka dyfrakcyjna Rayleigha–Sommerfelda może zostać przedstawiona w postaci całki superpozycji w następującej postaci:

$$U_2(x_0, y_0) = \frac{1}{i\lambda} \iint_{\Sigma} U_1(x, y) \frac{\exp(ikr_{12})}{r_{12}} \frac{z_{12}}{r_{12}} dx dy, \quad (171)$$

gdzie Σ oznacza obszar całkowania, a k liczbę falową (moduł wektora falowego). Dodatkowo wyrażenie z_{12}/r_{12} określa kosinus kierunkowy $\cos(\bar{n}, \bar{r}_{12})$, czyli kosinus kąta pomiędzy wektorem normalnym \bar{n} do powierzchni obiektu a wektorem \bar{r}_{12} .



Rys. 3.29. Geometria układu współrzędnych do analizy dyfrakcji światła:
 (x, y) – płaszczyzna przedmiotowa, (x_0, y_0) – płaszczyzna obserwacji

Odpowiedzią impulsową lub też punktową funkcją rozmycia składowych amplitudy zespolonej $U_1(x, y)$ układu, w naszym przypadku wolnej przestrzeni, jest funkcja $h(x, y; x_0, y_0)$:

$$h(x, y; x_0, y_0) = \frac{1}{i\lambda} \frac{\exp(ikr_{12})}{r_{12}} \cos(\bar{n}, \bar{r}_{12}). \quad (172)$$

Amplituda zespolona $U_2(x_0, y_0)$ może być traktowana jako liniowa superpozycja rozbieżnych fal sferycznych wygenerowanych przez wtórne, punktowe źródła świetlne

obiektu uginającego, z których każda jest modyfikowana przez odpowiednią funkcję wagową $(i\lambda)^{-1}U_1(x, y)$ w odpowiednich punktach przestrzeni.

W celu wyprowadzenia przybliżenia Fresnela konieczne jest wprowadzenie dodatkowych założeń odnośnie rozmiarów poprzecznych analizowanego obszaru obiektu oraz obszaru obserwacji widma dyfrakcyjnego. Jeżeli założymy, że obszary będą niewielkie i będą współśrodkowo zlokalizowane względem osi optycznej z , wówczas będą one znacznie mniejsze niż odległość z_{12} pomiędzy płaszczyzną przedmiotową a płaszczyzną obserwacji. Jeżeli założymy również, że maksymalny promień określający rozmiar poprzeczny analizowanego obiektu wynosi L_1 , a maksymalny promień określający rozmiar widma dyfrakcyjnego w płaszczyźnie obserwacji jest odpowiednio równy L_2 , wówczas prawdziwy jest warunek:

$$\left[(x_0 - x)^2 + (y_0 - y)^2 \right]_{MAX} = (L_1 + L_2)^2, \quad (173)$$

czyli $|z_{12}| \gg L_1 + L_2$ i z kolei $r_{12} \cong z_{12}$, a $\cos(\bar{n}, \bar{r}_{12}) = z_{12}/r_{12} \cong 1$. Ostatecznie warunek stosowalności przybliżenia Fresnela możemy zapisać w następującej postaci:

$$|z_{12}|^3 \gg \left| \frac{\pi(L_1 + L_2)^4}{4\lambda} \right|. \quad (174)$$

Po rozwinięciu wyrażenia k_{12} członu fazowego fali sferycznej w szereg potęgowy, możliwe jest jego ograniczenie do dwóch pierwszych wyrazów:

$$kr_{12} = k \left(z_{12} + \frac{1}{2} \left[\frac{(x_0 - x)^2 + (y_0 - y)^2}{z_{12}} \right]^2 \right).$$

Tym samym całka dyfrakcyjna Rayleigha–Sommerfelda (169) upraszcza się do następującej postaci:

$$U_2(x_o, y_o) = \frac{\exp(ikz_{12})}{i\lambda z_{12}} \times \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} U_1(x, y) \exp \left\{ \frac{ik}{2z_{12}} [(x_0 - x)^2 + (y_0 - y)^2] \right\} dx dy, \quad (175)$$

która opisuje przybliżenie Fresnela. Amplituda zespolona w płaszczyźnie obserwacji jest zatem równa splotowi amplitudy zespolonej $U_1(x, y)$ w płaszczyźnie przedmiotowej z charakterystycznym jądrem transformacji Fresnela – $h(x_0, y_0, x, y)$, czyli punktową funkcją rozmycia dyfrakcji Fresnela równą

$$h_{12}(x, y) = \frac{\exp(ikz_{12})}{i\lambda z_{12}} \times \exp \left\{ \frac{ik}{2z_{12}} [x^2 + y^2] \right\}. \quad (176)$$

Natężenie widma Fresnela jest zatem opisane zależnością:

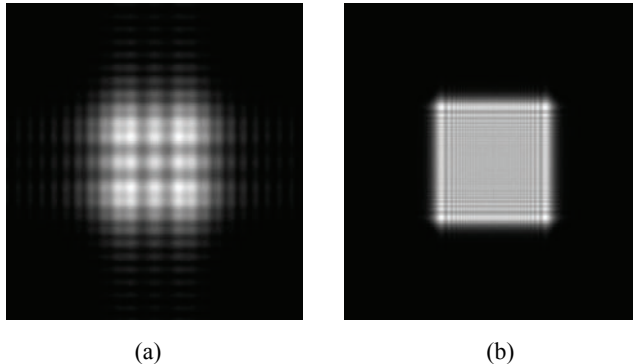
$$\begin{aligned}
 I_2(x_0, y_0) &= |U_2(x_0, y_0)|^2 = \\
 &= \left(\frac{1}{\lambda z_{12}} \right)^2 \left| \int_{-\infty+\infty}^{+\infty+\infty} U_1(x, y) \exp\left\{ \frac{ik}{2z_{12}} (x^2 + y^2) \right\} \exp\left\{ -i2\pi \left[\frac{x_0 x}{\lambda z_{12}} + \frac{y_0 y}{\lambda z_{12}} \right] \right\} dx dy \right|^2 = \\
 &= \left(\frac{1}{\lambda z_{12}} \right)^2 \left| \mathfrak{F} \left\{ U_1(x, y) \exp\left\{ \frac{ik}{2z_{12}} (x^2 + y^2) \right\} \right\} \right|_{f_x=x_0/\lambda z_{12}; f_y=y_0/\lambda z_{12}}^2, \quad (177)
 \end{aligned}$$

gdzie $\mathfrak{F}\{\dots\}$ oznacza dwuwymiarową transformatę Fouriera.

Przykładowe widma Fresnela apertury kwadratowej zostały pokazane na rys. 3.30, gdzie parametr N_F określamy mianem liczby Fresnela i jest on zdefiniowany w następujący sposób:

$$N_F = \frac{w^2}{\lambda z_{12}}, \quad (178)$$

gdzie λ jest długością fali światła, a z_{12} odległością płaszczyzny obserwacji od obiektu. Dyfrakcja Fresnela zachodzi, gdy parametr $N_F \gg 0$.



Rys. 3.30. Przykładowe widma dyfrakcyjnego Fresnela apertury kwadratowej: (a) $N_F = 2.5$; (b) $N_F = 40$

Jeżeli założymy, że maksymalny promień określający rozmiar poprzeczny analizowanego obiektu wynosi L_1 , a maksymalny promień określający rozmiar widma dyfrakcyjnego w płaszczyźnie obserwacji jest odpowiednio równy L_2 wówczas widma dyfrakcyjne Fresnela możemy obserwować w płaszczyznach obserwacji, których odległość od płaszczyzny obiektu uginającego światło spełnia warunek:

$$|z_{12}|^3 \gg \left| \frac{\pi(L_1 + L_2)^4}{4\lambda} \right|.$$

Obszar dyfrakcji Fresnela określa również liczba Fresnela, której wartość $N_F \gg 0$.

Całka dyfrakcyjna Fresnela z dokładnością od pewnych stałych jest transformatą Fouriera rozkładu amplitudy zespolonej fali padającej na obiekt oraz charakterystycznego członu fazy kwadratowej – jądra transformacji Fresnela. Rozkład amplitudy zespolonej fali ugiętej jest splotem amplitudy zespolonej fali padającej z punktową funkcją rozmycia transformacji Fresnela.

Widma Fresnela obiektu uginającego światło w zależności od położenia płaszczyzny obserwacji różnią się między sobą rozkładem przestrzennym, rozmiarem, kształtem.

Pomimo stosowanego powszechnie określenia dyfrakcji Fresnela jako dyfrakcji bliskiego pola, przybliżenie to może być stosowane do całego obszaru przestrzeni obserwacji, rozciągającego się od obiektu uginającego światło do nieskończoności.

Przybliżenie Fresnela stosuje się powszechnie do opisu zjawiska wolnej propagacji światła w przestrzeni.

3.7.2.3. Przybliżenie Fraunhofera

W przypadku przybliżenia Fresnela ograniczyliśmy się jedynie do analizy obszaru paraksjalnego – bliskiego osi optycznej. W celu dalszego uproszczenia obliczeń należy zastosować przybliżenie Fraunhofera. Z wyrażenia opisującego widmo dyfrakcyjne Fresnela widzimy, iż amplituda zespolona w płaszczyźnie obserwacji jest równa z dokładnością do stałej $\exp(ikz_{12}) \cdot (\lambda z_{12})^{-1}$ transformacie Fouriera rozkładu amplitudy zespolonej w płaszczyźnie przedmiotowej oraz czynnika fazy kwadratowej $\exp\{(ik/2z_{12})(x^2 + y^2)\}$. Jeżeli wprowadzimy silniejsze założenie (warunek dyfrakcji Fraunhofera), opisujące zależność pomiędzy położeniem płaszczyzny obserwacji a maksymalnym poprzecznym rozmiarem analizowanego obiektu w płaszczyźnie przedmiotowej L_1 :

$$z_{12} \gg \frac{k(x^2 + y^2)_{MAX}}{2} = \frac{kL_1^2}{2}, \quad (179)$$

wówczas

$$\frac{ik}{z_{12}} \frac{(x^2 + y^2)}{2} \rightarrow 0.$$

Czynnik fazy kwadratowej $\exp\{(ik/2z_{12})(x^2 + y^2)\}$ jest w tym przybliżeniu równy jedności. Przyjęcie powyższego warunku zakładającego, iż odległość płaszczyzny obserwacji od obiektu jest znacznie większa od poprzecznego rozmiaru tego obiektu, na którym światło ulega dyfrakcji, prowadzi do ograniczenia przestrzeni obserwacji, dla której to przybliżenie może być zastosowane. Płaszczyzna Fraunhofera znajduje się więc w nieskończoności, jednakże w praktyce wykorzystuje się soczewkę skupiającą, która przybliży tę płaszczyznę tak, iż jest ona zlokalizowana w płaszczyźnie ogniskowej tej soczewki.

W konsekwencji przyjętego warunku Fraunhofera amplituda zespolona w płaszczyźnie obserwacji jest z dokładnością do stałej $\exp(ikz_{12}) \cdot (\lambda z_{12})^{-1}$ równa transformacji Fouriera rozkładu amplitudy zespolonej w płaszczyźnie przedmiotowej:

$$\begin{aligned} U_2(x_o, y_o) &= \frac{\exp(ikz_{12})}{i\lambda z_{12}} \times \int_{-\infty-\infty}^{+\infty+\infty} U_1(x, y) \exp\left\{-\frac{2\pi i}{\lambda z_{12}} [x_0 x + y_0 y]\right\} dx dy = \\ &= \frac{\exp(ikz_{12})}{i\lambda z_{12}} \times \mathfrak{F}\{U_1(x, y)\} \Big|_{f_x=x_0/\lambda z_{12}; f_y=y_0/\lambda z_{12}}. \end{aligned} \quad (180)$$

Jeżeli założymy, iż badany obiekt oświetlony został przez monochromatyczną falę płaską o amplitudzie M rozchodzącą się wzdłuż osi optycznej, czyli padającą na płaszczyznę przedmiotową pod kątem 90° wówczas amplitudę zespoloną reprezentującą tę falę świetlną możemy zapisać w postaci $U_{wej.}(x, y) = M$. Amplituda zespolona wyjściowej fali świetlej, która uległa transformacji na obiekcie jest określona następującym wyrażeniem $U_{wyj.}(x, y) = U_1(x, y) = Mt(x, y)$. Wówczas przestrzenny rozkład natężenia światła ugiętego w płaszczyźnie obserwacji można przedstawić w następującej postaci:

$$\begin{aligned} I_2(x_o, y_o) &= |U_2(x_o, y_o)|^2 = \\ &= \left(\frac{1}{\lambda z_{12}}\right)^2 \left| \int_{-\infty}^{+\infty} \int_{-\infty}^{+\infty} U_1(x, y) \exp\left\{-i2\pi \left[\frac{x_0 x}{\lambda z_{12}} + \frac{y_0 y}{\lambda z_{12}}\right]\right\} dx dy \right|^2 =, \\ &= \left(\frac{M}{\lambda z_{12}}\right)^2 |\mathfrak{F}\{t(x, y)\}|_{f_x=x_0/\lambda z_{12}; f_y=y_0/\lambda z_{12}}^2. \end{aligned} \quad (181)$$

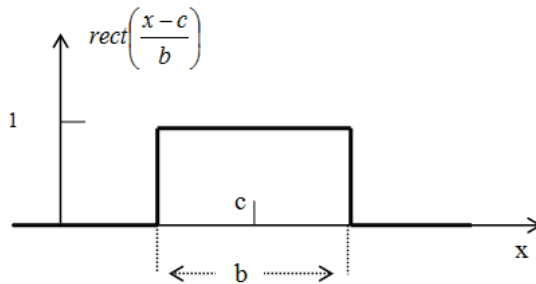
Widzimy zatem, iż w tym przypadku widma dyfrakcyjne w obszarze Fraunhofera mogą być reprezentowane przez widma fourierowskie. W powyższych przekształceniach

niach skorzystaliśmy z cechy transformacji Fouriera, która mówi, iż transformata Fouriera wielkości stałej, w tym przypadku amplitudy fali płaskiej M , jest też wielkością stałą. Powyższe wyrażenie pokazuje, iż widmo Fraunhofera jest odwrotnie proporcjonalne do kwadratu długości fali światła oraz odległości płaszczyzny obserwacji od obiektu. Jednocześnie jest ono również wprost proporcjonalne do kwadratu oświetlonej powierzchni przedmiotowej (w przypadku dwuwymiarowych, binarnych funkcji transmitancji amplitudowej). Z kolei rozmiar poprzeczny widma Fouriera obiektu $T(f_x, f_y) = \mathfrak{F}\{t(x, y)\}$ jest bezpośrednio zależny od długości fali stosowanego światła oraz odległości z_{12} .

Rozważmy zatem przypadek dyfrakcji Fraunhofera na aperturze kwadratowej o szerokości $2w$, którą można opisać funkcją $\text{rect}(x/w)\text{rect}(y/w)$. Dla przypadku jednowymiarowego funkcję tę można zdefiniować w następujący sposób:

$$\text{rect}\left(\frac{x-c}{b}\right) = \begin{cases} 1 & \text{dla } \left|\frac{x-c}{b}\right| \leq 0,5, \\ 0 & \text{dla } \left|\frac{x-c}{b}\right| > 0,5, \end{cases}$$

gdzie b określa szerokość prostokąta, natomiast c położenie środka podstawy (patrz rys. 3.31).



Rys. 3.31. Wykres funkcji prostokątnej

Przy założeniu, że apertura zostanie oświetlona falą płaską $U_{\text{wej.}}(x, y) = M$ o amplitudzie M , propagującą wzdłuż osi z , będącą osią optyczną, wyrażenie (180) przybiera postać:

$$U_2(x_o, y_o) = M \frac{\exp(ikz_{12})}{i\lambda z_{12}} \times \mathfrak{F}\{\text{rect}(x/w)\text{rect}(y/w)\}_{f_x=x_o/\lambda z_{12}; f_y=y_o/\lambda z_{12}} \quad (182)$$

Innymi słowy, z dokładnością do stałej, amplituda zespolona w płaszczyźnie Fraunhofera jest równa transformacie Fouriera apertury kwadratowej.

$$\mathfrak{F}\left\{\text{rect}\left(\frac{x}{w}\right)\text{rect}\left(\frac{y}{w}\right)\right\} = w^2 \frac{\sin(wf_x)}{wf_x} \frac{\sin(wf_y)}{wf_y} = w^2 \text{sinc}(wf_x) \text{sinc}(wf_y), \quad (183)$$

gdzie funkcja $\text{sinc}(\cdot)$ ma postać $\sin x/x$, a częstości przestrzenne mają wymiar $f_x = x_0/\lambda z_{12}$; $f_y = y_0/\lambda z_{12}$. Natężenie widma dyfrakcyjnego Fraunhofera przybiera zatem postać:

$$I_2(x_0, y_0) = \left(\frac{M}{\lambda z_{12}}\right)^2 w^4 \text{sinc}^2\left(\frac{wx_0}{\lambda z_{12}}\right) \text{sinc}^2\left(\frac{wy_0}{\lambda z_{12}}\right). \quad (184)$$

Przykładowy rozkład przestrzenny natężenia widma Fraunhofera rozważanej apertury został przedstawiony na rys. 3.32.



Rys. 3.32. Przykładowy rozkład przestrzenny widma Fraunhofera apertury kwadratowej

Widma dyfrakcyjne Fraunhofera możemy obserwować w płaszczyznach obserwacji, których odległość od płaszczyzny obiektu uginającego światło spełnia warunek:

$$z_{12} \gg \frac{kL_1^2}{2}.$$

Obszar dyfrakcji Fraunhofera jest znacznie bardziej oddalony od obiektu uginającego światło niż obszar dyfrakcji Fresnela.

W dostatecznie dużych odległościach od obiektu przybliżenie Fresnela upraszcza się do przybliżenia Fraunhofera.

Całka dyfrakcyjna Fraunhofera z dokładnością do pewnych stałych jest transformatą Fouriera rozkładu amplitudy zespolonej fali padającej na obiekt, która uległa na nim transformacji.

Widmo Fraunhofera jest odwrotnie proporcjonalne do kwadratu długości fali światła oraz odległości płaszczyzny obserwacji od obiektu. Z kolei rozmiar poprzeczny widma Fouriera obiektu jest bezpośrednio zależny od długości fali stosowanego światła oraz odległości z_{12} .

W odróżnieniu od dyfrakcji Fresnela w obszarze dyfrakcji Fraunhofera wraz ze zmianą położenia płaszczyzny obserwacji zmienia się rozmiar poprzeczny widma, ale jego kształt pozostaje bez zmian.

3.8. Rozpraszanie światła

Rozpraszanie światła jest związane ze zmianą kierunku propagacji fali elektromagnetycznej. Wszystkie ośrodki materialne poza próżnią są w pewnym sensie ośrodkami niejednorodnymi, nawet w ośrodkach powszechnie uważanych za jednorodne (np. gazy, ciecze) znajdują się jakieś niejednorodności (atomy, cząsteczki), dlatego też każdy obiekt materialny rozprasza światło. Rozpraszanie należy zatem do najbardziej powszechnych transformacji światła, gdyż zachodzi zarówno na obiektach mikroskopowych – cząsteczkach, jak również makroskopowych np. wszelkiego rodzaju powierzchniach, niejednorodnościach strukturalnych badanych obiektów itp. Rozpraszanie odpowiedzialne jest za odbicie dyfuzyjne na powierzchni porowatej, dyfrakcję na siatkach, szczelinach, otworach lub też innych obiektach, odbicie zwierciadlane czy załamanie światła na gładkich powierzchniach itp. Widzimy zatem, iż proces rozpraszania światła leży u podstaw przeważającej większości zjawisk fizycznych towarzyszących oddziaływaniu światła z materią. Różnice strukturalne powodują różne rozkłady przestrzenne światła rozproszonego. Tym samym obiekty różniące się cechami morfologicznymi lub optycznymi rozpraszają światło w unikalny sposób, który może posłużyć do charakteryzacji ich właściwości. Analiza światła rozproszonego jest techniką klasyfikującą badane obiekty pod względem ich rozmiaru, kształtu, chropowatości powierzchni oraz lokalnych fluktuacji zespolonego współczynnika załamania.

3.8.1. Podstawy teoretyczne rozpraszania światła

W celu dokładnego wyjaśnienia zjawiska rozpraszania, ponownie odwołamy się do praw elektromagnetyzmu [17, 18, 19]. Dla uproszczenia rozpatrzmy najpierw przypadek rozpraszania światła na pojedynczej cząsteczce. Jeśli stanowi ona zbiór atomów o określonej strukturze elektronowej i podlega działaniu zewnętrznego, oscylacyjnego pola elektromagnetycznego, wówczas dochodzi do wzbudzenia w niej dipoli elek-

trycznych, które drgają z częstością odpowiadającą częstości promieniowania wzbudzającego. Drgające dipole generują promieniowanie elektromagnetyczne, które rozchodzi się we wszystkich możliwych kierunkach. W pewnym konkretnym kierunku (w znacznej odległości od centrum rozpraszającego), całkowite promieniowanie rozproszone może być rozpatrywane jako superpozycja promieniowania wygenerowanego przez każdy dipol, przy założeniu, że rozpraszanie światła na dipolach ma charakter koherentny.

W ogólnym przypadku różnica faz pomiędzy promieniowaniem wytworzonym przez różne dipole zmienia się dla różnych kierunków rozproszenia, dlatego też w wyniku interferencji mamy do czynienia ze zmianami rozkładu przestrzennego światła rozproszonego pod różnymi kątami. Jeżeli cząsteczka, będąca centrum rozpraszającym, jest znacznie mniejsza niż długość fali użytego promieniowania, wówczas promieniowanie wygenerowane przez każdy z jej dipoli jest w fazie i w tym przypadku nie należy spodziewać się znacznych zmian rozkładu przestrzennego światła rozproszonego wraz ze zmianą kąta rozproszenia. Jednakże wraz ze wzrostem rozmiarów cząsteczki opóźnienia fazowe pomiędzy zaburzeniami wygenerowanymi przez dipole są na tyle istotne w stosunku do długości fali, iż nie można ich zaniedbać, wówczas wzrasta możliwość wzmocnienia lub też osłabienia promieniowania rozproszonego w określonych kierunkach, czyli mamy do czynienia ze specyficznym rozkładem maksimów oraz minimów natężenia promieniowania dla określonych kątów rozproszenia.

Istotnym parametrem wpływającym na rozkład kątowy światła rozproszonego jest różnica faz pomiędzy promieniowaniem generowanym przez różne dipole elektryczne cząsteczki. Wielkość ta zależy głównie od czynników geometrycznych takich, jak np. rozmiar, kształt oraz kierunek rozpraszania lub też odległość płaszczyzny obserwacji. Jednocześnie amplituda oraz faza promieniowania generowanego przez dipole ściśle zależy od właściwości fizycznych ośrodka.

Omówiony przypadek odnosił się jedynie do pojedynczej cząsteczki, jednakże jest on słuszny również, gdy mamy do czynienia z rozpraszaniem na obiektach makroskopowych. Należy wówczas pamiętać, iż każdy tego rodzaju obiekt możemy traktować jako zbiór cząsteczek elektromagnetycznie sprzężonych tzn. każda cząsteczka obiektu jest wzbudzana przez zewnętrzne promieniowanie elektromagnetyczne, a wypadkowe promieniowanie należy traktować jako superpozycję promieniowania wygenerowanego przez dipole każdej cząsteczki ośrodka. W przypadku pojedynczego rozproszenia promieniowania elektromagnetycznego na dostatecznie odległych od siebie małych cząsteczkach, w dostatecznie dużej odległości, możemy założyć, że promieniowanie rozproszone jest pomijalne w porównaniu z promieniowaniem wzbudzającym, zatem całkowite promieniowanie rozproszone może być traktowane jako suma promieniowania rozproszonego na każdej cząsteczce, gdy pominiemy wzajemne oddziaływanie cząstek. Jest to sytuacja wyidealizowana, gdyż niemożliwe jest wzajemne odizolowanie cząsteczek danego ośrodka.

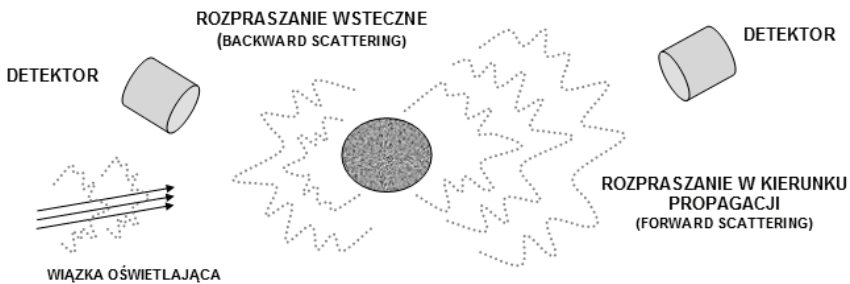
Jednocześnie w większości przypadków mamy do czynienia z wielokrotnym rozpraszaniem. W sytuacji, gdy mamy do czynienia z wieloma cząstkami, losowo rozmieszczonymi, wówczas światło rozproszone jest niekoherentne, gdyż nie ma uporządkowanej zależności pomiędzy różnicami faz promieniowania rozproszonego przez te cząsteczki. Należy dodatkowo podkreślić, iż zjawisko rozpraszania silnie zależy również od właściwości absorpcyjnych ośrodka, gdyż w wyniku pochłaniania całkowita energia promieniowania rozproszonego różni się od energii promieniowania wzbudzającego np. w sytuacji, gdy zaabsorbowana energia nie zostanie wyemitowana w postaci promieniowania świetlnego, lecz przekształci się w inny rodzaj energii, a cząstka powróci do stanu równowagowego na drodze przejść bezpromienistych.

Widzimy zatem, iż zjawisko rozpraszania jest związane z absorpcją promieniowania elektromagnetycznego, jak również z jego reemisją przez analizowany ośrodek materialny.

3.8.2. Rodzaje rozpraszania światła

3.8.2.1. Podział rozpraszania światła ze względu na kierunek rozpraszania

W ogólnym przypadku, gdy na dany obiekt pada wiązka świetlna, wówczas w zależności od kierunku rozproszenia mamy do czynienia z **rozpraszaniem w kierunku propagacji** dla $\theta_{\text{rozp.}} = 0^\circ$ (ang. *forward scattering*) oraz **rozpraszaniem w kierunku wstecznym** dla $\theta_{\text{rozp.}} = 180^\circ$ (ang. *backward scattering*) w stosunku do kierunku rozchodzenia się wiązki oświetlającej obiekt (patrz rys. 3.33).



Rys. 3.33. Schematyczne przedstawienie zjawiska rozpraszania światła na centrum rozpraszającym

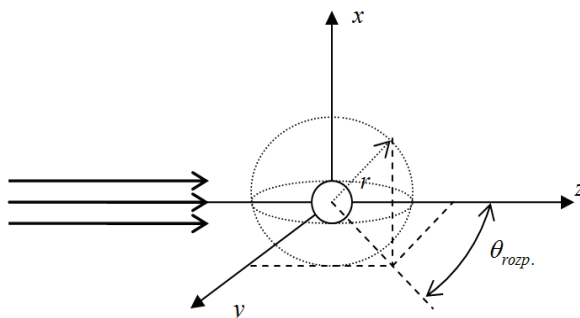
Światło rozproszone w kierunku propagacji jest w głównej mierze związane z efektami dyfrakcyjnymi, zależącymi od kształtu, rozmiaru, koncentracji oraz lokalizacji przestrzennej centrów rozpraszających, podczas gdy światło rozproszone wstecznie związane jest z bardziej subtelnymi cechami badanych obiektów, jak np. z przestrzennym rozkładem współczynnika załamania [20].

3.8.2.2. Podział rozpraszania światła ze względu na wielkość centrów rozpraszających

W opisie podstaw teoretycznych rozpraszania światła zaznaczyliśmy, iż rozkład przestrzenny światła rozproszonego na centrach rozpraszających jest uzależniony od ich rozmiarów. Gdy rozmiary są znacznie mniejsze od długości fali użytego światła, wówczas fale generowane przez elementarne dipole obiektu są w fazie i mamy zawsze do czynienia z ich superpozycją konstruktywną oraz stałą zależnością kątową natężenia światła rozproszonego. W przypadku, gdy rozmiary obiektu wzrastają, wówczas rozkład przestrzenny światła rozproszonego podlega zarówno superpozycji konstruktywnej, jak i destruktywnej, a natężenie światła rozproszonego zależy od kąta rozproszenia. Jednocześnie w zależności od rozmiarów centrum rozpraszającego lub zbioru centrów, możemy mieć do czynienia z przewagą rozpraszania w kierunku propagacji, w kierunku wstecznym lub też we wszystkich możliwych kierunkach. Poniżej przedstawiony zostanie podział rozpraszania ze względu na rozmiary obiektów, na których światło jest rozpraszane [1, 11].

Gdy rozmiary centrum rozpraszającego są mniejsze niż $0,01\lambda$, dominuje głównie rozpraszanie w kierunku propagacji. Zmiany fazowe generowane przez obiekt są pomijalne, tym samym nie obserwujemy fal rozproszonych w kierunku innym niż początkowy kierunek propagacji.

Dla obiektów o rozmiarach mniejszych (większych od $0,01\lambda$, lecz mniejszych niż $0,1\lambda$) niż długość fali światła rozpraszanego mamy do czynienia z **rozpraszaniem Rayleigha**.



Rys. 3.34. Schemat rozpraszania na pojedynczym centrum rozpraszającym (objaśnienia w tekście)

Przyjmijmy, iż płaszczyzna obserwacji jest określona przez kierunek padającego oraz rozproszonego promieniowania świetlnego. Jeżeli analizujemy rozpraszanie światła na pojedynczym centrum rozpraszającym o średnicy r mniejszej niż długość fali padającego światła (patrz rys. 3.34), wówczas natężenie światła rozproszonego dla składowej prostopadłej oraz równoległej do płaszczyzny obserwacji możemy zapisać w następującej postaci:

$$I_{\parallel} = I_{0\parallel} \left(\frac{\alpha}{r} \right)^2 \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^4, \quad (185)$$

$$I_{\perp} = I_{0\perp} \left(\frac{\alpha}{r} \right)^2 \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^4 \cos^2(\theta_{\text{rozp}}), \quad (186)$$

gdzie α oznacza polaryzowalność ośrodka, a θ_{rozp} kąt, pod jakim następuje rozproszenie światła.

Wypadkowe natężenie światła rozproszonego wynosić będzie:

$$I = I_{\parallel} + I_{\perp} = (I_{0\parallel} + I_{0\perp} \cos^2(\theta_{\text{rozp}})) \left(\frac{\alpha}{r} \right)^2 \left(\frac{2\pi}{\lambda} \right)^4. \quad (187)$$

Jeżeli fala padająca na centrum rozpraszające jest spolaryzowana liniowo, wówczas najsilniejsze rozpraszanie zachodzi w płaszczyźnie prostopadłej do kierunku drgań wektora natężenia pola elektrycznego fali padającej. Nie występuje natomiast rozpraszanie w kierunku prostopadłym do kierunku propagacji oraz wzdłuż kierunku drgań wektora natężenia pola elektrycznego fali padającej oraz dipola elektrycznego, emitującego promieniowanie rozproszone. Rozkład kątowy światła rozproszonego jest symetryczny względem osi elementarnego centrum rozpraszającego, która jest równoległa do kierunku drgań wektora natężenia pola elektrycznego fali padającej (patrz rys. 3.35).

Dodatkowo światło rozproszone jest spolaryzowane, gdyż wektor natężenia pola elektrycznego drga w kierunku równoległym do drgań elementarnego dipola elektrycznego, emitującego to promieniowanie. Kątowe rozkłady natężenia światła rozproszonego przyjęto się określać mianem indykatrys rozproszenia.

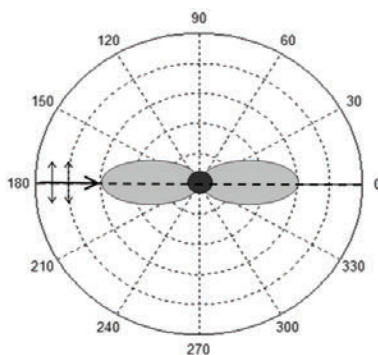
Rozkład kątowy światła rozproszonego jest symetryczny osiowo względem kierunku propagacji (patrz rys. 3.36a). Światło rozproszone w kierunku propagacji ma takie samo natężenie, jak światło rozproszone wstecznie, a ich rozkład jest symetryczny względem centrum rozpraszającego. Ponieważ nie ma jednoznacznie określonego kierunku drgań wektora natężenia pola elektrycznego fali padającej, zatem rozpraszanie zachodzi we wszystkich kierunkach.

Dodatkowo rozpraszanie fali niespolaryzowanej na centrum rozpraszającym prowadzi do wygenerowania promieniowania częściowo spolaryzowanego, którego stopień polaryzacji P jest funkcją kąta rozproszenia.

$$P = \frac{1 - \cos^2 \theta_{\text{rozp}}}{1 + \cos^2 \theta_{\text{rozp}}}. \quad (188)$$

Dla $\theta_{\text{rozp}} = 0^\circ$ oraz $\theta_{\text{rozp}} = 180^\circ$ natężenia składowych prostopadłej oraz równoległej do płaszczyzny obserwacji są jednakowe. We wszystkich innych kierunkach większe

jest natężenie składowej prostopadłej I_{\perp} do płaszczyzny obserwacji. W szczególności światło rozproszone jest całkowicie spolaryzowane dla kąta rozproszenia $\theta_{\text{rozp}} = 90^{\circ}$, a jego wektor natężenia pola elektrycznego drga w kierunku prostopadłym do płaszczyzny obserwacji.

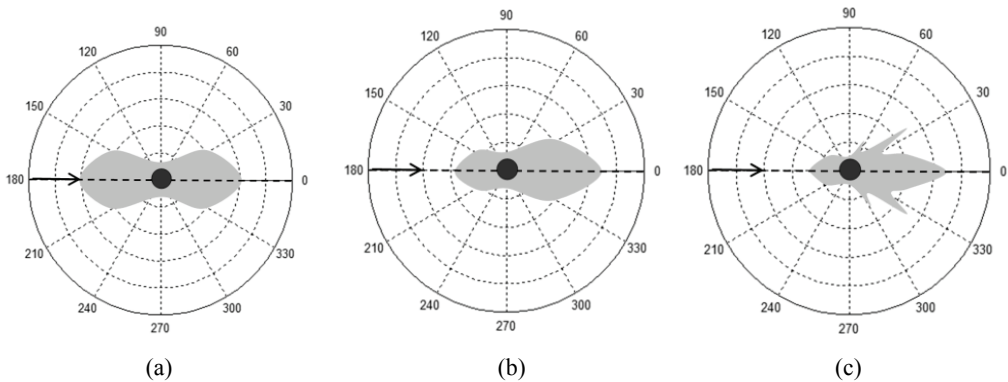


Rys. 3.35. Kątowy rozkład światła rozproszonego na cząstkach o wymiarach mniejszych od $0,1 \lambda$, fali spolaryzowanej liniowo (strzałki określają kierunek drgań)

Reasumując, w przypadku rozpraszania Rayleigha natężenie światła rozproszonego jest odwrotnie proporcjonalne do czwartej potęgi długości fali oraz zależy od koncentracji cząstek, emitujących promieniowanie wtórne. Widzimy zatem, iż w przypadku tego rodzaju rozpraszania fale krótsze są rozpraszane silniej niż fale dłuższe. Światło rozproszone w kierunku propagacji ma takie samo natężenie, jak światło rozproszone wstecznie, a dodatkowo rozkład kątowy natężenia światła rozproszonego (indykatrysa rozproszenia) jest symetryczny względem centrum rozpraszającego.

Gdy rozmiary obiektu są porównywalne lub większe niż długość fali światła, mamy do czynienia z bardziej złożonym oddziaływaniem światła z centrami rozpraszającymi, które generują wtórne fale świetlne. Każdy obiekt składa się z wielu cząstek, których dipole elektryczne po wzbudzeniu przez padającą falę świetlną, generują wtórne fale świetlne – światło rozproszone. W tym przypadku należy uwzględnić różnice faz pomiędzy promieniowaniem generowanym przez elementarne centra rozpraszające (dipole elektryczne) oraz różnice faz związane ze skończoną odległością pomiędzy nimi.

Te różnice fazowe związane ze znacznymi, w skali długości fali, rozmiarami obiektów sprawiają, iż mamy tu do czynienia ze zjawiskiem interferencji konstruktywnej lub destruktywnej. Proces ten prowadzi do generacji wysoce skomplikowanego rozkładu przestrzennego światła rozproszonego. Interferencja światła rozproszonego zależy od odległości między elementarnymi centrami rozpraszającymi i odległością pomiędzy płaszczyzną obiektu a płaszczyzną obserwacji.



Rys. 3.36. Schematyczne przedstawienie kąowego rozkładu natężenia niespolaryzowanej fali światła rozproszonego przez centrum rozpraszające: (a) $a < 0,1\lambda$; (b) $a \sim \lambda/4$; (c) $a > \lambda$

Rozkład kąowy natężenia powstały w wyniku tej interferencji jest bardziej nieregularny, aczkolwiek skoncentrowany w kierunku propagacji (patrz rys. 3.36b i c). Ten rodzaj rozpraszania nazywamy **rozpraszaniem Mie**.

W ogólności dotyczy ono obiektów o kształcie sferycznym lub cylindrycznym. Przybliżenie to można jednak stosować również do cząstek o innych kształtach oraz rozmiarach w stosunku do długości fali stosowanego promieniowania. Istotną rolę odgrywa stosunek wymiaru poprzecznego a cząstki do długości fali λ opisany w następujący sposób: $D = ka = 2\pi a/\lambda$, gdyż jego wartość pozwala przewidzieć rozkład kąowy natężenia światła rozproszonego.

Dla $D < 0,2$ mamy do czynienia z rozpraszaniem Rayleigha, czyli symetrycznym rozkładem kąowym natężenia światła rozproszonego. Dla wzrastających wartości parametru D obserwuje się coraz większą asymetrię pomiędzy rozpraszaniem w kierunku propagacji oraz rozpraszaniem wstecznym. W tym przypadku przeważa rozpraszanie w kierunku propagacji. Początkowo nie obserwujemy znacznych zmian intensywności wywołanych zjawiskiem interferencji (patrz rys. 3.36b). Dla większych wartości tego parametru ($D > \lambda$) w dalszym ciągu przeważa rozpraszanie w kierunku propagacji, jednakże widoczny jest już wpływ interferencji wywołanej przez różnice fazowe związane z dużymi rozmiarami obiektu rozpraszającego w porównaniu do długości fali światła (patrz rys. 3.36c). Również w tym przypadku mamy do czynienia z częściową polaryzacją światła rozproszonego, która zależy o kierunku obserwacji oraz właściwości optycznych obiektu. W przypadku spolaryzowanej fali padającej, polaryzacja światła rozproszonego, zależy również od kierunku drgań wektora natężenia pola elektrycznego tej fali.

Z kolei, gdy wielkość przedmiotu rozpraszającego jest znacznie większa od długości fali światła, wtórny rozkład przestrzenny światła możemy analizować w oparciu o optykę geometryczną lub też dyfrakcyjną.

Istotną rolę odgrywa stosunek wymiaru poprzecznego a cząstki do długości fali λ opisany w następujący sposób: $D = ka = 2\pi a/\lambda$, gdyż jego wartość pozwala przewidzieć rozkład kątowy natężenia światła rozproszonego.

Gdy rozmiary centrum rozpraszającego są mniejsze niż $0,01 \lambda$, dominuje głównie rozpraszanie w kierunku propagacji. Zmiany fazowe generowane przez obiekt są pomijalne, tym samym nie obserwujemy fal rozproszonych w kierunku innym niż początkowy kierunek propagacji.

Dla obiektów o rozmiarach mniejszych (większych od $0,01\lambda$, lecz mniejszych niż $0,1\lambda$) niż długość fali światła rozpraszanego mamy do czynienia z **rozpraszaniem Rayleigha**.

Jeżeli fala padająca na centrum rozpraszające jest spolaryzowana liniowo, wówczas najsilniejsze rozpraszanie zachodzi w płaszczyźnie prostopadłej do kierunku drgań wektora natężenia pola elektrycznego fali padającej.

Rozkład kątowy światła rozproszonego jest symetryczny względem osi elementarnego centrum rozpraszającego, a światło rozproszone jest spolaryzowane.

Jeżeli padające na centrum rozpraszające światło jest niespolaryzowane, wówczas indykatrysa rozproszenia jest symetryczna osiowo względem kierunku propagacji. Światło rozproszone w kierunku propagacji ma takie samo natężenie, jak światło rozproszone wstecznie, a ich rozkład jest symetryczny względem centrum rozpraszającego.

Rozpraszanie fali niespolaryzowanej na centrum rozpraszającym prowadzi do wygenerowania promieniowania częściowo spolaryzowanego.

Gdy rozmiary obiektu są porównywalne lub większe niż długość fali światła, mamy do czynienia z **rozpraszaniem Mie**. Rozkład kątowy natężenia powstały w wyniku tej interferencji jest bardziej nieregularny, lecz dalej skoncentrowany w kierunku propagacji. Również w tym przypadku mamy do czynienia z częściową polaryzacją światła rozproszonego, która zależy o kierunku obserwacji oraz właściwości optycznych obiektu. W przypadku spolaryzowanej fali padającej, polaryzacja światła rozproszonego, zależy również od kierunku drgań wektora natężenia pola elektrycznego tej fali.

3.8.2.3. Podział rozpraszania światła ze względu na sposób wymiany energii

Pochłonięta energia świetlna może być w całości wyemitowana przez ośrodek w postaci promieniowania wtórnego, jednakże część tej energii może zostać przez ośrodek częściowo zamieniona na inny rodzaj energii niż energia świetlna (np. ciepło), podczas gdy reszta energii zostanie wypromieniowana. Jeżeli rozpatrzemy ten przypadek w kontekście korpuskularnej natury światła, wówczas fotony padające na daną molekułę w wyniku zderzenia, zmieniają swój kierunek ruchu, czyli ulegają rozproszeniu. W ogólnym przypadku rozproszone fotony zachowują swoją energię, czyli nie zmieniają częstotliwości oraz długości fali promieniowania elektromagnetycznego. Mamy wówczas do czynienia z **rozpraszaniem elastycznym**. Jeżeli jednak część spośród nich w wyniku kolizji z centrum rozpraszającym zmieni swoją energię, czyli zajdzie *efekt Ramana*, mamy wówczas do czynienia z **rozpraszaniem nieelastycznym** (rozpraszaniem Ramana).

Każda cząsteczka ma dyskretne poziomy energii, a efekt Ramana tłumaczy się przejściami pomiędzy oscylacyjnymi poziomami tej molekuly. Jeżeli częstotliwości fotonu padającego oraz rozproszonego nieelastycznie wynoszą odpowiednio ν_o oraz ν_{rozp} , a E_o oraz E_w opisują energię początkową cząsteczki oraz energię po zderzeniu, wówczas, zgodnie z zasadą zachowania energii, prawdziwa jest następująca relacja:

$$h\nu_o + E_o = h\nu_{rozp} + E_w \quad (189)$$

lub

$$\Delta E = E_w - E_o = h(\nu_o - \nu_{rozp}) = h\Delta\nu. \quad (190)$$

Wyrażenie ΔE opisuje różnicę pomiędzy dwoma stacjonarnymi stanami energii cząstki, zatem przesunięcie Ramana $\Delta\nu$ charakteryzuje tę różnicę poziomów energetycznych, a tym samym badany ośrodek.

Przy odpowiednio dużym natężeniu promieniowania może nastąpić rozpraszanie Ramana, które prowadzi do zmiany częstotliwości promieniowania rozproszonego w stosunku do promieniowania wzbudzającego do wartości $\nu_0 \pm \Delta\nu$, gdzie $\Delta\nu$ oznacza pobranie i odpowiednio oddanie energii z molekuł wykazujących rotacje i oscylacje. W tym przypadku sygnał wzbudzający zdefiniowany przez ν_0 nie musi spełniać warunku rezonansu, tzn. nie jest dopasowany do różnicy energii pomiędzy stanem podstawowym a wzbudzonym molekuly.

W przypadku, gdy emitowany jest foton o mniejszej energii $E = h(\nu_0 - \Delta\nu)$ w stosunku do fotonu wzbudzającego, wówczas część zaabsorbowanej przez cząstkę energii jest wykorzystywana do przejścia na wyższy poziom oscylacyjny, wówczas mówimy o rozpraszaniu stokesowskim. Natomiast w sytuacji, gdy foton jest absorbowany przez cząstkę znajdującą się na wzbudzonym poziomie oscylacyjnym, a po absorpcji powraca ona na niższy poziom wibracyjny, wówczas energia fotonu wyemitowanego

wanego przez nią ma energię większą $E = h(\nu_0 + \Delta\nu)$ w stosunku do energii fotonu wzbudzającego. W tym przypadku mamy do czynienia z rozpraszaniem antystokesowskim. Zazwyczaj promieniowanie rozproszone nieelastycznie jest bardzo słabe – ok. 0,001% natężenia promieniowania wzbudzającego.

Gdy podczas rozpraszania nie ma wymiany energii pomiędzy światłem a centrum rozpraszającym, wówczas mamy do czynienia z **rozpraszaniem elastycznym** (sprężystym).

Gdy wymiana energii podczas rozpraszania ma miejsce, takie rozpraszanie nosi miano **rozpraszania nieelastycznego** (niesprężystego) lub Ramana.

W przypadku, gdy emitowany jest foton o mniejszej energii $E = h(\nu_0 - \Delta\nu)$ w stosunku do fotonu wzbudzającego, wówczas część zaabsorbowanej przez cząstkę energii jest wykorzystywana do przejścia na wyższy poziom oscylacyjny, wówczas mówimy o **rozpraszaniu stokesowskim**.

W przypadku, gdy foton jest absorbowany przez cząstkę znajdującą się na wzbudzonym poziomie oscylacyjnym, a po absorpcji powraca ona na niższy poziom vibracyjny, wówczas energia fotonu wyemitowanego przez nią ma energię większą $E = h(\nu_0 + \Delta\nu)$ w stosunku do energii fotonu wzbudzającego, wówczas mówimy o **rozpraszaniu antystokesowskim**.

3.8.3. Jakościowy opis rozpraszania światła oraz właściwości rozpraszających ośrodka

Rozpraszanie światła zależy od właściwości optycznych, jak również cech geometrycznych ośrodka, na które pada światło. Dlatego konieczne jest wprowadzenie pewnego rodzaju charakterystyk oraz wielkości opisujących, zarówno przestrzenną transformację światła, jak również właściwości rozpraszające badanych ośrodków.

3.8.3.1. Opis rozkładu przestrzennego światła rozproszonego

Jak już to było wspomniane powyżej, natężenie światła rozproszonego $I(\theta_{\text{rozp}})$ w ogólnym przypadku należy rozpatrywać w odniesieniu do konkretnego kąta rozproszenia θ_{rozp} . Prawdopodobieństwo rozproszenia fotonu jest największe dla początkowego kierunku rozchodzenia się światła (*forward scattering*). Zazwyczaj w celu charakteryzacji kąтового rozkładu prawdopodobieństwa rozproszenia fotonu pod danym kątem θ_{rozp} , wprowadza się tzw. funkcję fazową rozproszenia $p(\theta_{\text{rozp}})$ [17, 19], gdzie kąt rozproszenia θ_{rozp} oznacza kąt, pod jakim rozproszony został foton w stosunku do

początkowego kierunku jego propagacji. Często do opisu funkcji fazowej stosuje się różnego rodzaju przybliżenia, a jednym z nich jest funkcja Henyeya–Greensteina [10], która jest zdefiniowana w następujący sposób:

$$p(\theta_{\text{rozp}}) = \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos(\theta_{\text{rozp}}))^{3/2}}, \quad (191)$$

gdzie współczynnik g określany jest mianem bezwymiarowego współczynnika anizotropii i rozumiany jest jako średni kosinus kąta rozproszenia fotonu na centrum rozpraszającym:

$$g = \langle \cos(\theta_{\text{rozp}}) \rangle. \quad (192)$$

Przyjmuje on wartość od -1 do 1 i określa kątowy rozkład rozpraszania światła. W przypadku całkowitego wstecznego rozproszenia współczynnik ten jest równy -1 , podczas gdy dla całkowitego rozpraszania w kierunku propagacji wynosi 1 . Rozpraszanie izotropowe, czyli we wszystkich kierunkach zachodzi w sytuacji, gdy współczynnik ten jest równy 0 .

Można również powiedzieć intuicyjnie, iż g informuje, pod jakim kątem statystycznie ujmując, ma miejsce rozpraszanie światła. Parametr g możemy też powiązać w bezpośredni sposób z funkcją fazową następująco:

$$g = \int_{4\pi} p(\theta_{\text{rozp}}) \cos(\theta_{\text{rozp}}) d\theta_{\text{rozp}}. \quad (193)$$

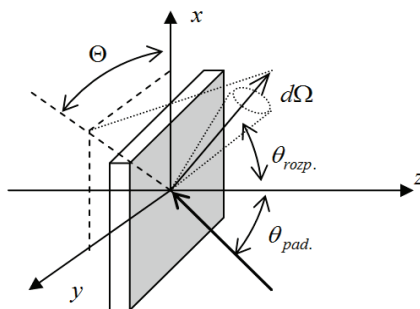
Podstawową cechą funkcji fazowej jest to, iż jej całka po pełnym kącie bryłowym jest równa jedności.

W przypadku powierzchni rozpraszających przestrzenny rozkład natężenia światła rozproszonego można opisać również w nieco inny sposób. Rozważmy zatem sytuację przedstawioną na rys. 3.37. Dla danego kąta padania θ_{pad} rozkład ten będzie funkcją biegunowego kąta rozproszenia θ_{rozp} oraz azymutalnego kąta rozproszenia \mathcal{C} . Wówczas funkcję opisującą rozkład przestrzenny natężenia światła rozproszonego oznacza się *BSDF* (*bidirectional scatter distribution function*) [21, 22, 18]. Może być ona zdefiniowana jako stosunek luminancji, w określonym kierunku rozproszenia, do mocy promienistej padającej na jednostkę powierzchni, czyli natężenia napromienienia. Luminancję określa się w kierunku rozproszenia wewnątrz kąta bryłowego $d\Omega$. Zależność opisująca *BSDF* ma wówczas postać [21]:

$$BSDF = \frac{L}{P/S} = \frac{dP/d\Omega}{P \cos \theta_{\text{rozp}}} = 16 \frac{\pi^2}{\lambda^4} \cos(\theta_{\text{pad}}) \cos(\theta_{\text{rozp}}) QS(f_x, f_y), \quad (194)$$

gdzie L – luminancja oświetlanej powierzchni, w określonym kierunku rozproszenia, S – pole oświetlonej powierzchni, dP – moc promienista rozproszona w kącie bryłowym $d\Omega$, Q – bezwymiarowy czynnik zależny od azymutalnego kąta rozproszenia,

$S(f_x, f_y)$ dwuwymiarowa funkcja gęstości widmowej mocy powierzchni rozpraszającej, a f_x, f_y – częstości przestrzenne.



Rys. 3.37. Schemat rozpraszania światła na powierzchni

3.8.3.2. Opis właściwości rozpraszających ośrodka

Poniżej przedstawione zostaną główne wielkości fizyczne charakteryzujące właściwości rozpraszające ośrodka [11]. Współczynnik rozpraszania μ_s określa prawdopodobieństwo rozproszenia fotonu na jednostkowej drodze. Można go też zdefiniować jako stratę natężenia promieniowania na jednostkowej drodze na skutek rozpraszania, czy też liczbę procesów rozpraszania N_{rozp} na drodze d w próbce:

$$\mu_s = \frac{N_{rozp}}{d} \quad [\text{cm}^{-1}]. \quad (195)$$

Jednostką tego współczynnika jest cm^{-1} . Jego odwrotność określa średnią drogę swobodną δ_s pomiędzy kolejnymi aktami rozpraszania:

$$\delta_s = \frac{1}{\mu_s} \quad [\text{cm}]. \quad (196)$$

W przypadku wielokrotnego rozpraszania foton „traci pamięć” o pierwotnym kierunku propagacji tzn. rozpraszanie ma całkowicie losowy kierunek. Tym samym, każdy akt rozproszenia prowadzący do zmiany kierunku propagacji sprawia, iż po przebyciu drogi kilku milimetrów w ośrodku można założyć izotropowy rozkład natężenia światła rozproszonego we wszystkich możliwych kierunkach.

Użytecznym parametrem do opisu tego procesu jest zredukowany współczynnik rozpraszania μ'_s , który może być opisany zależnością:

$$\mu'_s = \mu_s(1 - g) \quad [\text{cm}^{-1}]. \quad (197)$$

Parametr ten określa drogę, którą musi przebyć foton, by kierunek jego propagacji był przypadkowy.

Kolejnym parametrem jest całkowity współczynnik tłumienia μ_T , który jest równy sumie współczynnika rozpraszania μ_s oraz współczynnika absorpcji μ_a :

$$\mu_T = \mu_s + \mu_a \quad [\text{cm}^{-1}]. \quad (198)$$

Parametr ten informuje o prawdopodobieństwie zajścia rozpraszania i/lub absorpcji na jednostkowej drodze, jaką foton pokonuje w ośrodku. Odwrotność całkowitego współczynnika tłumienia określa średnią drogę swobodną pomiędzy aktami rozpraszania i absorpcji:

$$\delta_T = \frac{1}{\mu_T} \quad [\text{cm}]. \quad (199)$$

W tkankach miękkich foton zanim zostanie rozproszony lub zaabsorbowany przebywa około 10–100 μm .

Bezwymiarowy współczynnik albedo a , który definiować można jako stosunek współczynnika rozpraszania i całkowitego współczynnika tłumienia, opisuje zależność:

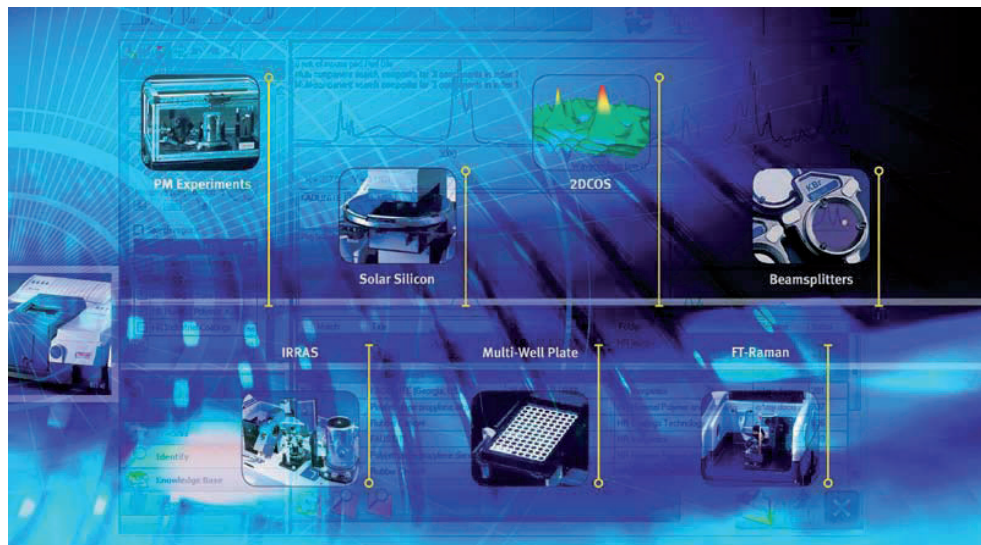
$$a = \frac{\mu_s}{\mu_a}. \quad (200)$$

Parametr ten w sposób ilościowy opisuje efektywność procesów rozpraszania i absorpcji światła rozchodzącego się w danym ośrodku. Gdy jego wartość jest zbliżona do jedności, wówczas parametr ten informuje nas, że mamy do czynienia z ośrodkiem silnie rozpraszającym, a gdy jego wartość jest zbliżona do zera, mamy do czynienia z ośrodkiem silnie pochłaniającym światło.

Literatura

- [1] HECHT E., *Optics*, 4ed, Addison Wesley, New York 2002.
- [2] FEYNMAN R.P., LEIGHTON R.B., SANDS M., *Feynmana wykłady z fizyki*, tom 1.2, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2003.
- [3] JAGOSZEWSKI E., *Wstęp do optyki inżynierskiej*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2008.
- [4] NOWAK J., ZAJĄC M., *Optyka- kurs elementarny*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1998.
- [5] SOJECKI A., *Optyka*, Wydawnictwo Szkolne i Pedagogiczne, Katowice 1977.
- [6] SMITH F.G., KING T.A., *Optics and Photonics: An Introduction*, John Wiley & Sons Ltd., New York 2000.
- [7] WILK I., WILK P., *Optyka fizyczna*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1995.
- [8] MEYER ARENDT J.R., *Wstęp do optyki*, Państwowe Wydawnictwo Naukowe, Warszawa 1977.
- [9] RATAJCZYK F., *Optyka ośrodków anizotropowych*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1994.

- [10] PODBIELSKA H., *Metody optyczne w fizyce środowiska*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1996.
- [11] BEDNARKIEWICZ A., STRĘK W., *Oddziaływanie światła laserowego z tkanką*, [w]: *Diagnostyka i terapia fotodynamiczna*, red. H. Podbielska, A. Sieroń, W. Stręk, Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2004, 33–89.
- [12] GAWLIK W., *Spektroskopia optyczna UV/VIS*, [w]: *Fizyczne metody badań w biologii, medycynie i ochronie środowiska*, red. A.Z. Hrynkiewicz, E. Rokita, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999, 188–221.
- [13] BOLEWSKI A., KUBISZ J., BABIŃSKI W., *Mineralogia ogólna*, Wydawnictwa Geologiczne, Warszawa 1981.
- [14] GOODMAN J.W., *Introduction to Fourier Optics*, 3rd ed., Roberts & Company, Colorado 2005.
- [15] GNIADK K., *Optyczne przetwarzanie informacji*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1992.
- [16] STEWARD E.G., *Fourier Optics: an introduction*, 2nd ed., Dover Publications Inc., New York 2004.
- [17] KERKER M., *The scattering of light and other electromagnetic radiation*, Academic Press, New York 1969.
- [18] STOVER J.C., *Optical scattering: measurements and analysis*, 2nd ed., SPIE Optical Engineering Press, Washington 1995.
- [19] BOHREN C.F., HUFFMAN D.R., *Absorption and scattering of light by small particles*, John Wiley & Sons Inc., New York 1983.
- [20] FERNANDES G.E., PAN Y.G. et al., *Simultaneous forward- and backward-hemisphere elastic-light-scattering patterns of respirable-size aerosols*, *Optics Letters*, 2006, Vol. 31, No. 20, 3034–3036.
- [21] ŁUKANIEWICZ CZ., *Podstawy pomiarów nierówności powierzchni metodami rozpraszania światła*, Wydawnictwo Uczelniane Politechniki Koszalińskiej, Koszalin 2001.
- [22] NICODEMUS F.E., *Reflectance nomenclature and directional reflectance and emissivity*, *Applied Optics*, 1998, Vol. 9, 169–180.



FTIR i Raman - komplementarne techniki spektroskopii molekularnej



ROZDZIAŁ 4

PODSTAWOWE POJĘCIA FOTOCHEMII I FOTOBIOLOGII

Małgorzata Komorowska, Sylwia Olsztyńska-Janus

Spis treści	
4.1. Wstęp	129
4.2. Główne prawa fotochemii	131
4.2.1. Prawo Grotthussa–Drapera	131
4.2.2. Prawo równoważności fotochemicznej Einsteina–Starka	134
4.2.3. Dwufazowa odpowiedź układu biologicznego na różne dawki promieniowania. Prawo Arndta–Schulza	135

4.1. Wstęp

W wyniku oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z materią zachodzą procesy fotofizyczne i fotochemiczne. Procesy te obserwujemy zarówno w przyrodzie, jak i w doświadczeniach przeprowadzanych w laboratorium. Światło wywołuje elektronowe wzbudzenie atomów lub cząsteczek (proces fotofizyczny), co może prowadzić do aktywacji reakcji fotochemicznych zachodzących już bez udziału promieniowania elektromagnetycznego. W efekcie może nastąpić zmiana właściwości fizykochemicznych cząsteczek, ich zmiana konformacyjna (wewnętrzna przemiana struktury) lub nawet ich rozpad. Dział chemii zajmujący się reakcjami, które zachodzą pod wpływem promieniowania elektromagnetycznego nazywany jest **fotokemią**. Natomiast **fotobiologia** to dział biologii, który dotyczy oddziaływania światła na organizmy żywe. Światło może być siłą napędową procesów biologicznych, może je hamować lub zmieniać ich przebieg. Promieniowanie elektromagnetyczne jest również narzędziem wykorzystywanym w celach leczniczych w **fotomedycynie**, np. w depresjach, chorobach wirusowych, nowotworach, czy naświetlaniu noworodków z żółtaczką.

Promieniowanie elektromagnetyczne oddziałując z materią wywołuje specyficzne procesy. Są trzy kryteria decydujące o specyficzności promieniowania elektromagnetycznego:

1. Mechanizm jego generacji: źródła promieniowania.
2. Efekty oddziaływania na materię.
3. Stosunek S_E energii kwantu promieniowania elektromagnetycznego do energii cieplnej:

$$S_E = \frac{h\nu}{kT}, \quad (1)$$

gdzie h – stała Plancka, ν – częstotliwość padającej fali, k – stała Boltzmana, T – temperatura bezwzględna.

Gdy stosunek ten jest większy niż 10^3 , energia fotonów jest kilka rzędów wielkości większa od energii ruchów cieplnych cząsteczki. Działanie tego promieniowania powoduje rozrywanie wiązań, rozpad i jonizację cząsteczek. Promieniowanie to jest jonizujące, a dziedziny wiedzy zajmujące się efektami oddziaływania tego promieniowania to radiochemia, radiobiologia i radiomedycyna.

Jeśli stosunek obydwu wielkości S_E zawarty jest w przedziale pomiędzy 10^3 a 1, przyjmujemy, że promieniowanie takie jest promieniowaniem niejonizującym. Promieniowanie o tych energiach odpowiada przejściom elektronowym i po zaabsorbowaniu może wywoływać liczne procesy fotochemiczne. Dziedziny dotyczące oddziaływanie tego rodzaju promieniowania z materią noszą nazwę fotochemii i fotobiologii.

Stosunek S_E mniejszy od 1 oznacza, że absorpcja tego rzędu energii wywołuje ruchy translacyjne, oscylacyjne i rotacyjne, a efekty termiczne będą głównie odpowiedzialne za zachodzące zmiany chemiczne w badanym układzie, np. odwracalne (denaturacja białek) czy wpływ podwyższonej temperatury na kinetykę procesów chemicznych. Ten typ promieniowania nosi nazwę promieniowania lub pól elektromagnetycznych (PEM) i zajmuje się nimi elektromagnetobiologia.

Fotochemia objaśnia się reakcje chemiczne zachodzące pod wpływem promieniowania elektromagnetycznego. Promieniowanie to wzbudza przejścia elektronowe w atomach lub cząsteczkach. Wzbudzone cząsteczki, zasadniczo różniące się aktywnością chemiczną w porównaniu do tych samych obiektów w stanie podstawowym, inicjują pierwotną reakcję chemiczną – inaczej pierwotny proces fotochemiczny. Stąd tego typu fotochemię nazywamy inaczej chemią elektronowo wzbudzonych cząsteczek. Ponieważ energie wewnątrzcząsteczkowych wiązań chemicznych są rzędu $150\text{--}850 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, należy oczekiwać, że energia fotonów wywołująca reakcje chemiczne powinna być równoważna długościom fal od 800 do 140 nm. Wyznaczone tym sposobem długości fal wskazują, że reakcje fotochemiczne przebiegają po ekspozycji reagentów (materii) na promieniowanie elektromagnetyczne z zakresu ultrafioletu (UV, z ang. *ultraviolet*), światła widzialnego (VIS, z ang. *visible*) lub bliskiej podczerwieni (NIR, z ang. *near infrared*). W ostatnim dwudziestoleciu w literaturze

można spotkać liczne doniesienia o reakcjach fotochemicznych zachodzących w obiektach wzbudzonych oscylacyjnie lub rotacyjnie, a więc falami elektromagnetycznymi odpowiadającymi zakresowi widmowemu obejmującemu średnią podczerwień (MIR, z ang. *mid infrared*), daleką podczerwień (FIR, z ang. *far infrared*) oraz promieniowanie mikrofalowe. Naświetlanie prowadzi się albo w sposób ciągły lub metodą fotolizy błyskowej. Ta ostatnia metoda, gdy jako źródła światła stosuje się lasery pozwala na obserwację bardzo szybkich procesów fotochemicznych, zachodzących w czasach nano-, piko- lub femto-sekundowych [1, 2, 3].

4.2. Główne prawa fotochemii

Sformułowane zostały dwa zasadnicze prawa fotochemii:

1. Prawo Grotthussa–Drapera,
2. Prawo równoważności fotochemicznej Einsteina–Starka.

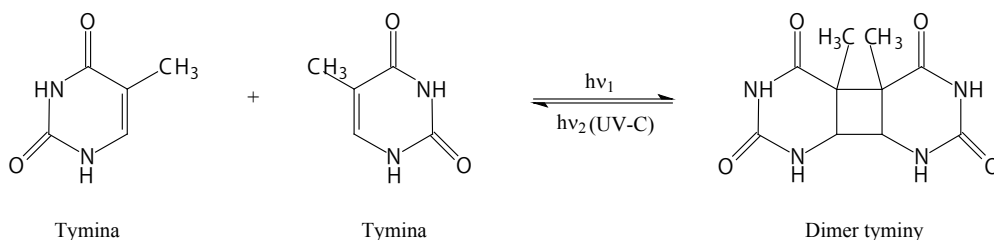
4.2.1. Prawo Grotthussa–Drapera

Prawo Grotthussa–Drapera głosi, że

reakcję fotochemiczną może zainicjować tylko promieniowanie zabsorbowane przez układ.

Prawo to zostało sformułowane przez Theodora von Grotthussa w roku 1817 i odkryte niezależnie przez Johna W. Drapera w roku 1843. Z tego prawa wynika, że jakiegokolwiek badania fotochemiczne muszą się opierać na znajomości widm absorpcyjnych substancji biorących udział w reakcji. Ważna jest znajomość właściwości spektralnych każdego materiału, z którego zbudowane jest środowisko reakcyjne. Absorpcja promieniowania może zachodzić bezpośrednio w reagentach lub reagenty zostaną wzbudzone pośrednio przez inne obiekty znajdujące się w układzie. Te cząsteczki nazywane są sensybilizatorami lub fotouczulaczami i to one przekazują swoją energię wzbudzenia reagentom.

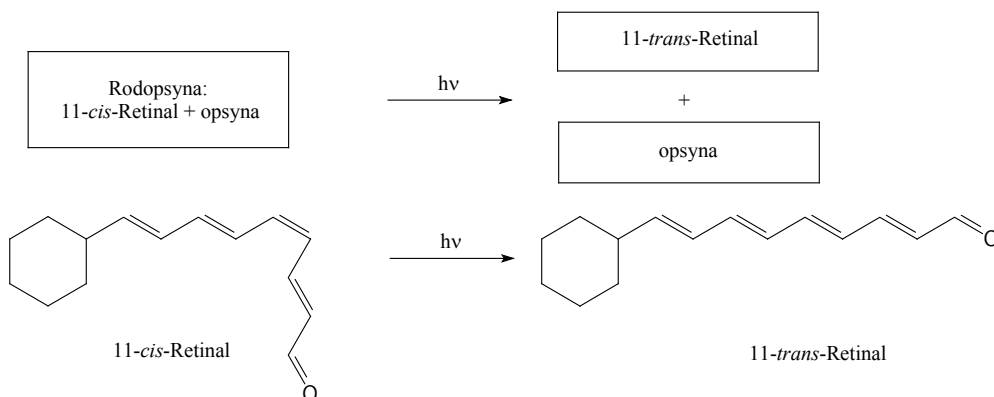
Absorpcja promieniowania wzbudzającego stanowi pierwszy etap reakcji fotochemicznej. Konsekwencją wzbudzenia są dalsze etapy reakcji: procesy pierwotne i procesy wtórne. Procesy pierwotne obejmują wszystkie przemiany, jakie zachodzą pomiędzy wzbudzonymi cząsteczkami lub atomami. Jeśli w wyniku absorpcji promieniowania zmienia się tylko stan energetyczny cząsteczki, mówimy o pierwotnym procesie fotofizycznym. Wzbudzona cząsteczka przechodzi w stan podstawowy, emitując nadmiar energii w sposób promienisty lub bezpromienisty.



Rys. 4.2. Tworzenie dimerów tyminy pod wpływem promieniowania UV-C

4. Fotoizomeryzacja – zmiana geometrii cząsteczki bez zmiany jej wzoru strukturalnego (np. izomeryzacja *trans/cis*).

Przykładem tego typu reakcji fotochemicznej jest izomeryzacja rodopsyny (patrz rys. 4.3), reakcja odpowiedzialna za proces widzenia. W pręcikach (fotoreceptorach) znajduje się białko – rodopsyna (barwa purpurowa). Białko to jest połączeniem chromoforu (jednostka absorbująca kwanty światła) retinalu z białkiem opsyną. Po absorpcji promieniowania, cząsteczka przechodzi z formy 11-*cis*-retinalu w izomer 11-*trans*-retinal. Zmiana struktury retinalu pociąga za sobą konformację opsyny, co w konsekwencji powoduje oddysocjowanie barwnika od białka. Dzięki takiej reakcji fotochemicznej powstaje impuls nerwowy.



Rys. 4.3. Schemat izomeryzacji i dysocjacji retinolu w procesie widzenia

5. Reakcje fotoprolityczne – reakcje odszczepiające proton.

Wzbudzone cząsteczki lub atomy mogą tworzyć nietrwale formy przejściowe, które podlegają dalszym przemianom aż do utworzenia trwałych produktów. Są to wtórne procesy fotochemiczne. Należą do nich także reakcje łańcuchowe inicjowane światłem

np. rozpad Cl_2 zachodzący pod wpływem światła. Do wtórnych procesów należą także zmiany konformacyjne (strukturalne białek) zachodzące na skutek pierwotnego procesu fotoprolitycznego – transfer protonu od cząsteczki kwasu do makromolekuły [1, 2].

4.2.2. Prawo równoważności fotochemicznej Einsteina–Starka

Prawo równoważności fotochemicznej Einsteina–Starka głosi, że

absorpcja jednego fotonu wywołuje pierwotny proces fotofizyczny lub fotochemiczny w jednej cząsteczce lub atomie.

Prawo to zostało sformułowane niezależnie przez fizyków niemieckich Alberta Einsteina i Johannes Starka w latach 1908–1913. Prawo to obowiązuje tylko wtedy, gdy zachodzi absorpcja jednofotonowa. Cząsteczka po absorpcji jednego fotonu przechodzi w stan wzbudzony i przed utratą nadmiaru energii nie absorbuje następnego fotonu. Absorpcja jednofotonowa zachodzi w układach, w których źródła światła emitują stosunkowo niewielką liczbę fotonów w porównaniu z promieniowaniem laserowym. Lampa rtęciowa emituje około 10^{20} fotonów $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$; natomiast w impulsach promieniowania laserowego osiąga się wiązki o natężeniu rzędu 10^{32} fotonów $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Czas życia w singletowym stanie wzbudzonym jest rzędu 10^{-8} do 10^{-9} s, co sugeruje, że stosując standardowe źródła światła prawdopodobieństwo powtórnej absorpcji fotonu w stanie wzbudzonym jest niezmiernie małe. Sytuacja zmienia się, jeśli wydłuża się czas życia w stanie wzbudzonym np. przejście cząsteczki w stan trypletowy lub znaczny wzrost natężenia wiązki padającej. W konsekwencji może nastąpić powtórna absorpcja fotonu w stanie wzbudzonym cząsteczki. Zjawisko nosi nazwę absorpcji dwufotonowej. Znane są także procesy wielofotonowe.

Ważnym parametrem każdej reakcji fotochemicznej jest **wydajność kwantowa**. Definiujemy ją jako:

$$\phi = \frac{A}{N}, \quad (2)$$

gdzie A – liczba cząsteczek utworzonego produktu w procesie fotochemicznym, a N – liczba fotonów zaabsorbowanych przez substrat.

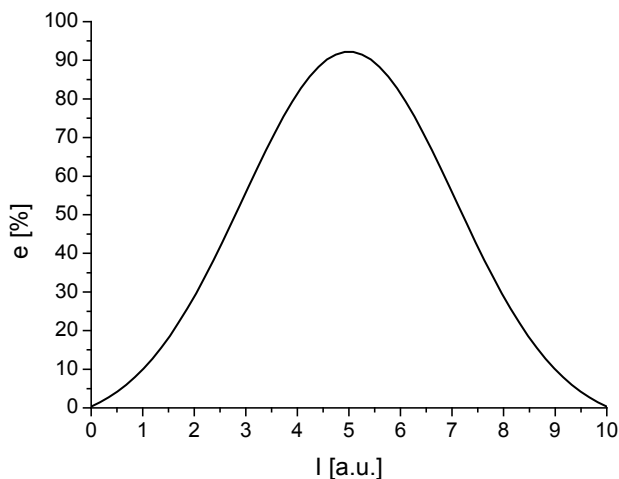
Liczba cząsteczek i fotonów odniesiona jest do tej samej objętości, w tym samym czasie. Najwyższą wartość, jaką może osiągnąć wydajność kwantowa pierwotnej reakcji fotochemicznej jest równa 1, co oznacza, że każdy zaabsorbowany kwant wywołał daną reakcję fotochemiczną. W większości przypadków wydajność jest mniejsza od jedności. Jeżeli jednak w reakcji fotochemicznej występują procesy wtórne, to wtedy całkowita wydajność kwantowa (liczona względem ostatniego produktu reakcji) może przyjmować wartości dużo większe od jedności [1, 2].

4.2.3. Dwufazowa odpowiedź układu biologicznego na różne dawki promieniowania. Prawo Arndta–Schulza

Prawo Rudolfa Arndta i Hugo Schulza odnosi się do fotoefektów obserwowanych w organizmach. Stwierdzili oni, że podstawowa odpowiedź organizmu na dany bodziec jest dwufazowa. Koncepcja prawa Arndta-Schulza pochodzi z końca XIX wieku (1888 rok). W serii publikacji poświęconych działaniu toksycznemu jodu, bromu, związków rtęci czy arsenianów Schulz stwierdził, że każda z tych trucizn przy bardzo małych stężeniach działa stymulująco na metabolizm drożdży, natomiast większe dozy powodowały śmierć tych organizmów. W kontakcie z psychiatrą Arndtem sformułowali ostatecznie prawo znane pod ich nazwiskami. Opisowo prawo to głosi, że:

efekt wywołany przez określony bodziec zależy od jego natężenia [4].

Zależność jest jednak nieliniowa. Słaby bodziec powoduje słaby efekt. Wzrost natężenia bodźca powoduje wzrost efektywności tylko do pewnej jego wartości. Dalszy wzrost natężenia powoduje spadek efektywności działania. Rysunek 4.4 ilustruje teoretyczną zależność efektywności e od natężenia bodźca I .



Rys. 4.4. Zależność efektywności działania bodźca od jego natężenia

W biologii i medycynie opis efektów fotochemicznych musi być połączony z precyzyjnym określeniem energii padającej na powierzchnię naświetlanego materiału i dawki promieniowania, jaka została dostarczona do materiału w czasie ekspozycji na

promieniowanie. W pierwszym przypadku definiujemy gęstość mocy lub napromieniowanie. Określa się ten parametr jako energię padającą na jednostkę powierzchni w jednostce czasu [J/m^2]. Ważnymi parametrami są także długość fali, charakterystyka impulsów w przypadku laserów, koherencja oraz polaryzacja promieniowania. Zwiększenie gęstości mocy lub czasu ekspozycji przy mniejszej gęstości mocy promieniowania powinno mieć równoważny wpływ na materię. W większości przypadków obydwie wielkości nie są ze sobą skorelowane, uzyskuje się różne efekty fotochemiczne. Dlatego też w opisie działania światła na materiały biologiczne podaje się oprócz gęstości mocy promieniowania także czas ekspozycji. Przy zdefiniowanej gęstości mocy czas ekspozycji jest miarą dawki dostarczonej do naświetlanego materiału, komórki, tkanki lub organizmu.

Literatura

- [1] PIGOŃ K., RUZIEWICZ Z., *Chemia fizyczna*, tom. 2, wyd. 5, pod red. L. Komorowskiego i J. Lipińskiego, PWN, Warszawa 2005, 538–546.
- [2] PASZYC S., *Podstawy fotochemii*, PWN, Warszawa 1983, 48–53.
- [3] SUPPAN P., *Chemia i światło*, PWN, Warszawa 1997, 13–22.
- [4] STRABURZYŃSKI G., STRABURZYŃSKA A., *Medycyna fizykalna*, PZWL, Warszawa 1997, 289–389.

MEDSON

20
Lat

www.medson.pl

APARATURA ANALITYCZNA I KONTROLNO-POMIAROWA

20
Lat
MEDSON

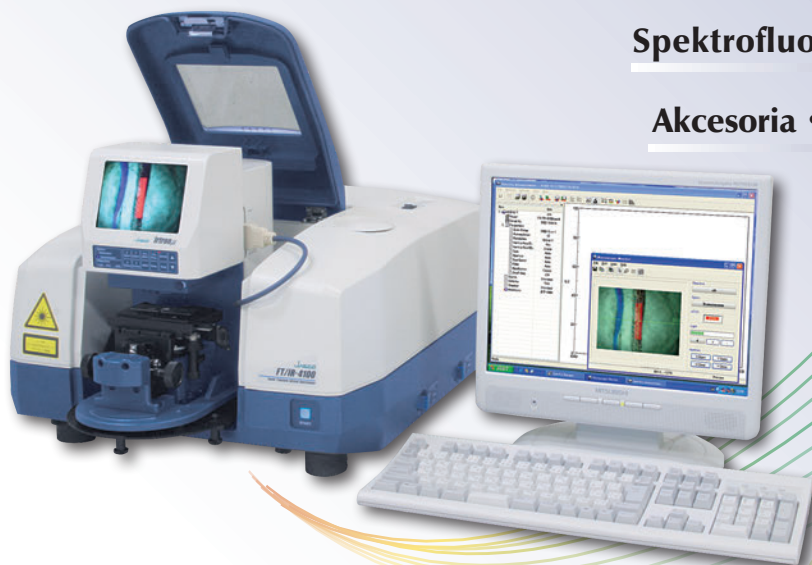
Spektrometry Ramana • FTIR • Mikroskopy FTIR

Mierniki i regulatory przepływu gazów i cieczy

Spektrofotometry UV-VIS-NIR

Spektrofluometry • Polarymetry

Akcesoria • Przystawki • Aplikacje



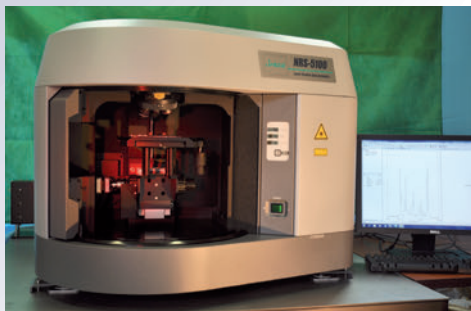
Spektrometry Ramana

JASCO

MEDSON

Nowe Spektrometry Ramana Jasco serii NRS5000/7000

JASCO VertiScan i SPRInts



Nowatorskie rozwiązania w skanowaniu,
obrazowaniu i przetwarzaniu danych

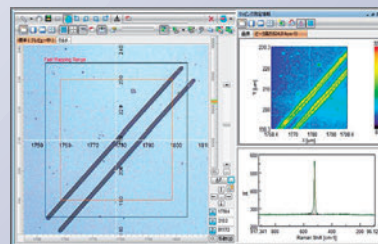
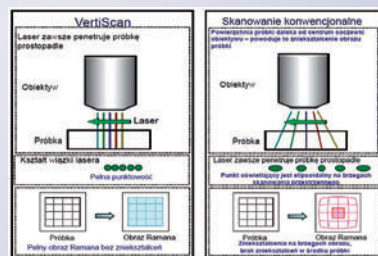
Spektrometry Ramana
jako potężne narzędzie do badania struktury i funkcji
systemów biochemicznych

Zastosowanie w medycynie, farmacji i biochemii, między innymi:

- wykrywania proteomicznych analizów
- identyfikacja i metody ilościowe do analizy proteomicznej
- identyfikacja i wykrywanie zmian w biomolekułach, np. zmiany genetyczne, środowiskowe lub chorobotwórcze wywołane w peptydach pochodzących z danego białka
- do odróżnienia łagodnych i złośliwych schorzeń pęcherza moczowego w badaniach *in vitro*
- Spektroskopia Ramanowska mikroorganizmów na poziomie pojedynczej komórki
- identyfikacja bakterii i drożdży za pomocą mikro kolonii (od kilkuset komórek), oraz identyfikacja makrocząstek
- badanie oddziaływań międzycząsteczkowych
- Spektroskopia Ramanowska może zostać rozszerzona do badania pojedynczych molekuł i dlatego może być stosowane do identyfikacji makrocząsteczki i ich interakcji z innymi cząsteczkami wiążącymi.

Inne zastosowania:

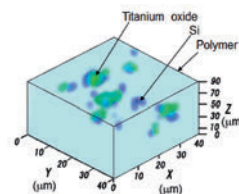
Materiały półprzewodnikowe; ceramika; kompozyty węglowe, diament; polimery; elektronika optyczna; mineralogia, gemmologia; „zaawansowane” materiały; farmaceutyka; synteza organiczna; biochemia, biologia; farby przemysłowe, kleje; sądownictwo, egzekwowanie prawa; tekstylia; sztuka konserwatorska, restauratorska; zapewnienie jakości i jej kontrola.



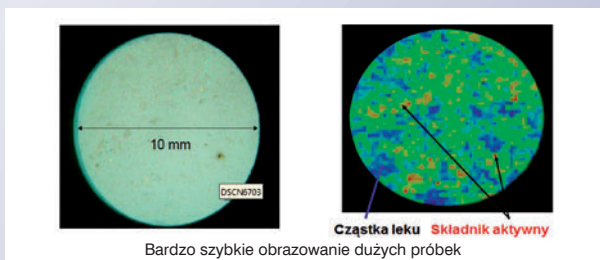
Obrazowanie 3-D



Obraz rozkładu składników



Obraz Ramana 3D



Bardzo szybkie obrazowanie dużych próbek

ROZDZIAŁ 5

PODSTAWY DZIAŁANIA LASERÓW

Iwona Hołowacz, Halina Podbielska

Spis treści	
5.1. Wstęp	139
5.2. Zasady działania lasera	140
5.2.1. Fizyka laserów	140
5.2.2. Budowa lasera i właściwości promieniowania	142
5.3. Podział laserów	145
5.4. Bezpieczeństwo pracy z laserami	147

5.1. Wstęp

Historia zastosowania lasera w medycynie sięga niemal czasów wynalezienia lasera. Pierwszy laser został zbudowany w 1960 r. przez Teodora Maimana, był to laser rubinowy emitujący światło o długości fali 694 nm. Następne lata przyniosły szybki rozwój laserów gazowych i barwnikowych. Już w 1964 roku wykonano pierwszą operację laserową – Leon Goldman po raz pierwszy zastosował laser rubinowy o promieniowaniu ciągłym w dermatologii. Słowo LASER jest akronimem słów *Light Amplification by Stimulation Emission of Radiation*, co oznacza wzmocnienie światła poprzez wymuszoną emisję promieniowania. Światło laserowe posiada wiele bardzo szczególnych właściwości: monochromatyczność, spójność czasową i przestrzenną, dużą gęstość mocy wiązki laserowej. Dużą zaletą w wielu zastosowaniach technicznych i medycznych jest możliwość uzyskania bardzo krótkich impulsów światła. Dzięki tym cechom promieniowania laserowego możemy je wykorzystywać w medycynie w sposób kontrolowany i precyzyjny [1].

W tej części zostaną opisane podstawy fizyczne działania laserów i zasady propagacji wiązek laserowych. Informacje na temat działania laserów i rodzajów laserów stosowanych w medycynie przedstawione zostały również w rozdziale 6 *Przegląd laserów*.

5.2. Zasady działania lasera

5.2.1. Fizyka laserów

Podstawą działania lasera są zjawiska absorpcji i emisji, omówione dokładnie w niektórych rozdziałach tej książki (rozdział 3 i 4). Atomy, molekuly czy jony, które są elementami aktywnymi w procesach wzmacniania promieniowania, mogą znajdować się na różnych dyskretnych poziomach energetycznych. Jeżeli na układ, który znajduje się w stanie równowagi termodynamicznej zadziałamy energią pola elektromagnetycznego, następuje *absorpcja*. W wyniku tego atom lub cząsteczka zostają przeniesione ze stanu podstawowego E_0 do stanu E_1 o wyższej energii. Stan wzbudzony jest krótkotrwały i wzbudzone cząsteczki w ośrodkach na drodze *emisji spontanicznej* przechodzą do stanu energetycznie niższego, emitując fotony o energii $\Delta E = h\nu$, gdzie ΔE jest różnicą energii pomiędzy poziomami E_1 i E_0 , ν to częstotliwość promieniowania, a h to stała Plancka.

Emisja wymuszona jest natomiast zainicjowana przez foton oddziaływujący na cząsteczkę (atom, jon) w stanie wzbudzonym. Czas życia emisji wymuszonej, czyli czas trwania poziomu wzbudzonego τ jest stosunkowo krótki. Tylko poziom podstawowy ma (prawie) nieskończenie długi czas życia. Przykładowe czasy życia poziomów wzbudzonych E_1 i E_2 najbardziej popularnych laserów zamieszczono w tab. 1 (na podstawie [2]).

Tabela 1. Czasy życia τ_1 i τ_2 wzbudzonych poziomów E_1 i E_2 wybranych laserów

Typ lasera	λ [nm]	τ_1	τ_2
Nd:YAG	1060	30 ns	230 μ s
Rubinowy	694	3 ms	–
He-Ne	632,8	12 ns	10–20 ns
Ar ⁺	488	0,4 ns	9 ns
Ekscymerowy (KrF)	248	<1 ps	1–10 ns

Podstawą akcji laserowej jest *emisja wymuszona*. Jeśli foton padającego promieniowania oddziałuje z cząsteczką lub atomem znajdującym się w stanie wzbudzonym, powoduje to emisję dodatkowego fotonu i przejście cząsteczki na niższy poziom energetyczny. Można powiedzieć, że dochodzi do wzmocnienia światła, zgodnie ze znaczeniem słowa LASER. Promieniowanie padające i wymuszone mają takie same częstotliwości, fazy, płaszczyznę polaryzacji i kierunek rozchodzenia się [3].

Gdy układ kwantowy znajduje się w stanie równowagi termodynamicznej w temperaturze T , obsadzenie poszczególnych jego poziomów energetycznych wyznacza zależność:

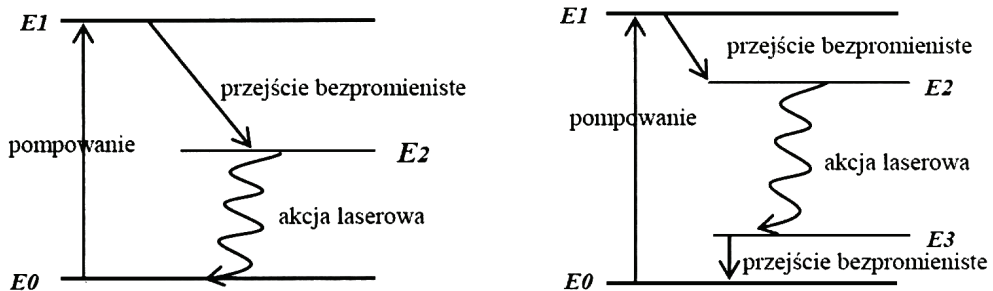
$$N_i = C \times \exp(-) = \exp\left(-\frac{E_i}{kT}\right), \quad (1)$$

gdzie: N_i – ilość atomów posiadających energię E_i , k – stała Boltzmanna, C – stała charakterystyczna dla danego układu kwantowego. W stanie równowagi termodynamicznej na poziomie podstawowym znajduje się więcej atomów niż na poziomach wzbudzonych. W dwupoziomowym układzie kwantowym stosunek N_1 do N_0 można przedstawić za pomocą równania:

$$\frac{N_2}{N_1} = \exp\left(-\frac{E_2 - E_1}{kT}\right) = \exp\left(-\frac{h\nu}{kT}\right). \quad (2)$$

W warunkach równowagi $N_1 \ll N_0$ [4], a w warunkach *inwersji obsadzeń poziomów energetycznych* $N_1 > N_0$. Można to osiągnąć dzięki wytrąceniu układu ze stanu równowagi za pomocą oddziaływań zewnętrznych, np. energii pompującej.

W rzeczywistych układach kwantowych stosowanych w laserach występuje zawsze większa liczba poziomów energetycznych. Można wyróżnić stany metastabilne, na których układ może przebywać bardzo długo, gdzie długo oznacza zazwyczaj czas rzędu mikro- lub milisekund. Istnienie stanów metastabilnych pomaga w wytworzeniu inwersji obsadzeń. W zależności od liczby poziomów lasery dzielimy na trój- i czteropoziomowe (patrz rys. 5.1). W laserze trójpoziomowym (np. laser rubinowy) istnieją trzy poziomy energetyczne: podstawowy E_0 , wzbudzony E_1 i metastabilny E_2 – długo żyjący.



Rys. 5.1. Schemat poziomów energetycznych lasera trój- (z lewej) i czteropoziomowego (po prawej) (na podstawie [5])

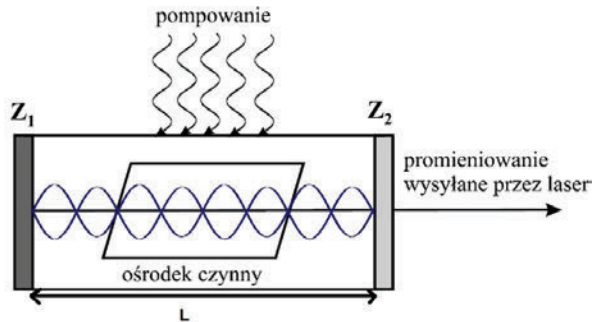
Układ trójpoziomowy posiada poziomy energetyczne o energiach E_0 , E_1 i E_2 , gdzie $E_1 > E_2 > E_0$. Jeżeli taki układ wzbudzimy energią zewnętrzną, to przeniesiemy pewną liczbę atomów z E_0 na poziom E_1 , który jest stanem krótkotrwałym. W wyniku przejść bezpromienistych można doprowadzić do inwersji obsadzeń pomiędzy poziomem E_2 (metastabilnym) i E_0 (podstawowym) i w konsekwencji do zainicjowania akcji laserowej [5].

Dużo bardziej wydajną inwersję obsadzeń uzyskuje się w układach czteropoziomowych. Poziom E_1 nie jest stanem metastabilnym i zostaje bardzo szybko opróżniony. Przejście laserowe odbywa się pomiędzy poziomami E_2 i E_3 .

Podstawą akcji laserowej jest *emisja wymuszona*

5.2.2. Budowa lasera i właściwości promieniowania

Każdy laser składa się z trzech podstawowych części: ośrodka czynnego, układu pompującego i rezonatora (patrz rys. 5.2). Ośrodkiem aktywnym może być gaz, ciecz lub ciało stałe. Źródłem układu, który generuje energię, która potrzebna jest do wzbudzenia ośrodka czynnego może być lampa błyskowa lub inne źródło światła, łuk elektryczny, prąd lub energia reakcji chemicznych. Rezonator jest układem dwóch równoległych zwierciadeł Z_1 i Z_2 o różnych współczynnikach odbicia. Zwierciadło Z_1 jest prawie całkowicie nieprzepuszczalne dla promieniowania, natomiast zwierciadło Z_2 ma większą przepuszczalność (ok. 90%), co umożliwi transmisję wygenerowanego promieniowania. Rezonator jest odpowiedzialny za realizację sprzężenia zwrotnego [3, 6].



Rys. 5.2. Podstawowy schemat budowy lasera (na podstawie [3])

Zwierciadła powinny znajdować się w odległości L , spełniającej warunek powstania w rezonatorze fali stojącej w wyniku odbicia promieniowania:

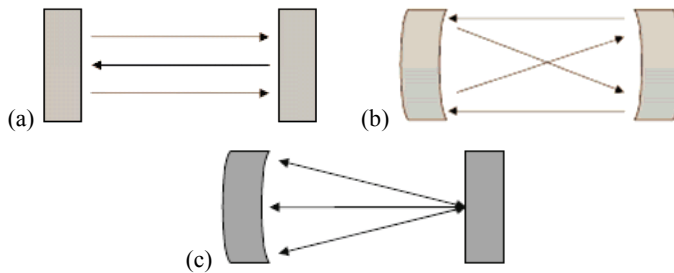
$$L = N \frac{\lambda}{2}, \quad (3)$$

gdzie N oznacza tu liczbę całkowitą, określającą liczbę modów, a λ jest długością fali emitowanego promieniowania.

Fala stojąca może powstać tylko wtedy, gdy odległość pomiędzy zwierciadłami jest całkowitą wielokrotnością połówek długości fali. Są to mody podłużne, których liczba może być różna, zależna od rodzaju ośrodka czynnego i rezonatora. Częstotliwość modu

jest równa $f_N = N c/n2L$, gdzie c jest prędkością światła w próżni, a n współczynnikiem załamania ośrodka. Przykładowo w laserze He-Ne o długości rezonatora 30 cm powstają 3 mody, a w rubinowym 100 modów.

Najprostszym rezonatorem jest rezonator Fabry–Perota, składający się z dwóch płaskich, równoległe ustawionych zwierciadeł. Jednak nie jest najlepszy pod względem stabilności i strat dyfrakcyjnych. Stabilność rezonatora zależy od jego zdolności utrzymania promieniowania w jego wnętrzu po wielokrotnych odbiciach od zwierciadeł. O sposobie odbijania promieni wewnątrz rezonatora decyduje jego budowa (patrz. rys. 5.3). Bardziej stabilne są rezonatory posiadające zwierciadła sferyczne, w szczególności rezonator konfokalny lub zwierciadła sferyczne i płaskie (hemisferyczny) [7].



Rys. 5.3. Rodzaje geometrii rezonatorów: z płaskimi zwierciadłami (a), konfokalny (b), hemisferyczny (c)

Rozkład wiązki laserowej jest przedstawiony schematycznie na rysunku 5.4. W wyniku interferencji powstaje charakterystyczny rozkład widmowo-przestrzenny w płaszczyźnie przekroju poprzecznego, czyli *mody poprzeczne*. Mody poprzeczne są charakteryzowane za pomocą liczb m i n i oznaczane – TEM_{mn} (ang. *Transverse Electromagnetic Mode*). Mod TEM_{00} jest modem podstawowym, rozkład natężenia jest symetryczny względem osi rezonatora i ma rozkład gaussowski [7].

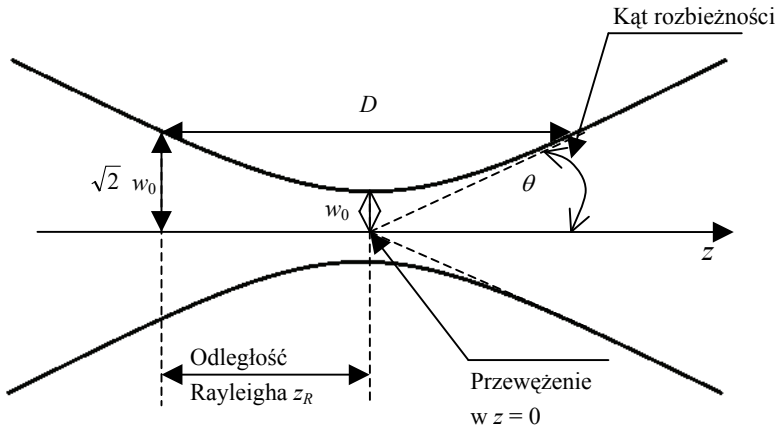
Rozkład natężenia promieniowania w wiązce laserowej można przedstawić za pomocą równania (4):

$$I(r, z) = I_0 \left(\frac{w_0}{w} \right)^2 \exp \left(-2 \left(\frac{r}{w} \right)^2 \right), \quad (4)$$

gdzie

$$w = w_0^2 \sqrt{1 + \left(\frac{2z}{D} \right)^2}, \quad D = \frac{2\pi}{\lambda} w_0^2, \quad (5)$$

przy czym z i r – współrzędne liniowe (z – wzdłuż osi wiązki, r – współrzędna promieniowa), D – parametr konfokalny wiązki (podwójna odległość Rayleigha), wartość stała dla danego lasera, $2w_0$ – średnica przewężenia wiązki, a w jest średnicą wiązki.



Rys. 5.4. Rozkład gaussowski promieniowania laserowego i jego parametry [7]

Wiązka gaussowska, rozchodząc się wzdłuż osi z , zwęża się – w pewnym miejscu jej promień osiąga minimalną wartość w_0 . Miejsce to nazywa się przewężeniem wiązki. Parametry charakteryzujące wiązkę gaussowską przyjmują prostą postać, jeśli wyrazi się je za pomocą parametrów: w_0 , oraz odległości z – mierzonej od przewężenia. W przewężeniu wiązka jest płaska (jej promień krzywizny jest ∞):

$$R(z) = z \left[1 + \left(\frac{\pi \cdot w_0^2}{\lambda \cdot z} \right)^2 \right]. \quad (6)$$

Innym ważnym parametrem wiązki gaussowskiej jest *kąt rozbieżności* θ . Wiązki gaussowskie nie są rozbieżne liniowo. W pobliżu lasera kąt rozbieżności jest bardzo mały, w dużej odległości od lasera kąt rozbieżności osiąga wartość θ , opisaną równaniem (7):

$$\theta = \lim_{z \rightarrow \infty} \frac{w(z)}{z} = \frac{\lambda}{\pi \cdot w_0}. \quad (7)$$

Widać więc, że iloczyn średnicy przewężenia i kąta rozbieżności jest stały dla ustalonej długości fali promieniowania. Oznacza to, że nie można wygenerować wiązki gaussowskiej o dowolnych wartościach 2θ i $2w_0$ dla danej ustalonej długości λ .

Niezmiennik wiązki gaussowskiej:
iloczyn średnicy przewężenia i kąta rozbieżności

$$\theta \cdot w_0 = \frac{\lambda}{\pi}$$

Kolejnym parametrem jest *odległość Rayleigha* z_R . Jest to odległość od przewężenia wiązki do punktu, w którym promień wzrósł $\sqrt{2}$ razy. Można opisać ją wzorem (8):

$$z_R = \frac{D}{2} = \frac{\pi \cdot w_0^2}{\lambda}. \quad (8)$$

5.3. Podział laserów

Istnieje kilka kryteriów podziału laserów w zależności od rodzaju ośrodka czynnego (gazowy, ciekły lub stały), sposobu modulacji pracy (ciągły, impulsowy), sposobu wzbudzania akcji laserowej (optycznie, elektrycznie, chemicznie), od emitowanej długości fali lub emitowanej mocy [8]. Podział laserów i przykładowe lasery omówiono dość dokładnie w rozdziale 6 *Przegląd laserów*. Tu zaprezentujemy sumaryczne podsumowanie klasyfikacji laserów (patrz tab. 2).

Tabela 2. Klasyfikacja laserów

Podział laserów ze względu na rodzaj ośrodka laserującego		
Ośrodek laserujący	Przykładowy laser	Zastosowanie w medycynie
1	2	3
gazy, mieszanina gazów lub mieszanina gazów i par metalu	laser argonowy, 514 nm laser jonowy, Ar ⁺	dermatologia, okulistyka, koagulacja naczyń krwionośnych
	laser CO ₂ , 10,6 i 9,6 μm laser molekularny, cząsteczki CO ₂ z domieszką azotu i helu	chirurgia, dermatologia estetyczna, stomatologia (tkanki miękkie)
	laser ekscymerowy, ośrodek aktywny to mieszanina gazów szlachetnych i ich halogenków, które są stabilne tylko w stanie wzbudzonym ArF – 193 nm, KrF – 248 nm, XeCl – 308 nm, XeF – 350 nm.	okulistyka – chirurgia refrakcyjna
ciało stałe	laser rubinowy, 694,3 nm, ośrodkiem czynnym jest pręt z syntetycznego szafiru (Al ₂ O ₃) domieszkowany (0,01–0,5%) chromem (Cr ⁺³),	w dermatologii, do usuwania tatuaży i przebarwień skóry
	laser neodymowy Nd:YAG i inne lasery na pierwiastkach ziem rzadkich, 1064 nm lub 532 nm. Granat itrowo-glinowy (Y ₃ Al ₂ (AlO ₄) ₃) domieszkowany jonem (Nd ³⁺). Może pracować w trybie impulsowym i ciągłym.	w badaniach spektroskopowych, jako koagulator do zamykania naczyń krwionośnych, w zabiegach mikrochirurgicznych, do rozbijania kamieni nerkowych, w medycynie estetycznej do usuwania zmarszczek i nadmiernego owłosienia

1	2	3
	Lasery półprzewodnikowe, światło widzialne, podczerwień, różne długości fali. Obszarem czynnym jest półprzewodnik: arsenek galu GaAs (promieniowanie o barwie czerwonej i zielonej), arsenofosforek galu GaAsP (630–590 nm), fosforek galowo-indowy InGaP, arsenek glinowo-galowy AlGaAs, azotek galu GaN (430 nm), arsenek galu GaAs domieszkowanego cynkiem Zn i krzemem Si (950–650 nm)	medycyna fotodynamiczna, biostymulacja laserowa, fotodiagnostyka
ciecz	Lasery barwnikowe, przestrajalne, ośrodek aktywny: polifenył, kumaryna, rodaminy (rodamina 6G), dicjanometylen, stilben promieniowanie od UV przez VIS do IR	badania naukowe, medycyna fotodynamiczna
Podział laserów ze względu na emitowaną moc		
Moc lasera	Przykładowy laser	Zastosowanie w medycynie
Lasery niskoenergetyczne do 5 mW	He-Ne, półprzewodnikowe	biostymulacja, diagnostyka
Lasery średnioenergetyczne do 500 mW	półprzewodnikowe, barwnikowe, argonowe	w fotodynamicznej diagnostyce i terapii nowotworów, w badaniach <i>in vitro</i>
Lasery wysokoenergetyczne tzw. twarde, ponad 500 mW.	Nd:YAG, Er:YAG, CO, CO ₂ , ekscymerowe	koagulacja, odparowanie, karbonizacja, do usuwania tkanek, różne działy chirurgii
Podział laserów ze względu na tryb pracy		
Tryb pracy	Charakterystyka lasera	Zastosowanie w medycynie
Lasery ciągłe	Moc lasera nie zmienia się w czasie, wygenerowana energia zależy od mocy wyjściowej i czasu naświetlania: $E = P_o \cdot t_n$	biostymulacja, diagnostyka, koagulacja, odparowanie
Lasery impulsowe	Moc lasera zmienna w czasie, laser pracuje w sposób impulsowy. Moc średnia P_{sr} zależy od czasu trwania impulsu i częstotliwości repetycji, czyli powtarzania się impulsów f . $P_{sr} = P_o \cdot t_i \cdot f$ Energia impulsu to iloczyn mocy szczytowej i czasu trwania impulsu	fotobłajacja – lasery ekscymerowe, ArF, KrF, XeCl, FeF, czas trwania impulsu 10–100 ns, gęstość mocy 10^7 – 10^{10} W/cm ² , ablacja plazmowa – lasery Nd:YAG, Ti:Sapphire, czas trwania impulsu 100 fs–500 ps, gęstość mocy 10^{11} – 10^{13} W/cm ² , fotofragmentacja (rozrywanie tkanek) – lasery na cele stałym: Nd:YAG, Ti:Sapphire, Nd:YLF, czas trwania impulsu 100 fs–100 ps, gęstość mocy 10^{11} – 10^{16} W/cm ²

5.4. Bezpieczeństwo pracy z laserami

Zasady bezpiecznej pracy z laserami regulują różne normy. W Polsce obowiązują w chwili powstawania tej książki Polska Norma PN-EN 60825-1:2010, która określa zasady ochrony przed promieniowaniem laserowym w zakresie długości fal od 180 nm do 1 mm, obowiązujące zarówno użytkownika, jak i producenta. Norma definiuje sposoby odpowiedniego ostrzegania przed zagrożeniem poprzez zastosowanie specjalnego oznakowania, etykiet i instrukcji. Ustalenie norm i ich przestrzeganie jest konieczne, aby zmniejszyć lub całkiem wyeliminować możliwości urazów.

Wpływ promieniowania laserowego na układy biologiczne zależy zarówno od parametrów promieniowa, jak rodzaju tkanki. Szkodliwe działanie promieniowania laserowego dotyczy oczu oraz skóry człowieka, przy czym najbardziej zagrożone są oczy. Ze względu na kierunkowość wiązki zagrożenie promieniowaniem laserowym jest zagrożeniem potencjalnym, tzn. ekspozycja na to promieniowanie jest zazwyczaj przypadkowa (za wyjątkiem zabiegów medycznych). Jednakże niekontrolowana nawet krótkotrwała ekspozycja może być bardzo niebezpieczna. Dlatego też opracowywane są normy regulujące m.in. wartości najwyższej dopuszczalnej ekspozycji na promieniowanie laserowe. W Stanach Zjednoczonych obowiązują standardy opracowane przez *American National Standard Institute*, a sprawy bezpieczeństwa laserowego regulują między innymi normy ANSI Z136.1–Z136.7 [9]. W Europie obowiązują normy opracowane przez CEN (Europejski Komitet Standaryzacji) EN 207/208/60825 [10]. W tabeli 3 przedstawiono efekty, jakie może wywołać nadmierna ekspozycja na promieniowanie laserowe w przypadku oka i skóry.

Tabela 3. Efekty patologiczne podczas ekspozycji na promieniowanie optyczne (według normy PN-EN 60825-1:2010) [11]

Zakres widmowy	OKO	SKÓRA
Nadfiolet C (180–280 nm)	zapalne uszkodzenie rogówki	rumień i oparzenia przyspieszone starzenie skóry, zwiększona pigmentacja
Nadfiolet B (280–315 nm)		
Nadfiolet A (315–400 nm)	katarakta fotochemiczna	ciemnienie pigmentu, reakcje fotouczeniowe, oparzenie skóry
Widzialny (400–780 nm)	fotocemiczne i termiczne uszkodzenie siatkówki	
Podczerwień A (780–1400 nm)	katarakta, oparzenie siatkówki	oparzenie skóry
Podczerwień B (1400 nm–3 μm)	przymglenie rogówki, katarakta, oparzenie rogówki	
Podczerwień C (3 μm–1 mm)	oparzenie rogówki	

Bezpieczeństwo pracy z laserami zależy od Granicy Emisji Dostępnej (GED), którą definiuje się jako maksymalny poziom promieniowania emitowanego przez urządzenie laserowe, dozwolony w obrębie danej klasy laserów lub urządzeń laserowych. Wartości granic emisji dostępnej odnoszą się do długości fali promieniowania laserowego i czasu trwania ekspozycji. Określone są przez wartość mocy [W], energii [J], natężenia promieniowania [W/cm^2] lub napromieniowania [J/cm^2].

Z kolei wartości MDE reprezentują maksymalny poziom napromieniowania, na który może być ekspozycja oko lub skóra bez wynikających z tego obrażeń (zarówno natychmiastowych, jak i pojawiających się po dłuższym czasie). Należy jednak pamiętać, że wartości te określają przypadkowe ekspozycje, a nie np. w celach terapeutycznych. Wartości MDE są zdeterminowane przez poniższe parametry:

- długość fali promieniowania,
- czas trwania impulsu i czas ekspozycji,
- rodzaj tkanki narażonej na obrażenie,
- rozmiar obrazu na siatkówce oka (w przypadku promieniowania widzialnego i bliskiej podczerwieni).

Wartości MDE ustalone są poniżej poziomu uznanego za zagrożenie. Powinny być używane jako wskazówki w kontroli ekspozycji, nie powinno się ich natomiast uważać za precyzyjnie zdefiniowane linie, oddzielające poziom bezpieczny od niebezpiecznego. Trzeba bowiem pamiętać, że granica między tymi poziomami jest płynna. W każdym przypadku ekspozycja na promieniowanie laserowe powinna być tak mała, jak to tylko jest możliwe. Jeżeli laser emituje promieniowanie o kilku, znacznie różniących się długościach fal lub jeżeli impulsy promieniowania są nałożone na promieniowanie ciągłe, obliczenia zagrożeń mogą być złożone. Ekspozycje na promieniowanie o kilku długościach fal trzeba traktować jako dodające się działania, proporcjonalne do efektywności widmowej zgodnie z wartościami MDE dla każdej długości fali.

Lasery ze względu na różne warunki pracy i związane z tym zagrożenie, dzieli się na 7 klas. Podział jest dokonywany ze względu na Granicę Emisji Dopuszczalnej GED i Maksymalną Dopuszczalną Ekspozycję MDE.

Urządzenia laserowe klasy 1 są całkowicie bezpieczne. Emitują promieniowanie z zakresu 302,5–4000 nm, którego GED nie przekraczają wymagań określonych we wspomnianej normie. Np. moc laserów widzialnych 400–700 nm, pracujących w sposób ciągły, nie może przekraczać 0,39 mW. Klasa 1 obejmuje również lasery o dużej mocy, które są całkowicie obudowane. Urządzenia laserowe **klasy 1M** mogą być niebezpieczne, jeżeli wprowadzimy elementy optyczne w tor wiązki. Urządzenia laserowe klasy 1 i 1M mogą zawsze wywołać wrażenie wizualne oślepienia, zwłaszcza przy małym oświetleniu otoczenia.

Laser klasy 2, to laser emitujący promieniowanie widzialne (400–700 nm), które jest bezpieczne dla chwilowych ekspozycji. Laser o działaniu ciągłym nie może mieć mocy większej niż 1 mW, natomiast energia pojedynczego błysku lasera impulsowego wynosi do 0,2 μJ . Poza zakresem widzialnym GED nie może przekraczać wymagań klasy 1.

Laser klasy 2 jest całkowicie bezpieczny, nie wymaga stosowania okularów ochronnych. Dodatkowym zagrożeniem jest promieniowanie UV emitowane przez wyładowcze rury laserowe oraz wysokie napięcia zasilające. W przypadku klasy 2M, promieniowanie może stanowić zagrożenie, jeżeli wprowadzimy elementy optyczne w tor wiązki.

Laser klasy 3R, to laser emitujący promieniowanie widzialne (400–700 nm) o mocy nie wyższej niż 5 mW w przypadku pracy ciągłej i energii impulsu nie przekraczającej 1 μJ przy pracy impulsowej. Laser klasy 3A może być niebezpieczny i obserwacja wiązki światła przez przyrządy optyczne jest niebezpieczna. Nie jest wymagane stosowanie okularów ochronnych. Dodatkowym zagrożeniem jest promieniowanie UV emitowane przez wyładowcze rury laserowe i lampy błyskowe oraz wysokie napięcie zasilające. Lasery klasy 3R mogą być używane, gdy wykluczy się bezpośrednie patrzenie na wiązkę.

Laser klasy 3B, to laser emitujący promieniowanie widzialne lub niewidzialne. Lasery o pracy ciągłej w zakresie IR, VIS i UV(A) mają moc nieprzekraczającą 0,5 W. Lasery impulsowe tej klasy mają ograniczoną energię impulsu tak, aby napromieniowanie nie przekraczało 10^5 J/m^2 (10 J/cm^2) w zakresie VIS i IR. W obszarze UV(A) energia impulsu ma być mniejsza niż 125 mJ. Laser klasy 3B jest niebezpieczny. Obserwacja wiązek laserowych (również rozproszonych) przez przyrządy optyczne jest zabroniona. Jest wymagane stosowanie okularów ochronnych. Praca z tymi laserami jest dozwolona po ukończeniu szkolenia BHP i instruktażu obsługi, potwierdzonych stosownym zaświadczeniem.

Laser klasy 4, to laser emitujący promieniowanie widzialne lub niewidzialne. Jego moc lub energia przekraczają maksymalne wartości dla lasera klasy 3B. Laser tej klasy o działaniu ciągłym ma moc wyższą niż 0,5 W, a laser impulsowy powoduje napromieniowanie większe niż 10^5 J/m^2 (10 J/cm^2). Laser klasy 4 jest niebezpieczny. Niebezpieczne jest promieniowanie rozproszone, zarówno dla oczu, jak i dla skóry. Jest wymagane stosowanie okularów ochronnych i odzieży ochronnej. Wymaga się też osłaniania torów wiązek laserowych. Praca z tymi laserami jest dozwolona po ukończeniu szkolenia BHP i instruktażu obsługi, potwierdzonych stosownym zaświadczeniem.

Do określenia zagrożeń, jakie może stanowić promieniowanie laserowe wprowadzono nowe definicje, które również zostały zawarte w normach. Zaleca się również, aby ekspozycja na promieniowanie była możliwie jak najmniejsza [11].

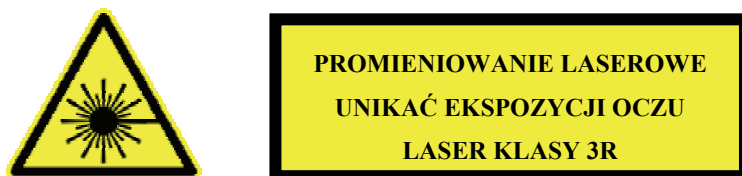
Maksymalna Dopuszczalna Ekspozycja MDE reprezentuje maksymalny poziom napromieniowania, na który może być eksponowane oko lub skóra, bez powodowania obrażeń (zarówno natychmiastowych, jak i pojawiających się po dłuższym czasie). Wartość MDE zależy od długości fali promieniowania, czasu trwania ekspozycji, rodzaju tkanki, rozmiaru obrazu na siatkówce.

Granica Emisji Dopuszczalnej GED zdefiniowana jest jako maksymalny poziom promieniowania emitowanego przez urządzenie laserowe, dozwolony w obrębie danej klasy laserów lub urządzeń laserowych. Maksymalne dopuszczalne ekspozycje dotyczą użytkowników i zaleca się je traktować jako wskazówki.

Tabela 4. Etykiety objaśniające dla poszczególnych klas laserów [Polska Norma]

Klasa 1	URZĄDZENIE LASEROWE KLASY 1
Klasa 1M	PROMIENIOWANIE LASEROWE NIE SPOGLĄDAĆ BEZPOŚREDNIO PRZEZ PRZYRZĄDY OPTYCZNE URZĄDZENIE LASEROWE KLASY 1M
Klasa 2	PROMIENIOWANIE LASEROWE NIE WPATRYWAĆ SIĘ W WIĄZKĘ URZĄDZENIE LASEROWE KLASY 2
Klasa 2M	PROMIENIOWANIE LASEROWE NIE WPATRYWAĆ SIĘ W WIĄZKĘ LUB SPOGLĄDAĆ BEZPOŚREDNIO PRZEZ PRZYRZĄDY OPTYCZNE URZĄDZENIE LASEROWE KLASY 2M
Klasa 3R	PROMIENIOWANIE LASEROWE UNIKAĆ BEZPOŚREDNIEJ EKSPOZYCJI OCZU URZĄDZENIE LASEROWE KLASY 3R
Klasa 3B	PROMIENIOWANIE LASEROWE UNIKAĆ EKSPOZYCJI NA WIĄZKĘ URZĄDZENIE LASEROWE KLASY 3B
Klasa 4	PROMIENIOWANIE LASEROWE UNIKAĆ EKSPOZYCJI OCZU I SKÓRY NA PROMIENIOWANIE BEZPOŚREDNIE LUB ROZPROSZONE URZĄDZENIE LASEROWE KLASY 4

Każdy laser powinien mieć etykietę zgodnie z wymaganiami zawartymi w obowiązującej Polskiej Normie (patrz tab. 4). Znakiem ostrzegawczym jest czarny znaczek, symbolizujący promieniowanie, na żółtym trójkącie, a dodatkowo opis na żółtym tle (patrz rys. 5.5). Trzeba też pamiętać, że oprócz zagrożeń wynikających z promieniowania laserowego, urządzenia laserowe mogą powodować także pożar lub porażenia elektryczne.



Rys. 5.5. Znaki ostrzegawcze przed promieniowaniem laserowym

Najbardziej wrażliwym narządem na szkodliwe skutki promieniowania laserowego jest oko. Struktury oka zawierają duże ilości barwników, które silnie pochłaniają promieniowanie z zakresu widzialnego i bliskiej podczerwieni. W zakresie długości fal od 400 do 1400 nm promieniowanie to wnika do wnętrza oka i jest ogniskowane na siatkówce, co może powodować jej uszkodzenie. Promieniowanie z zakresu długości

fal powyżej 1400 nm i poniżej 400 nm nie wnika do wnętrza oka, lecz może doprowadzić do uszkodzenia rogówki.

Do ochrony indywidualnej oczu przed promieniowaniem laserowym służą okulary, gogle i osłony twarzy zaopatrzone w specjalne filtry ochronne. Filtry powinny być zawsze dobrane do długości fali promieniowania lasera. Powinny dobrze tłumić promieniowania laserowe, natomiast przepuszczać promieniowanie z innych obszarów widma tak, aby nie ograniczać dobrego widzenia. Przy wyborze ochrony oczu zaleca się także, aby była wygodna w noszeniu i zapewniała ściśle dopasowanie do twarzy, zapewniając jak najszersze pole widzenia. Istotne jest również, aby oprawy oraz jakiegokolwiek części boczne zapewniały taką samą ochronę, jaka jest zapewniona przez filtry. Do określenia skuteczności ochrony przed promieniowaniem laserowym wyznacza się parametry:

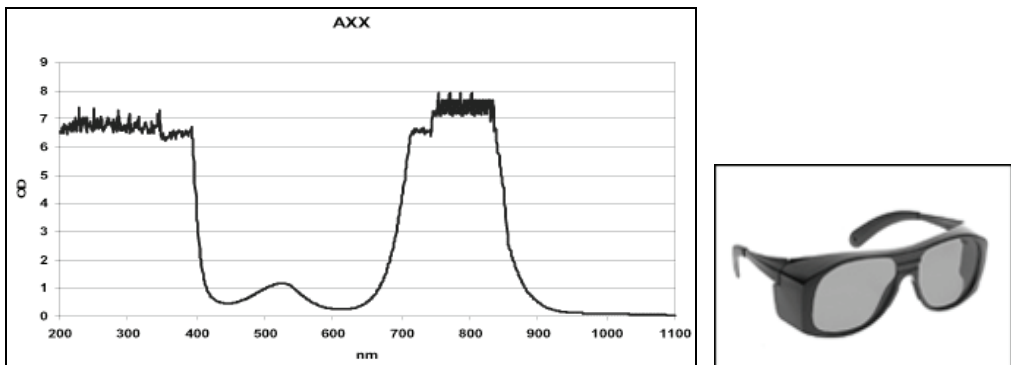
- widmowy współczynnik przepuszczania ($\tau(\lambda)$),
- gęstość optyczna (D_λ),
- współczynnik przepuszczania światła (τ_v),
- odporność na promieniowanie laserowe.

Minimalną wartość gęstości optycznej (D_λ) filtrów, w warunkach założonej ekspozycji (H) oblicza się ze wzoru (9):

$$D_\lambda = \log_{10} \frac{H_0}{MDE} \quad (9)$$

gdzie: H_0 to spodziewany poziom ekspozycji niechronionego oka, MDE to maksymalna dopuszczalna ekspozycja.

Zasadniczą informacją, która określa przydatność filtra do ochrony oczu przed promieniowaniem laserowym jest jego charakterystyka widmowa, obejmująca zakresy niebezpiecznego promieniowania laserowego oraz widzialnego. Na rysunku 5.6 zaprezentowano przykładową charakterystykę widmową filtra AXX stosowanego dla lasera aleksandrytowego, zakres widmowy (720–830 nm), przepuszczalność światła widzialnego 33% [12].



Rys. 5.6. Charakterystyka widmowa filtra AXX, oraz okulary ochronne [12]

W przypadku laserów pracujących w trybie impulsowym, należy się kierować poniższymi zasadami:

1. Ekspozycja dla dowolnego jednego impulsu w obrębie ciągu impulsów nie powinna przekraczać MDE dla pojedynczego impulsu.

2. Średnie natężenie promieniowania dla ciągu impulsów o czasie trwania t nie powinno przekraczać MDE dla pojedynczego impulsu o czasie trwania t .

Dla promieniowania widzialnego czas odpowiedzi oka (mrugnięcie) jest przyjęty jako czas ograniczający ekspozycję na promieniowanie i wynosi on $t_g = 0,25$ s. W przypadku promieniowania poza zakresem widzialnym, czas trwania ekspozycji aproksymuje się wartością 10 sekund.

3. Jeżeli częstotliwość repetycji przekracza wartość $f_{rep} = 1$ Hz, MDE dla pojedynczego impulsu w ciągu impulsów modyfikuje się zgodnie ze wzorem (10):

$$MDE_{imp} = MDE_{poj} \cdot N^{-1/4}, \quad (10)$$

gdzie: N jest liczbą spodziewanych impulsów w ekspozycji, MDE_{imp} – ekspozycja dla dowolnego jednego impulsu w ciągu, a MDE_{poj} oznacza MDE dla pojedynczego impulsu. Jeżeli oko zostaje ekspozycjonowane na światło laserowe z zakresu UV przynajmniej dwukrotnie w przeciągu 24 godzin, efekty wywołane pojedynczymi ekspozycjami mogą się dodawać. Dlatego też wymaga się, aby każda wartość MDE w tym zakresie widmowym była podzielona przez 2,5 (zakłada się bowiem, że ponowna ekspozycja może nastąpić w przeciągu jednej doby).

Literatura

- [1] TRÄGER F. (ed.), *Handbook of Lasers and Optics*, Springer, Berlin 2007.
- [2] EICHLER J., EICHLER J., *Laser, Bauformen, Strahlführung, Anwendungen*, 5. Auflage, Springer 2003.
- [3] ABRAMCZYK H., *Wstęp do spektroskopii laserowej*, PWN, Warszawa 2000.
- [4] KUJAWSKI A., SZCZEPAŃSKI P., *Lasery – podstawy fizyczne*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1999.
- [5] BERLIEN H-P., MÜLLER G. (eds.), *Applied Laser Medicine*, Springer, Berlin 2003.
- [6] JÓŻWICKI R., *Technika laserowa i jej zastosowania*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2009.
- [7] ZIĘTEK B., *Lasery*, Wydawnictwo Naukowe UMK, Toruń 2009.
- [8] BEDNARKIEWICZ A., STRĘK W., *Oddziaływanie światła laserowego z tkanką*, [w:] *Diagnostyka i terapia fotodynamiczna*, red. H. Podbielska, A. Sieroń, W. Stręk, Wyd. Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2004, 33–87.
- [9] <http://webstore.ansi.org/packages/lasers.aspx>
- [10] www.cen.eu
- [11] Polska Norma PN-EN 60825-1 lipiec 2010: *Bezpieczeństwo urządzeń laserowych*, Część 1: *Klasyfikacja sprzętu i wymagania*, Warszawa 2010.
- [12] <http://amecam.pl/produkty/axx-k-184.html>

ROZDZIAŁ 6

PRZEGLĄD LASERÓW

Zygmunt Mierczyk, Mirosław Kwaśny, Jadwiga Mierczyk

Spis treści

6.1. Wstęp	153
6.2. Podstawy fizyczne działania laserów	154
6.2.1. Zasada działania lasera	154
6.2.2. Właściwości promieniowania laserowego	158
6.2.3. Typy laserów	159
6.2.4. Przegląd laserów	162
6.2.4.1. Laser helowo-neonowy	162
6.2.4.2. Laser argonowy	163
6.2.4.3. Laser kryptonowy	164
6.2.4.4. Laser helowo-kadmowy	165
6.2.4.5. Laser na parach złota	166
6.2.4.6. Lasery barwnikowe	167
6.2.4.7. Laser azotowy	168
6.2.4.8. Lasery ekscymerowe	168
6.2.4.9. Lasery SHG Nd:YAG	169
6.2.4.10. Lasery półprzewodnikowe i diody elektroluminescencyjne	169
6.2.4.11. Lasery przestrajalne na ciele stałym	170
6.2.4.12. Lasery kaskadowe	171
6.3. Kierunki rozwoju laserów	172
6.3.1. Niebieska optoelektronika	172
6.3.2. Mikrolasery	173
6.3.3. Lasery włóknowe	174
6.3.4. Lasery hybrydowe	175
6.3.5. Lasery światłowodowe	176

6.1. Wstęp

Jednym z podstawowych obszarów optoelektroniki są źródła światła, w tym przede wszystkim lasery. Współczesne lasery generują promieniowanie od dalekiej podczer-

wieni do zakresu rentgenowskiego. Obejmują przyrządy o wielkości pojedynczych mikrometrów, jakimi są najmniejsze lasery półprzewodnikowe, poprzez mikrolasery pompowane koherentnie o wyjątkowych charakterystykach emisyjnych i sprawnościach generacji, aż po ogromne wielokanałowe instalacje laserowe wielkości boiska do piłki nożnej, będące źródłem promieniowania w systemach mikrosyntezy termojądrowej. Obecnie lasery są używane praktycznie wszędzie – od gospodarstwa domowego i przedmiotów powszechnego użytku, poprzez medycynę, po zaawansowane techniki militarne i kosmiczne.

6.2. Podstawy fizyczne działania laserów

6.2.1. Zasada działania lasera

Zasadę działania lasera wyjaśnia rozwinięcie skrótu LASER – *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*, czyli wzmocnienie światła przez wymuszoną emisję promieniowania (Słowo laser jest akronimem). Wyjątkowość lasera nie dotyczy sposobu działania czy konstrukcji, ale właściwości światła, jakie urządzenie to emituje. Jest to bardzo skupiona wiązka światła monochromatycznego, czyli o jednej, ściśle określonej barwie (długości fali) i wysokim natężeniu [1]. Zagadnienia dotyczące zasady działania laserów, zostały też omówione w rozdziale 5.

Promieniowanie laserowe jest promieniowaniem optycznym, czyli falą elektromagnetyczną, która ma pewną energię E . Jednostką energii jest dżul [1 J]. Ponieważ promieniowanie optyczne jest wiązką fotonów, energia promieniowania jest sumą energii wszystkich fotonów w wiązce laserowej:

$$E = \sum E_f = \sum (h \cdot \nu_f), \quad (1)$$

gdzie:

ν_f – częstotliwość fotonów, związana z długością fali zależnością $\nu_f = \frac{c}{\lambda}$,

h – stała Plancka $h = 6,63 \cdot 10^{-34}$ [J·s], c – prędkość światła.

Ilość energii E emitowana w jednostce czasu t nosi nazwę mocy promieniowania P :

$$P = \frac{E}{t}. \quad (2)$$

Jednostką mocy jest wat [1 W = 1 J/1 s], czyli dżul na sekundę. Jeżeli promieniowanie optyczne rozchodzi się w postaci ukierunkowanej wiązki, używa się dodatkowych określeń wyrażających wielkość energii lub mocy promieniowania przypadają-

jących na jednostkę powierzchni przekroju poprzecznego wiązki S wyrażonego w metrach kwadratowych [m²]. W pierwszym przypadku jest to gęstość energii lub napromienienie H :

$$H = \frac{E}{S} \quad (3)$$

wyrażane w dżulach na metr kwadratowy [J/m²].

W drugim przypadku jest to gęstość mocy lub natężenie napromienienia I :

$$I = \frac{P}{S} \quad (4)$$

wyrażane w watach na metr kwadratowy [W/m²].

Parametry te są bardzo ważne, gdyż o skuteczności oddziaływania promieniowania optycznego z tkanką decyduje właśnie gęstość mocy lub energii.

W laserze wykorzystuje się efekty wzajemnego oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z materią, tzw. ośrodkiem aktywnym, którym może być ciało stałe, ciecz lub gaz. W wyniku tego oddziaływania zachodzą zjawiska prowadzące do wzmocnienia i generacji promieniowania. Praca generatora promieniowania (lasera) polega na wykorzystaniu przejść kwantowych między dyskretnymi poziomami atomów, jonów lub cząsteczek materiału, spełniającego warunki wzmocnienia. Rysunek 6.1a przedstawia tzw. boltzmannowski rozkład obsadzenia poziomów energetycznych. Gdy układ kwantowy, np. zbiór atomów, znajduje się w stanie równowagi termodynamicznej w temperaturze T , obsadzenie poszczególnych jego poziomów energetycznych wyznacza zależność:

$$N_i = C \cdot \exp\left(\frac{E_i}{kT}\right), \quad (5)$$

gdzie:

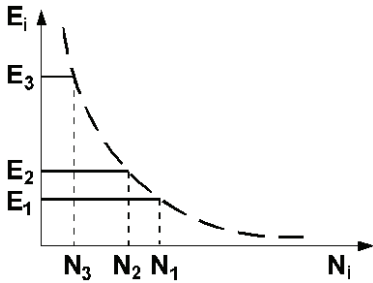
N_i – liczba atomów o energii E_i ,

k – stała Boltzmana,

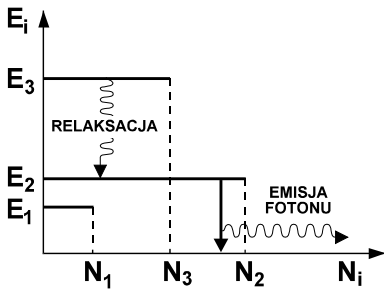
C – stała charakterystyczna dla danego układu kwantowego.

Na osi poziomej na rys. 6.1 przedstawiono liczbę atomów N_i , a na osi pionowej - najbardziej prawdopodobną energię E_i , jaką mają te atomy; przy czym $E_3 > E_2 > E_1$. Oznacza to, że najliczniej obsadzone są poziomy energetyczne o najniższej energii. W wyniku pobudzenia ośrodka aktywnego (np. lampą wyładowczą, silnym polem elektrycznym, innym laserem) dochodzi do wzbudzenia atomów tego ośrodka do wyższego poziomu energetycznego. Więcej atomów znajduje się w stanie wzbudzonym E_2 niż w podstawowym E_1 (przed wzbudzeniem), co z kolei daje efekt tzw. inwersji obsadzeń. Stan ten to stan niestabilny. Wzbudzony ośrodek aktywny może powrócić do

stanu podstawowego w wyniku przejścia promienistego (z emisją fotonu) lub przejścia bezpromienistego (zderzenia między atomami).



a) Rozkład obsadzenia poziomów energetycznych układu kwantowego w stanie niewzbudzonym. Najliczniej obsadzone są poziomy energetyczne o najniższej energii



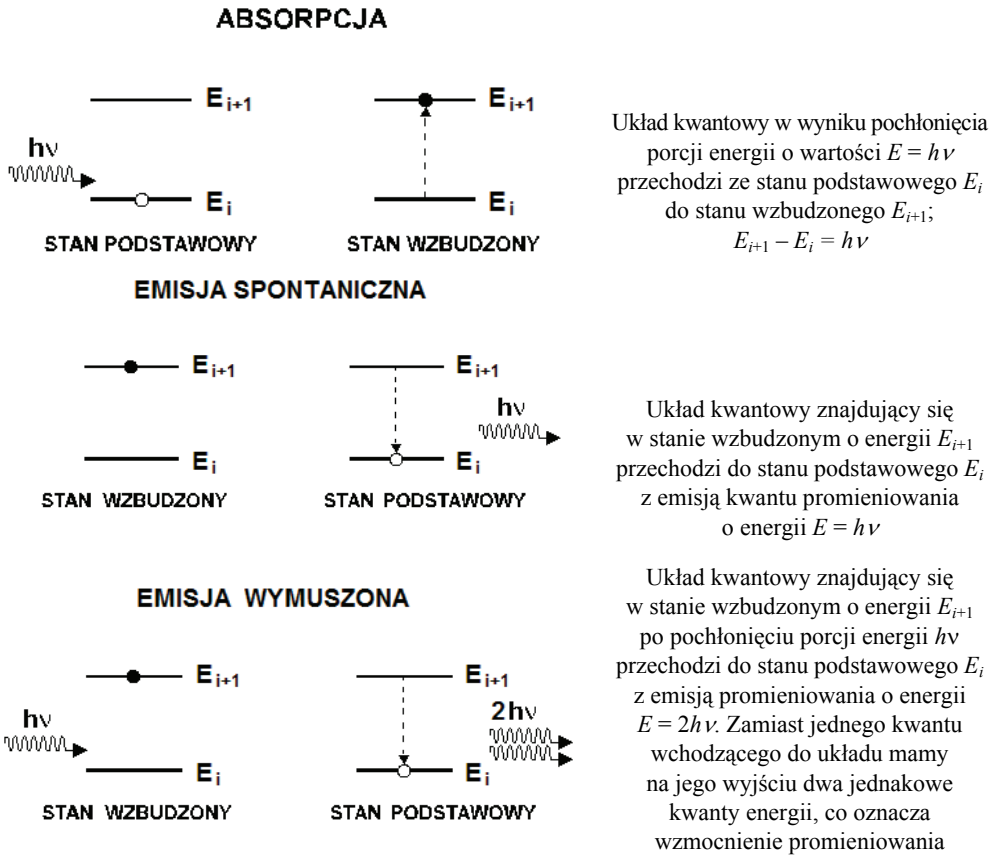
b) Rozkład obsadzenia poziomów energetycznych układu kwantowego w stanie wzbudzonym. Wynikiem pobudzenia jest inwersja obsadzeń; więcej atomów znajduje się w stanie wzbudzonym (N_2, N_3) niż w stanie podstawowym (N_1)

Rys. 6.1. Poziomy energetyczne układu kwantowego w stanie niewzbudzonym (a) oraz w stanie wzbudzonym (b) (według [2])

Emisja fotonu może odbywać się w sposób spontaniczny lub wymuszony (stymulowany) pod wpływem padającego promieniowania elektromagnetycznego. Jeżeli na ośrodek aktywny znajdujący się w stanie inwersji obsadzeń będzie oddziaływać dalej promieniowanie o częstotliwości $\nu = \frac{E_2 - E_1}{h}$, gdzie h jest stałą Plancka ($h\nu$ – energia

kwantu promieniowania), to dochodzi do tzw. emisji wymuszonej, gdzie jeden kwant promieniowania o odpowiedniej energii wyzwala drugi kwant, nie tracąc przy tym swojej energii. Zamiast jednego kwantu wchodzącego do ośrodka aktywnego, na jego wyjściu mamy dwa jednakowe kwanty, co oznacza wzmocnienie promieniowania. Omówioną sytuację wyjaśnia rys. 6.2.

W zależności od rodzaju ośrodka, w którym znajdują się opisane wyżej atomy, stan inwersji obsadzeń można uzyskać w wyniku dostarczania atomom niezbędnej energii różnymi metodami, m.in. poprzez pompowanie optyczne (doprowadzenie do ośrodka promieniowania optycznego, np. z lampy łukowej, błyskowej czy innego lasera), przepływ prądu przez złącze p-n (w półprzewodnikach) lub przez gaz (wyładowanie elektryczne), wykorzystanie energii wiązań chemicznych (w gazach).



Rys. 6.2. Emisja spontaniczna i wymuszona (według [3])

Jeżeli ośrodek zostanie wzbudzony i wytworzona zostanie inwersja obsadzeń, wówczas promieniowanie rozchodzące się w ośrodku, pochodzące z emisji spontanicznej, wymusi emisję promieniowania o takich samych właściwościach i ulegnie wzmocnieniu. Na wzmocnienie ma jednak szansę tylko promieniowanie, które biegnie wzdłuż osi pobudzanego obszaru. Pozostałe szybko wychodzi z ośrodka na zewnątrz. Proces ten będzie narastał lawinowo w kierunku propagacji promieniowania. Jednakże, aby uzyskać duże wzmocnienie promieniowania, ośrodek musiałby być bardzo długi, co byłoby technicznie niewykonalne. Zastosowano więc tzw. dodatnie optyczne sprzężenie zwrotne polegające na tym, że ośrodek umieszcza się pomiędzy dwoma zwierciadłami odbijającymi promieniowanie. Zwierciadła te stanowią tzw. rezonator optyczny. Promieniowanie rozchodzące się wzdłuż osi po wyjściu z ośrodka odbija się od zwierciadła i wraca do ośrodka ulegając dalszemu wzmocnieniu. W ten sposób promieniowanie „krąży” między zwierciadłami, za każdym przejściem ulegając większemu wzmocnieniu. Jeżeli jedno zwierciadło będzie częściowo transmissyjne, wów-

czas część energii promieniowania opuści przez nie rezonator w postaci wiązki laserowej. Oczywiście, żeby to nastąpiło, wzmocnienie w rezonatorze musi przewyższać straty rezonatora (promieniowanie wychodzące z rezonatora uważa się też za stratę). Zatem dopiero współdziałanie ośrodka, w którym występuje inwersja obsadzeń z rezonatorem optycznym, wytwarza wiązkę promieniowania laserowego.

Z powyższego opisu działania lasera wynika, że musi on zawierać materiał aktywny (ośrodek wzmacniający), źródło wzbudzenia (układ pompujący) i obszar umożliwiający wzmocnienie – rezonator.

6.2.2. Właściwości promieniowania laserowego

Foton wygenerowany w wyniku emisji wymuszonej ma ten sam kierunek, jak foton wymuszający, taką samą częstotliwość i fazę. Są to jednocześnie podstawowe cechy promieniowania laserowego: kierunkowość, monochromatyczność, koherentność (spójność) i duża gęstość energii.

Promieniowanie jest emitowane przez laser w postaci mało rozbieżnej wiązki w jednym, określonym kierunku, wyznaczonym przez oś rezonatora optycznego. Wiązka promieniowania ma na ogół małą rozbieżność, to znaczy, że jej średnica nieznacznie zmienia się w miarę oddalania się od lasera. Miarą rozbieżności wiązki jest kąt rozbieżności, który zazwyczaj ma wartość od dziesiątych części stopnia dla laserów gazowych i na ciele stałym do około 20 stopni dla laserów półprzewodnikowych. Możliwe jest skupienie wiązki do średnicy do kilku mikrometrów. Ponieważ cała moc promieniowania zawarta jest w wąskiej wiązce laserowej, można po skupieniu uzyskać bardzo dużą gęstość mocy promieniowania w ognisku soczewki rzędu 10^8 – 10^{12} W/cm².

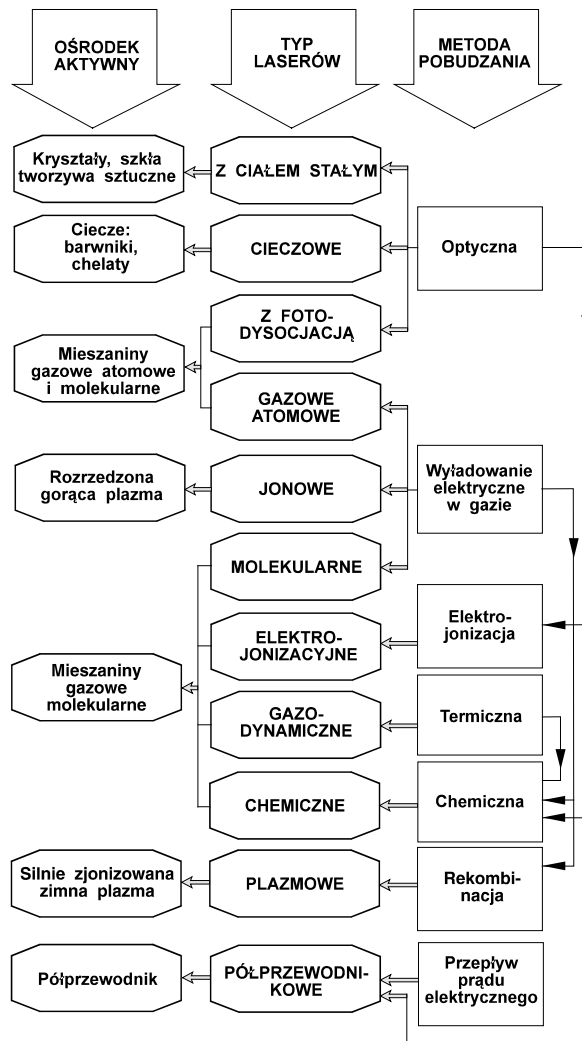
Żadne źródło światła nie emituje promieniowania o jednej długości fali (λ). Promieniowanie emitowane przez klasyczne źródła światła, takie jak lampy wyładowcze, żarówki, diody elektroluminescencyjne, nie jest monochromatyczne, tzn. zawiera różne długości fal. Z widma promieniowania emitowanego przez takie źródło można wydzielić światło jednobarwne o długościach fal zawartych np. między λ i $\lambda + \Delta\lambda$, używając do tego celu odpowiednich przyrządów spektralnych lub filtrów. Jednakże otrzymane w ten sposób promieniowanie ma małą moc – tym mniejszą, im węższe jest pasmo $\Delta\lambda$. W przeciwieństwie do termicznych źródeł światła, lasery emitują promieniowanie w postaci pojedynczych, bardzo wąskich linii spektralnych, które mogą osiągnąć szerokość spektralną nawet $\Delta\lambda = 10^{-7}$ nm, przy czym cała energia promieniowania jest zgromadzona w tej wąskiej linii. Ułatwia to ogniskowanie wiązki laserowej i osiąganie bardzo małych rozmiarów ogniska.

Promieniowanie laserowe jest koherentne (spójne). Oznacza to, że występuje korelacja między fazami drgań w różnych punktach przekroju poprzecznego wiązki w tym samym czasie (spójność przestrzenna) albo między fazami drgań w jednym i tym samym punkcie przekroju poprzecznego wiązki, ale w różnych momentach czasu (spójność czasowa).

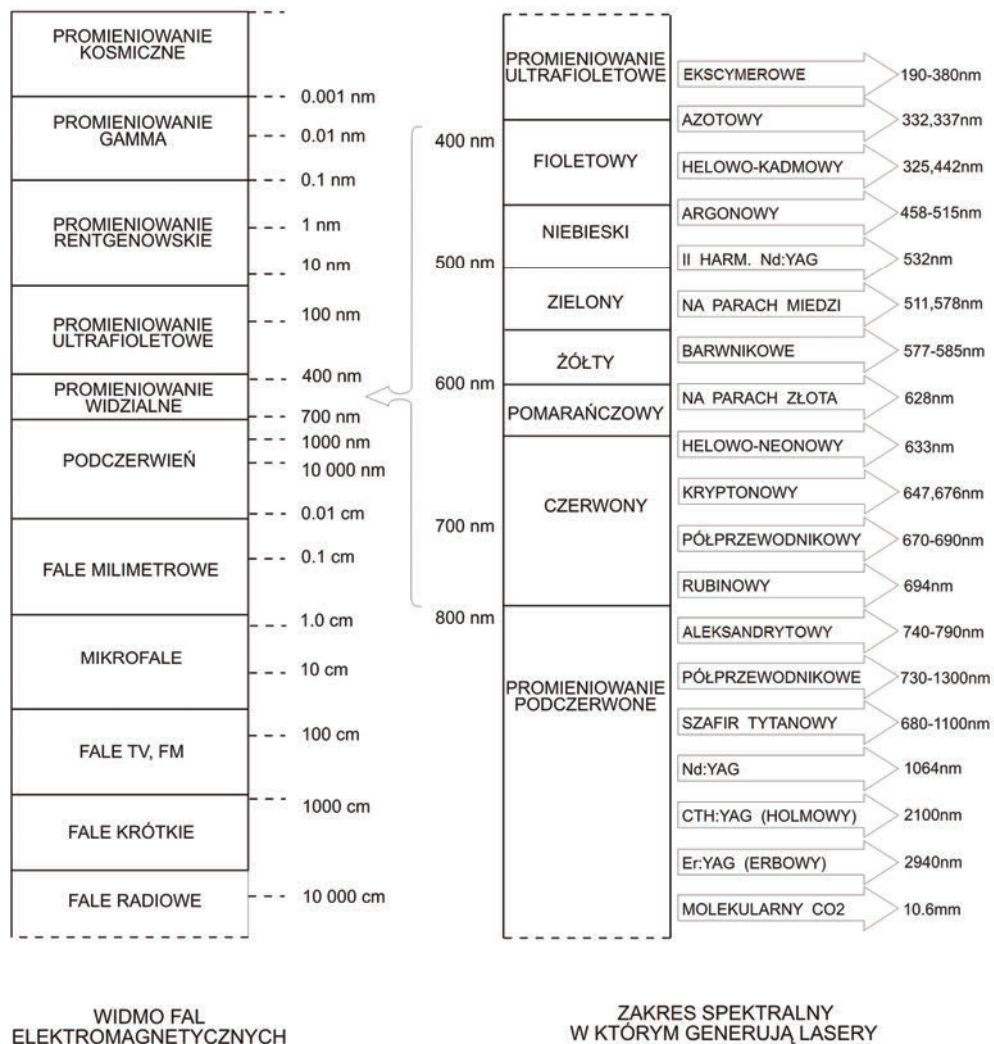
6.2.3. Typy laserów

Lasery dzielą się ze względu na materiał aktywny i sposób pobudzenia. Stan skupienia ośrodków wzmacniających jest najbardziej ogólnym i najczęściej stosowanym kryterium podziału laserów. Rysunek 6.3 przedstawia podział laserów ze względu na ośrodek aktywny i sposób wzbudzenia. Stan skupienia materiału aktywnego pozwala wyróżnić lasery:

- gazowe,
- cieczowe,
- na ciele stałym,
- półprzewodnikowe.



Rys. 6.3. Podział laserów ze względu na ośrodek aktywny i sposób pobudzenia (według [4])



Rys. 6.4. Widmo fal elektromagnetycznych z zaznaczeniem długości fal emitowanych przez typowe lasery stosowane w medycynie (według [5, 6])

Rodzaj ośrodka aktywnego decyduje o generowanej długości fali (barwie) promieniowania. Znane dziś lasery generują promieniowanie od zakresu tzw. próżniowego ultrafioletowego (od 150 nm) poprzez zakres widzialny (380–780 nm) do dalekiej podczerwieni (300 μ m).

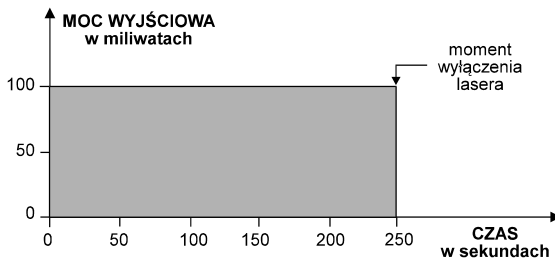
Z punktu widzenia wartości mocy promieniowania lasery dzielimy na:

- małej mocy (do 5 mW),
- średniej mocy (od 6 do 500 mW),
- dużej mocy (powyżej 500 mW).

Rysunek 6.4 przedstawia widmo fal elektromagnetycznych z zaznaczeniem długości fal emitowanych przez typowe lasery stosowane w medycynie, w tym również w układach diagnostycznych i terapeutycznych w medycynie fotodynamicznej.

W zależności od sposobu zasilania i generacji dzielimy lasery na lasery o działaniu ciągłym i impulsowe. Z wiązką ciągłą lasera mamy do czynienia wtedy, gdy moc lasera, mierzona w watach, pozostaje stała (nie zmienia się) przez cały okres jego działania od włączenia. Rysunek 6.5 ilustruje te dwa sposoby zasilania i jednocześnie pracy lasera.

Praca ciągła lasera



Energia emitowana przez laser

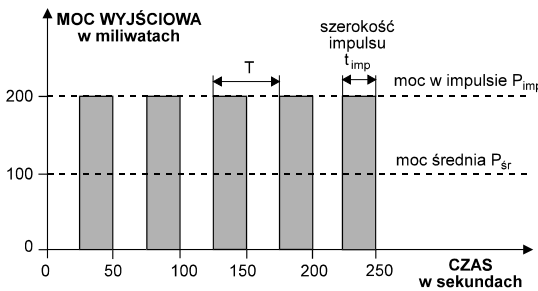
$$E = P \cdot t$$

$$P = 100 \text{ mW} = 0,1 \text{ W}$$

$$t = 250 \text{ s}$$

$$E = 0,1 \text{ W} \cdot 250 \text{ s} = 25 \text{ J}$$

Praca impulsowa lasera



Moc średnia

$$P_{sr} = P_{imp} \cdot t_{imp} \cdot f$$

$$f = \frac{1}{T} = \frac{1}{50} \left[\frac{1}{s} \right]$$

$$P_{sr} = 0,2 \text{ W} \cdot 25 \text{ s} \cdot \frac{1}{50} \frac{1}{s}$$

$$P_{sr} = 0,1 \text{ W} = 100 \text{ mW}$$

Energia emitowana przez laser

$$E = P_{sr} \cdot t$$

$$t = 250 \text{ s}$$

$$E = 0,1 \text{ W} \cdot 250 \text{ s} = 25 \text{ J}$$

Rys. 6.5. Schematyczne przedstawienie dwóch przykładowych podstawowych sposobów zasilania i pracy lasera (według [7])

Na podstawie rysunku łatwo też zrozumieć definicję dawki energetycznej promieniowania (w medycynie dawki terapeutycznej), która jest iloczynem mocy ciągłej i czasu działania lasera odniesionym do jednostki powierzchni naświetlanej tym promieniowaniem.

W przypadku lasera ciągłego energia E (w dżulach [J]) emitowana przez laser określana jest jako iloczyn mocy ciągłej promieniowania P (w watach [W]) i czasu emisji promieniowania t (w sekundach [s]):

$$E = P \cdot t \quad (6)$$

W przypadku lasera impulsowego, aby określić jego dawkę energetyczną trzeba znać trzy parametry: moc w impulsie P_{imp} (moc szczytową), szerokość impulsu t_{imp} (czas trwania impulsu) i liczbę pojedynczych impulsów emitowanych w ciągu 1 sekundy, czyli częstotliwość powtarzania impulsów f , która jest odwrotnością czasu T pomiędzy początkami dwóch kolejnych impulsów. Mnożąc te trzy parametry, otrzymujemy tzw. średnią moc promieniowania P_{sr} :

$$P_{sr} = P_{imp} \cdot t_{imp} \cdot f. \quad (7)$$

Energia E (w dżulach [J]) emitowana przez laser impulsowy określana jest jako iloczyn mocy średniej ciągu impulsów P_{sr} (w watach [W]) i czasu emisji t (w sekundach [s]):

$$E = P_{sr} \cdot t. \quad (8)$$

6.2.4. Przegląd laserów

6.2.4.1. Laser helowo-neonowy

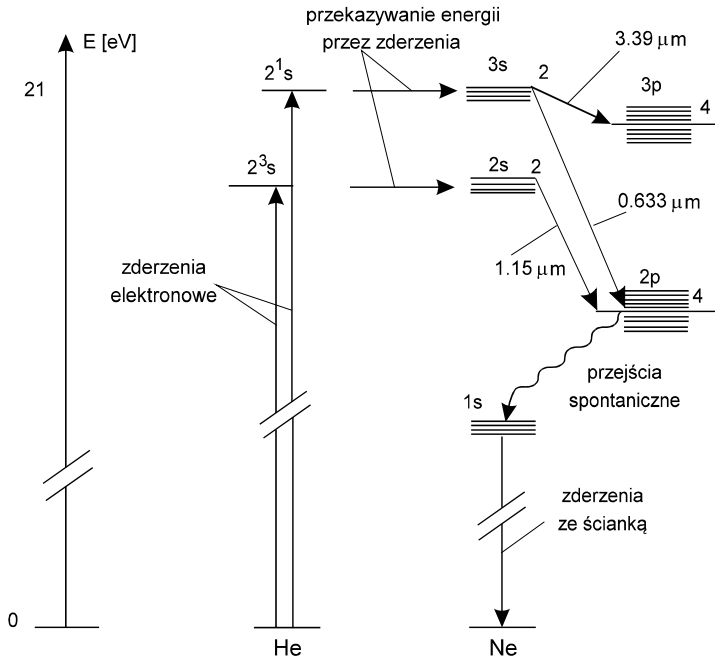
Laser helowo-neonowy (He-Ne) należy do laserów gazowych – atomowych. Ośrodkiem czynnym w tym laserze są atomy neonu, a atomy helu stanowią tzw. gaz buforowy. Mieszanina tych gazów znajdująca się w rurze szklanej jest pobudzana wyładowaniem elektrycznym. Podczas wyładowania w gazie na skutek zderzeń elektronów zostają wzbudzone głównie atomy helu. Atomy te przechodzą przy tym do poziomów wzbudzonych, które pokrywają się z poziomami wzbudzonymi atomów neonu. W wyniku zderzeń między wzbudzonymi atomami helu i atomami neonu następuje pompowanie atomów neonu ze stanu podstawowego do stanu wzbudzonego. W ten sposób zostaje osiągnięta inwersja obsadzeń między poziomami 3s i 2s a poziomami 3p i 2p atomów neonu, energetycznie niższymi.

Atomy helu służą więc tylko do selektywnego przenoszenia energii od ruchomych elektronów do mogących wywołać akcję laserową atomów neonu. Opróżnienie dolnych poziomów laserowych dokonuje się na skutek spontanicznego przejścia promienistego do metastabilnego poziomu 1s neonu, a przejścia do stanu podstawowego dokonują się w wyniku zderzeń atomów neonu ze ścianką rury laserowej.

Na rysunku 6.6 zobrazowano przejścia laserowe, możliwe do realizacji w laserze He-Ne. Najsilniejszą emisję uzyskuje się dla długości fali 632,8 nm, która jest wykorzystywana w układach terapeutycznych do wzbudzania reakcji fotodynamicznej z pochodnymi hematoporfiryny.

Maksymalne moce wyjściowe osiągnane w laserze He-Ne wynoszą ok. 100 mW dla rury laserowej o długości 2 m. Stosowane są również układy zbudowane z kilku

mniejszych rur laserowych (np. 20 mW, długość rury ok. 80 cm), w których moce poszczególnych wiązek laserowych są sumowane do wartości 100÷200 mW za pomocą systemu pryzmatów lub w wyniku zastosowania soczewki skupiającej.



Rys. 6.6. Schemat poziomów energetycznych lasera He-Ne (według [8])

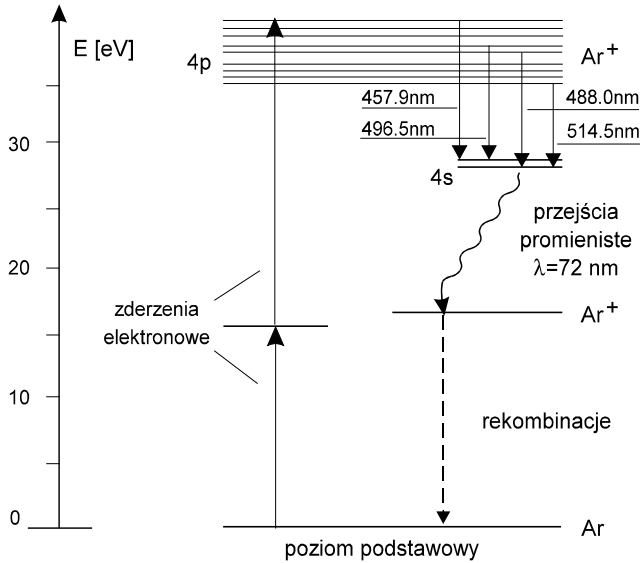
6.2.4.2. Laser argonowy

Laser argonowy (Ar^+) należy do laserów gazowych – jonowych. Ośrodkiem czynnym w tym laserze są zjonizowane atomy argonu. W przeciwieństwie do lasera He-Ne, w laserze argonowym atomy aktywne są wzbudzone w stanie zjonizowanym.

Jonizacja i wzbudzenie atomów argonu mają miejsce podczas wyładowania łukowego na skutek zderzeń z elektronami. Górny poziom laserowy jest bezpośrednio obsadzony przez przejścia promieniste z wyższych wzbudzanych poziomów (patrz rys. 6.7). Dolny poziom jest opróżniany przez przejścia optyczne w ultrafioletcie oraz przez rekombinację. Laser argonowy generuje na ogół kilka długości fal jednocześnie, gdyż są możliwe różne przejścia między poziomami laserowymi. Całkowita moc rozkłada się na poszczególne długości fal w następujących (w przybliżeniu) proporcjach: 488,0 nm – 55%, 514,5 nm – 30%, 496,5 nm – 8%, inne długości fal – 7%.

W czasie pracy lasera w zależności od warunków pobudzenia, występują nieznaczne fluktuacje w rozkładzie mocy wiązek poszczególnych generowanych długości fal.

Emitowane długości fal można wybrać wewnątrz lub na zewnątrz rezonatora za pomocą pryzmatu lub siatki dyfrakcyjnej.



Rys. 6.7. Schemat poziomów energetycznych lasera argonowego (na podstawie [9])

Moc wyjściowa lasera zależy od natężenia prądu i średnicy rury. Wymagane w tym przypadku wyładowanie łukowe i duże gęstości prądu stanowią o złożoności konstrukcyjnej tego lasera. Technologia wykonania rury wyładowczej lasera argonowego, na skutek dużego obciążenia prądowego, stwarza wiele trudności, co ma wpływ na duży koszt tego lasera. Moce wyjściowe komercyjnie dostępnych laserów argonowych wynoszą od kilku do kilkunastu watów.

6.2.4.3. Laser kryptonowy

Laser kryptonowy (Kr^+), podobnie jak laser argonowy, należy do laserów gazowych – jonowych. Ośrodkiem czynnym w tym laserze są zjonizowane atomy kryptonu. Laser kryptonowy ma zupełnie podobne wymagania co do warunków wzbudzenia, jak laser argonowy i umożliwia generację wielu długości fal, z których najintensywniejsze to: 406,7 nm, 461,9 nm, 647,1 nm, 676,5 nm.

W wielu handlowych typach laserów stosuje się mieszaninę argonu i kryptonu, tak że jest możliwa praca kombinowana na odpowiednich przejściach laserowych.

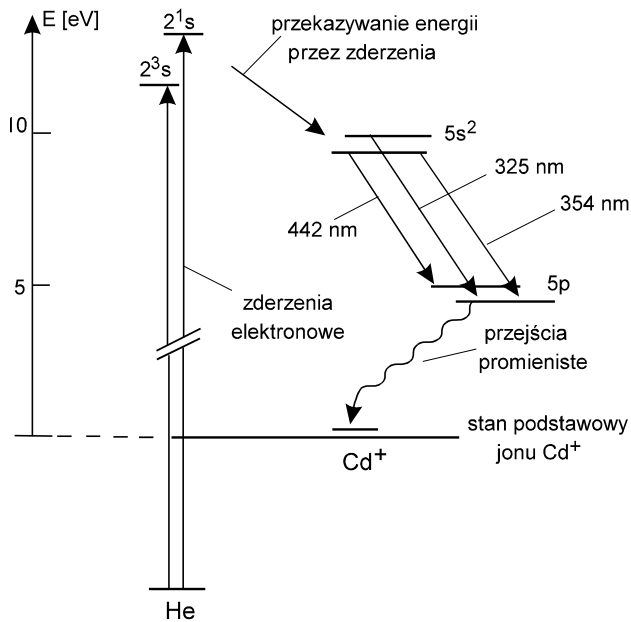
W metodzie fotodynamicznej lasery kryptonowe stosowane są w układach diagnostycznych ($\lambda = 406,7$ nm) oraz w układach terapeutycznych ($\lambda = 647,1$ nm) do wzbudzenia m.in. pochodnych chlorofilu i ftalocyjanin.

6.2.4.4. Laser helowo-kadmowy

Laser helowo-kadmowy He-Cd należy do grupy laserów jonowych. W porównaniu do omawianych wcześniej laserów jonowych gazowych ma tę zaletę, że jego plazma ma stosunkowo niską temperaturę, tak że dużo łatwiejsze do rozwiązania są problemy technologiczne.

Podobnie, jak w przypadku lasera He-Ne, przenoszenie energii z wyładowania w gazie do aktywnych atomów kadmu odbywa się przez atomy helu, chociaż występuje również, w niewielkim stopniu, wzbudzenie jonów Cd wskutek zderzeń z elektronami. Jak pokazano na rys. 6.8, atomy helu wzbudzone do stanów metastabilnych (2^3s lub 2^1s), za pomocą zderzeń elektronowych, oddają swoją energię atomom kadmu w stanie podstawowym. Atomy kadmu są przy tym jonizowane i wzbudzone do poziomu $5s^2$ jonu kadmu.

Możliwe są trzy przejścia laserowe, którym odpowiada generacja promieniowania o długościach fal: 325,0 nm, 354,0 nm i 441,6 nm. Opróżnienie dolnych poziomów laserowych dokonuje się w wyniku przejść promienistych.



Rys. 6.8. Schemat poziomów energetycznych lasera He-Cd (na podstawie [8])

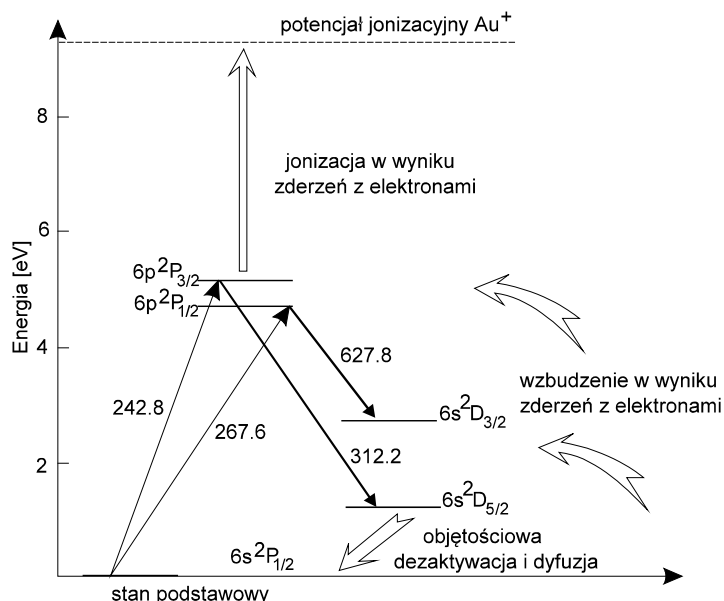
Specyficznym problemem laserów He-Cd i innych laserów jonowych na parach metali jest uzyskanie stałej w czasie i możliwie jednorodnej na całej długości rury koncentracji par metalu. Aby otrzymać stałe ciśnienie par metalu, należy utrzymywać dokładnie stałą temperaturę rury laserowej i ogrzewanego zbiornika z metalem.

6.2.4.5. Laser na parach złota

Laser na parach złota należy do grupy laserów gazowych, w których ośrodkiem aktywnym są pary złota w stanie atomowym. Inwersję obsadzeń w ośrodku aktywnym uzyskuje się poprzez impulsowe wyładowanie elektryczne w mieszaninie par złota i gazu buforowego (hel lub neon), który stabilizuje wyładowanie. Laser ten należy do grupy określanej mianem laserów „cyklicznych” na parach metali. Lasery „cykliczne” pracują w reżimie impulsowym, który wynika z krótkiego czasu życia poziomu wzbudzonego (kilkaset ns); typowe częstotliwości powtarzania impulsów zawarte są w przedziale 2–20 kHz, przy czasach trwania impulsów od 10 do 60 ns.

Moce wyjściowe handlowych laserów na parach złota generujących promieniowanie o długości fali 627,8 nm wynoszą do 10 W przy chłodzeniu wodnym. Przy chłodzeniu powietrznym – do 1,5 W. Czas życia rury wyładowczej wynosi powyżej 300 godzin dla każdego napełnienia metalem

Jak pokazano na rys. 6.9, atomy złota w wyniku zderzeń z elektronami powstałymi w wyniku wyładowania łukowego (wzbudzenie zderzeniowe), zostają wzbudzone do stanów ${}^2P_{3/2}$ i ${}^2P_{1/2}$. Możliwe są dwa przejścia laserowe ze stanów wzbudzonych do dwóch poziomów metastabilnych, którym odpowiada generacja promieniowania o długościach fal: 312,2 nm (ultrafiolet) i 627,8 nm (linia czerwona). Z poziomów metastabilnych atomy złota wracają do poziomu podstawowego w wyniku objętościowej dezaktywacji i dyfuzji.

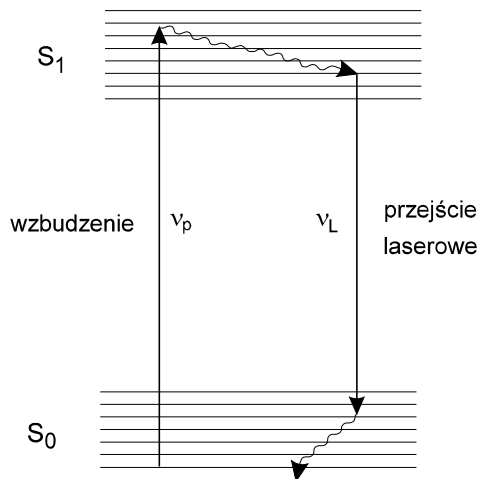


Rys. 6.9. Schemat poziomów energetycznych lasera na parach złota (na podstawie [10])

6.2.4.6. Lasery barwnikowe

Lasery barwnikowe są laserami, w których ośrodkiem aktywnym jest barwnik organiczny rozpuszczony najczęściej w metanolu lub etanolu. Roztwór barwnika znajdujący się w specjalnej kuwecie, pobudzony np. lampą błyskową lub laserem fluoryzuje, a jeśli znajdzie się pomiędzy dwoma zwierciadłami rezonatora optycznego, może zostać zainicjowana akcja laserowa.

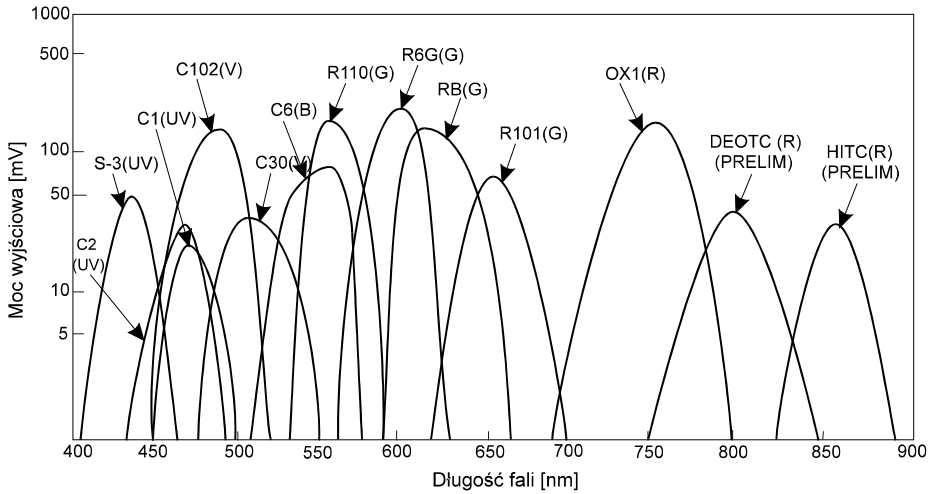
Cząsteczki barwników organicznych mają złożoną strukturę, z wieloma możliwościami drgań między poszczególnymi atomami i grupami atomów. Stąd na schemacie poziomów energetycznych (patrz rys. 6.10) na poziomy elektronowe S_0 , S_1 , ... nakłada się duża liczba poziomów oscylacyjnych, między którymi dochodzi do wymiany energii przez szybkie przejścia relaksacyjne. W wyniku pompowania optycznego, najczęściej z wykorzystaniem laserów impulsowych (azotowy, ekscymerowy, argonowy, II harmoniczna Nd:YAG) lub laserów ciągłego działania (argonowy, miedziowy), może być osiągnięta inwersja obsadzeń między górnymi poziomami oscylacyjnymi elektronowego stanu podstawowego S_0 a dolnymi wzbudzonymi poziomami elektronowymi S_1 .



Rys. 6.10. Uproszczony schemat poziomów energetycznych lasera barwnikowego (według [11])

Cechą charakterystyczną laserów barwnikowych jest możliwość płynnego przestrajania długości fali, zarówno w laserach ciągłego działania, jak i impulsowych. Przystrajanie może odbywać się za pomocą siatek dyfrakcyjnych lub pryzmatów.

Na rysunku 6.11 zilustrowano przykładowo zakresy generacji i osiągane moce wyjściowe lasera barwnikowego CR-599-21 firmy COHERENT z różnymi barwnikami pompowanymi laserem argonowym INNOVA 200-10.



Rys. 6.11. Krzywe generacji lasera barwnikowego CR-599-21 firmy COHERENT

W metodzie fotodynamicznej lasery barwnikowe ze względu na możliwość szerokiego przestrajania generowanej długości fali (praktycznie od 360 do 800 nm), są uniwersalnymi źródłami promieniowania w układach diagnostycznych do wzbudzenia fluorescencji barwników endo- i egzogennych oraz w układach terapeutycznych do wzbudzenia reakcji fotodynamicznej praktycznie wszystkich fotosensybilizatorów.

6.2.4.7. Laser azotowy

Laser azotowy jest przykładem lasera gazowego molekularnego. Inwersję obsadzeń w tym laserze realizuje się w impulsowym wyładowaniu elektrycznym na przejściach między stosunkowo wysoko położonymi wzbudzonymi poziomami elektronowymi cząsteczki azotu N_2 . Laser azotowy pracuje w zakresie ultrafioletu, najczęściej generuje długość fali 337 nm. Czas trwania impulsu wynosi zwykle od 5 do 10 ns, energia wyjściowa kilka mJ i częstotliwość generacji od 50 do 100 Hz.

W metodzie fotodynamicznej lasery azotowe stosowane są w układach diagnostycznych do wzbudzenia autofluorescencji oraz jako źródło wzbudzenia laserów barwnikowych stosowanych w układach diagnostycznych i terapeutycznych.

6.2.4.8. Lasery ekscimerowe

Lasery ekscimerowe są laserami gazowymi molekularnymi, w których ośrodek aktywny pod stosunkowo wysokim ciśnieniem w postaci niestabilnego związku jonów (tzw. ekscimerów – (ang. *excimers*)) powstaje w wyniku wyładowania elektrycznego lub oddziaływania z wiązką elektronów w gazie.

Ekscymer charakteryzuje się tym, że nie istnieje w stanie podstawowym. Do najbardziej efektywnych laserów ekscymerowych zaliczyć można lasery kryptonowo-fluorowe KrF ($\lambda_{gen} = 248$ nm), lasery ksenonowo-chlorowe XeCl ($\lambda_{gen} = 308$ nm), argonowo-fluorowe ArF ($\lambda_{gen} = 193$ nm). Lasery te emitują impulsy promieniowania o czasie trwania od 10 do 300 ns, o energii do ok. 0,3 J z częstotliwością powtarzania generacji do 100 Hz. Do zalet tych laserów należy wysoka sprawność; rzędu 10%, długość generowanej fali (ultrafiolet), duża moc generacji i możliwość przestrajania. Lasery ekscymerowe stosowane są do pompowania laserów barwnikowych, a także w oftalmologii.

6.2.4.9. Lasery SHG Nd:YAG

Laser Nd:YAG jest laserem zbudowanym na ciele stałym, w którym materiałem aktywnym jest kryształ granatu itrowo-aluminiowego (YAG – *Yttrium Aluminium Garnet*) domieszkowany jonami neodymu Nd^{3+} . Laser ten generuje promieniowanie podczerwone o długości fali 1064 nm. W wyniku oddziaływania tego promieniowania z kryształem nieliniowym, przy spełnieniu określonych warunków fazowych, zachodzi proces generacji II harmonicznej (SHG – *Second Harmonic Generation*) i na wyjściu rezonatora z kryształem nieliniowym otrzymuje się promieniowanie o długości fali 532 nm.

Często lasery SHG Nd:YAG nazywane są laserami KTP/532, ze względu na nazwę najczęściej stosowanego kryształu, w którym zachodzi, z wysoką wydajnością, konwersja promieniowania podczerwonego na światło zielone.

Lasery SHG Nd:YAG w metodzie fotodynamicznej są stosowane do pompowania laserów barwnikowych i niektórych laserów przestrajalnych z ciałem stałym (laser na szafirze tytanowym, laser forsterytowy). Mogą być również stosowane w układach terapeutycznych do naświetlania powierzchniowych nowotworów.

6.2.4.10. Lasery półprzewodnikowe i diody elektroluminescencyjne

W wyniku przepływu prądu elektrycznego (strumienia elektronów) przez złącze p-n na granicy dwóch obszarów półprzewodnika o różnym stopniu domieszkowania (obszar n – nadmiar elektronów, obszar p – niedomiar elektronów), zachodzi generacja promieniowania. Zjawisko to nazywane jest elektroluminescencją. Elektroluminescencja złącza p-n bezpośrednio wykorzystywana jest w diodach LED, które w zależności od charakterystyk materiałowych półprzewodników tworzących złącze p-n (rodzaj materiału, rodzaj domieszki, stopień domieszkowania itp.), generują promieniowanie od ok. 500 nm do ok. 30 μm .

Aby powstała akcja laserowa na złączu p-n, konieczne jest zastosowanie układu zwierciadeł tworzących rezonator. W laserze półprzewodnikowym rolę zwierciadeł pełnią dwie wypolerowane ściany kryształu półprzewodnika prostopadle do płaszczy-

zny złącza. Wiązka promieniowania laserowego powstaje w złączu, prostopadle do wypolerowanych ścian. W niektórych wypadkach funkcję zwierciadeł spełniają naturalne ściany kryształu, doskonale równoległe i gładkie. Zalety lasera półprzewodnikowego są następujące:

- a) może być łatwo i wygodnie wzbudzany prądem elektrycznym, a tym samym łatwo modulowany,
- b) wykazuje wysoką wydajność kwantową, można uzyskać dużą sprawność konwersji energii elektrycznej w promienistą,
- c) długość fali generowanego promieniowania może być zmieniana poprzez zmianę prądu zasilania,
- d) ma małe wymiarami i masę, niskie napięcie zasilania, wysoką niezawodność i trwałość.

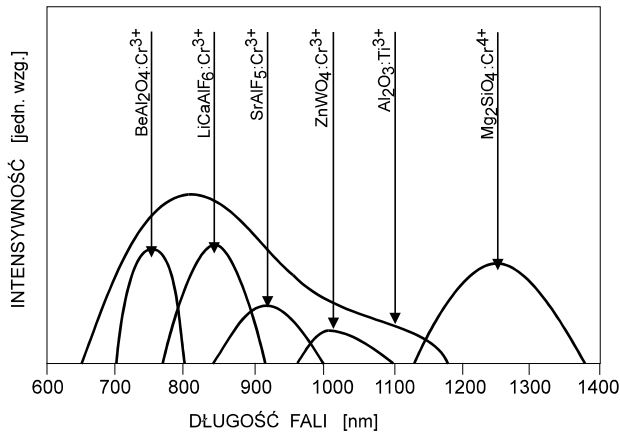
Jedną z niedogodności promieniowania emitowanego przez lasery półprzewodnikowe jest rozkład poprzeczny generowanej wiązki. Jest ona bardziej rozbieżna w porównaniu do innych laserów. Zwykle w jednej płaszczyźnie rozbieżność jest większa, co wynika z kształtu i wymiarów poprzecznych generującego złącza p-n, stąd też owalny rozkład poprzeczny promieniowania tych laserów, który czasem wymaga korekcji za pomocą specjalnych układów optycznych.

Przez odpowiedni dobór półprzewodników można generować promieniowanie w zakresie widzialnym (635 nm, 670 do 690 nm), w bliskiej podczerwieni (780 do 960 nm), w średniej i dalekiej podczerwieni (do 12 μm) [12].

6.2.4.11. Lasery przestrajalne na ciele stałym

Materiałem aktywnym laserów przestrajalnych na ciele stałym są kryształy domieszkowane jonami metali o charakterystycznych właściwościach, wynikających z ich struktury atomowej. Są to zwykle jony chromu Cr, tytanu Ti lub kobaltu Co, a więc metali z niezapełnionymi wewnętrznymi powłokami elektronowymi, wskutek czego w wyniku oddziaływania takich jonów z polem elektrycznym sieci krystalicznej następuje rozszczepienie poziomów energetycznych. Na schemacie poziomów energetycznych, który przypomina strukturę poziomów kwantowych barwników, na stany elektronowe nakłada się duża liczba poziomów oscylacyjnych, między którymi dochodzi do wymiany energii przez szybkie przejścia relaksacyjne.

W wyniku pompowania optycznego, najczęściej z wykorzystaniem laserów, może być osiągnięta inwersja obsadzeń. Materiały te charakteryzują się szerokim widmem luminescencji i mogą generować dowolną długość fali. Wynika stąd możliwość płynnego przestrajania generowanej długości fali. Przestrajanie może odbywać się za pomocą siatek dyfrakcyjnych lub pryzmatów. Na rysunku 6.12 zilustrowano zakresy generacji niektórych laserów przestrajalnych z ciałem stałym.



Rys. 6.12. Obszary generacji promieniowania przez niektóre przestrajalne lasery na ciele stałym (na podstawie [13])

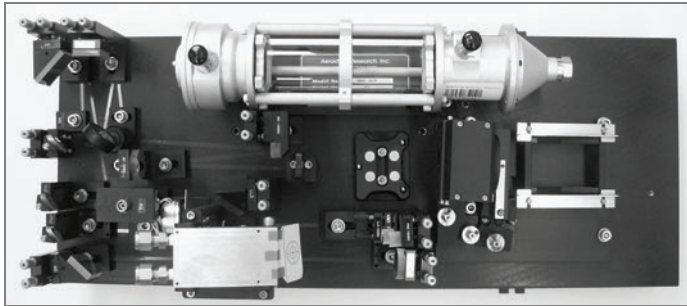
Praktyczne zastosowanie lasery przestrajalne znalazły w fotodynamicznej metodzie leczenia PDT, szczególnie laser tytanowy z szafirem tytanowym $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Ti}^{3+}$ i laser forsterytowy z forsterytem $\text{Mg}_2\text{SiO}_4:\text{Cr}^{4+}$. Zakresy długości fal 700 do 1200 nm lasera $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Ti}^{3+}$ i 1150 do 1350 nm lasera $\text{Mg}_2\text{SiO}_4:\text{Cr}^{4+}$, można znacznie rozszerzyć, wykorzystując oddziaływanie generowanego przez te lasery promieniowania z kryształami nieliniowymi i generację II harmonicznej tego promieniowania, czyli długości fal 350 do 600 nm w przypadku lasera tytanowego i 575 do 675 nm w przypadku lasera forsterytowego.

6.2.4.12. Lasery kaskadowe

Kwantowe lasery kaskadowe (ang. *quantum cascade laser*, QCL) stanowią nową klasę unipolarnych laserów półprzewodnikowych, których działanie oparte jest na przejściach wewnątrzpasmowych. W odróżnieniu od klasycznych laserów półprzewodnikowych, wykorzystujących przejścia międzypasmowe, długość fali emitowanego przez nie promieniowania praktycznie nie zależy od materiału, z którego są wykonane, a jedynie od geometrii wnęk kwantowych, stanowiących obszar czynny. Pozwala to generację szerokiego spektrum długości fal od bliskiej poprzez średnią do dalekiej podczerwieni, za pomocą struktur wytwarzanych na bazie materiałów GaAs i InP, których technologia wytwarzania jest doskonale opanowana.

Kaskadowa natura generacji promieniowania pozwala na powielanie fotonów i potencjalnie umożliwia uzyskanie dużych mocy. Z kolei obecność tylko jednego rodzaju nośników (elektronów) eliminuje większość niekorzystnych procesów rekombinacji niepromienistej. Listę zalet laserów kaskadowych zamyka ich sub-pikosekundowa szybkość działania wynikająca z ultraszybkiej dynamiki przejść wewnątrzpasmowych.

Lasery kaskadowe są idealnym źródłem promieniowania w układach detekcji zanieczyszczeń gazowych, spektroskopii molekularnej i systemach telekomunikacji w swobodnej przestrzeni. Można również myśleć o ich zastosowaniach w medycynie, do wczesnego wykrywania skażeń i substancji biologicznych. Na rysunku 6.13 pokazano czuły analizator metanu z wykorzystaniem lasera kaskadowego o długości fali 7,85 μm . i komórki wielokrotnych przejść.



Rys. 6.13. Konstrukcja analizatora metanu na poziomie sub-ppm z wykorzystaniem lasera kaskadowego i komórki wielokrotnych przejść

6.3. Kierunki rozwoju laserów

6.3.1. Niebieska optoelektronika

Konstrukcja pierwszej niebieskiej diody elektroluminescencyjnej w 1992 roku zapoczątkowała „niebieską rewolucję” w optoelektronice. Osiągnięcie to pozwoliło na przełamanie ostatniej bariery na drodze do uzyskania kompletu barw światła emitowanego przez przyrządy półprzewodnikowe. Budowa pierwszego niebieskiego lasera przez Shuji Nakamurę w 1996 roku oraz opracowanie miniaturowych komercyjnych laserów umożliwiło wielokrotne zwiększenie gęstości zapisu informacji, a także stworzyło podstawy do opracowania energooszczędnych źródeł światła, projektorów i wyświetlaczy opartych na technice półprzewodnikowej.

Termin „niebieska optoelektronika” obejmuje wszystkie przyrządy i urządzenia optoelektroniczne konstruowane na bazie nowego systemu półprzewodników InN-GaN-AlN [12]. Kluczowym materiałem w tym systemie jest azotek galu, GaN. Zbudowanie pierwszego na świecie lasera niebieskiego otwiera perspektywy rozwoju nowych przyrządów niebieskiej optoelektroniki, a wśród nich przyrządów półprzewodnikowych emitujących koherentne światło w zakresie od 360 do 480 nm, jakimi są niebieskie diody laserowe. Zakres zastosowań niebieskich diod laserowych jest bardzo szeroki i obejmuje optyczny zapis informacji (możliwość zapisania do ok. 20 GB in-

formacji), pamięci holograficzne lub wielowarstwowe płyty DVD, techniki szybkiego druku, projekcyjną telewizję laserową, technologie spektroskopowe stosowane w medycynie, monitoringu zanieczyszczeń, systemach bezpieczeństwa chemicznego i biologicznego, termografię laserową.

„Światło niebieskie” (400–500 nm) jest wykorzystywane w diagnostyce i terapii nowotworów i stanów przednowotworowych metodą fotodynamiczną jako źródło światła do naświetlania tkanki powierzchniowej.

Niebieski laser półprzewodnikowy ma również zastosowanie w optoelektronicznym systemie detekcji śladowych obecności dwutlenku azotu, która określana była na podstawie czasu zaniku natężenia promieniowania magazynowanego we wnęce optycznej. Detektory AlGaN wykorzystano przy opracowaniu przepływowego miernika stężenia ozonu w wodzie. Jest to bardzo precyzyjne narzędzie wykrywania i oznaczania stężenia ozonu, które umożliwia pełną automatyzację pomiaru, jednoznaczność wyników, możliwość dokonywania pomiarów bez konieczności pobierania próbki. Na rysunku 6.14 pokazano przepływowy miernik ozonu, w którym wykorzystano detektory AlGaN typu SOLAR BLIND umożliwiające pomiar w zakresie stężeń od 0 do 2 ppm z rozdzielczością 0,01.



Rys. 6.14. Przepływowy miernik ozonu z detektorem AlGaN typu Solar Blind

W oparciu o „niebieskie źródła światła” powstał pierwszy produkt dla stomatologii umożliwiający wykrywanie próchnicy w jej bardzo wczesnym stadium na powierzchniach gładkich i w bruzdach. Pod wpływem światła emitowanego przez lampę diagnostyczną, miejsca występowania zmian próchnicowych świecą w kolorze różowym. W ten sposób można wykryć również mikroprzecieki bakteryjne wokół nieszczelnych wypełnień. Nadaje się również do monitorowania skuteczności leczenia próchnicy.

6.3.2. Mikrolasery

Wykorzystanie w układach pompowania wysokosprawnych, półprzewodnikowych diod laserowych stwarza możliwość znacznego zmniejszenia wymiarów ośrodka

czynnego i długości optycznej rezonatora. Pozwala to na praktyczną realizację, prostego w konstrukcji, lasera jednoczesnościowego – mikrolasera.

Główne obszary zastosowań opracowanych mikrolaserów, to nowa generacja dalmierzy laserowych z odbiorem bezpośrednim i podszumowym, systemy laserowe do układów wskazywania celów oraz urządzenia detekcji koherentnej stosowane m.in. w radarach laserowych. Opracowanie mikrolaserów generujących promieniowanie „bezpieczne dla oka” tworzy ponadto bazę podzespołów urządzeń i systemów stosowanych w metrologii, automatyce, medycynie i ochronie środowiska.

Pod koniec lat osiemdziesiątych pojawił się termin „*eye-safe lasers*”, czyli lasery „bezpieczne dla wzroku”. Wprowadzono nową generację dalmierzy laserowych z nadajnikami emitującymi promieniowanie o długości fali około $1,5 \mu\text{m}$ [14, 15]. Długość fali $1,5 \mu\text{m}$ jest uważana, że jest bezpieczna przy bezpośrednim patrzeniu w wiązkę przy gęstościach energii 100 razy większych niż dla $10,6 \mu\text{m}$ (laser CO_2), oraz $2 \cdot 10^5$ razy większych niż przy długości fali $1,06 \mu\text{m}$ (laser YAG:Nd^{3+}) [16, 17].

Na początku lat dziewięćdziesiątych po raz pierwszy zastosowano do generacji promieniowania laserowego o długości fali $1,5 \mu\text{m}$ szkło fosforanowe erbowo-iterbowe [18]. Układy laserowe z tym materiałem aktywnym znalazły różne praktyczne zastosowania [19, 20]. Wadą szkła fosforanowego jest niska odporność termiczna i mechaniczna, dlatego trwają poszukiwania nowych, bardziej odpornych matryc szklanych a także ośrodków krystalicznych. W przypadku kryształów stosowanych w układach generacji promieniowania bezpiecznego dla oka, najczęściej stosowanymi domieszkami aktywnymi są jony Er^{3+} oraz Cr^{4+} [21, 22].

Z przeprowadzonych badań wynika, że efektywnym ośrodkiem krystalicznym do budowy laserów „bezpiecznych dla oka” może być monokryształ $\text{KGW:Er}^{3+}, \text{Yb}^{3+}$ ($1\% \text{Er}^{3+}, 5\% \text{Yb}^{3+}$) generujący promieniowanie o długości fali $\lambda = 1535 \text{ nm}$.

Zainteresowanie mikrolaserami „bezpiecznymi dla oka” wynika z korzystnych charakterystyk propagacyjnych promieniowania z zakresu powyżej $1,5 \mu\text{m}$ w różnych ośrodkach. Dla długości fali $1,55 \mu\text{m}$ występuje minimum absorpcji kwarcowych włókien światłowodowych, w zakresie $1,5\text{--}2 \mu\text{m}$ transmisja atmosfery jest najwyższa, natomiast pochłanianie ośrodków biologicznych i niektórych zanieczyszczeń atmosfery bardzo silne. W związku z tym potencjalne zastosowania laserów generujących promieniowanie „bezpieczne dla oka” obejmują takie obszary, jak telekomunikacja, radary optyczne, pomiary odległości, zdalna detekcja zanieczyszczeń i medycyna [23].

6.3.3. Lasery włóknowe

Lasery włóknowe są źródłami promieniowania o właściwościach znacznie odbiegających od klasycznych laserów ciała stałego. Typowe długości światłowodu stosowanego do budowy lasera włóknowego zawierają się w przedziale od 50 cm (foto-

niczne włókna do źródeł promieniowania typu „supercontinuum”) do około 50 m (lasery włóknowe średniej i dużej mocy w wersji jednostopniowej). Większość procesów technologicznych realizowana jest za pomocą laserów o mocy do ok. 1 kW. W przypadku ekstremalnych wymagań – jak. np. zgrzewanie stali i stopów aluminium, oraz zdalne zgrzewanie blach (np. na liniach produkcyjnych w motoryzacji) – wymagania co do jakości wiązki, ale na znacznie wyższym poziomie mocy, są nominalnie niższe [24].

6.3.4. Lasery hybrydowe

Obszar średniej i bliskiej podczerwieni obejmujący zakres promieniowania optycznego w zakresie od 2 do 12 μm jest jednym z najaktywniejszych obszarów prac badawczych w technice laserowej początku XXI wieku. Zainteresowanie tym obszarem wynika między innymi z tego, że współczesne technologie bezpieczeństwa i monitoringu środowiska korzystają z tego zakresu ze względu na występowanie w nim linii widmowych charakterystycznych dla wielu związków organicznych i biologicznych. Do sondowania atmosfery w celu wykrycia i rozpoznania skażeń, oceny składu atmosfery, pomiaru wilgotności, zawartości dwutlenku węgla, węglowodorów niezbędne jest stosowanie impulsowych wiązek laserowych o długościach fali dostrojonych do konkretnych linii absorpcyjnych. Zakres widmowy średniej podczerwieni wykorzystywany jest również w badaniach materiałowych i chemicznych. Ponadto, zakres widmowy w obszarze do 1,4 do 2,2 μm ma szczególne znaczenie i liczne zastosowania zarówno w życiu cywilnym, jak i technice wojskowej, ze względu na oddziaływanie promieniowania o tych długościach fal na wzrok ludzki. Jest to tak zwany zakres bezpieczny dla wzroku (ang. *eye-safe region*). W obszarze średniej podczerwieni nie są powszechnie dostępne wydajne półprzewodnikowe źródła promieniowania. Warto zwrócić uwagę, że pasmo widma „bezpieczne dla wzroku” ma bardzo ważne właściwości propagacyjne w atmosferze. Dla długości fal powyżej 2 μm transmisja atmosfery jest bardzo duża, natomiast pochłanianie przez parę wodną czy wybrane ośrodki biologiczne i zanieczyszczenia atmosfery jest bardzo silne. Z tego względu, a także z uwagi na możliwość wykrycia chmur (dużego stężenia pary wodnej) poszukiwano laserów generujących promieniowanie o długościach fal z zakresu od 2 do 2,2 μm , którym odpowiada dość znaczna absorpcja w atmosferze. Promieniowanie takie nie jest szkodliwe dla oczu, a dość silna absorpcja uniemożliwiająca głęboką penetrację, bardzo rozszerza gamę różnych (m.in. medycznych) zastosowań. Potencjalne zastosowania laserów generujących promieniowanie „bezpieczne dla wzroku” obejmują takie obszary techniki, jak: telekomunikacja, radary optyczne, pomiary odległości, zdalna detekcja zanieczyszczeń.

Radary laserowe (lidary) emitujące promieniowanie o długości fali 2 μm używane są do obserwacji rozpraszania na aerozolah zawieszonych w atmosferze oraz w lot-

nictwie do rejestracji wirów i prądów powietrznych w okolicach wież kontrolnych. Mogą również stanowić wyposażenie samolotów, aby informować pilota o zmianie kierunku wiatru [24].

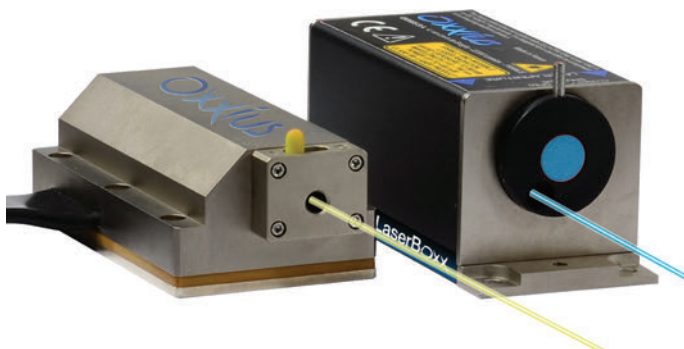
6.3.5. Lasery światłowodowe

Światłowodowe źródła promieniowania koherentnego stają się atrakcyjną alternatywą dla dotychczas stosowanych, tradycyjnych laserów na ciele stałym. W ostatnich latach zaobserwować można wzrost oferowanych mocy wyjściowych i coraz powszechniejsze stosowanie światłowodowych laserów średniej i dużej mocy w wielu dziedzinach przemysłu. Głównym powodem intensywnych prac prowadzonych nad rozwojem tej dziedziny są bardzo dobre właściwości termo-optyczne ośrodka czynnego, w znacznym stopniu przewyższające właściwości ośrodków czynnych stosowanych w klasycznych laserach na ciele stałym. Laser światłowodowy zbudowany na bazie jednomodowego włókna domieszkowanego jonami pierwiastków ziem rzadkich (neodym, iterb, erb itd.) charakteryzuje się ponadto doskonałymi parametrami geometrycznymi wiązki laserowej, a szerokie pasmo wzmocnienia (rzędu kilku do kilkudziesięciu nm) pozwala uzyskiwać pracę impulsową z ultrakrótkimi impulsami (poniżej 100 fs).

Światłowodowe źródła średniej i dużej mocy mogą być realizowane na dwa główne sposoby. Pierwszy z nich, klasyczny, polega na budowie lasera światłowodowego dużej mocy. Taka konstrukcja stanowi naturalne rozwinięcie idei budowy laserów na ciele stałym i doskonale sprawdza się w przypadku budowy źródeł pracy ciągłej. Lasery impulsowe wymagają najczęściej stosowania elementów optyki objętościowej, co utrudnia budowę układów całkowicie światłowodowych, duże gęstości energii we włóknie powodują występowanie niekorzystnych efektów nieliniowych trudnych do wyeliminowania, bardzo trudna jest także równoczesna kontrola kilku parametrów generowanego promieniowania. W takiej sytuacji na pomoc przychodzi kolejna cecha aktywnych światłowodów domieszkowanych jonami pierwiastków ziem rzadkich – wysokie wzmocnienie. W technice światłowodowej możliwe jest zbudowanie źródła dużej mocy z wykorzystaniem lasera sygnałowego małej mocy, którego promieniowanie wzmacniane jest następnie w kaskadzie wzmacniaczy światłowodowych. Jest to tzw. konfiguracja MOPA (ang. *Master Oscillator Power Amplifier*). Kontrolę parametrów promieniowania dużej mocy uzyskuje się, kontrolując laser sygnałowy co jest znacznie łatwiejsze niż bezpośrednia kontrola parametrów lasera dużej mocy. Taka kaskada wzmacniaczy z powodzeniem może być stosowana w tradycyjnych zastosowaniach wzmacniaczy światłowodowych wszędzie tam, gdzie niezbędna jest odpowiednio duża moc wyjściowa (układy standardowe, pasywne sieci optyczne, optokomunikacja w wolnej przestrzeni czy też jako wzmacniacze w układach telewizji kablowej) [24].

Literatura

- [1] SHIMODA K., *Wstęp do fizyki laserów*, PWN, Warszawa 1993.
- [2] WOLIŃSKI W., *Laser i jego właściwości*, X Krajowa Szkoła Optoelektroniki, Zegrze 1995.
- [3] NIECHODA Z., NOWICKI M., *Podstawowe wiadomości o laserach i promieniowaniu laserowym*, [w:] *Zarys klinicznych zastosowań laserów*, D.W. ANKAR, Warszawa 1995.
- [4] TARASOV L.V., *Laser Physics*, Mir Publishers, Moscow 1983.
- [5] KACZMAREK F., *Podstawy działania laserów*, WNT, Warszawa 1983.
- [6] KACZMAREK S., MIERCZYK Z., KUZAKA B., *Podstawy fizyczne medycznych zastosowań laserów*, *Wiadomości Lekarskie*, XLVII, 1994, 11–12.
- [7] POKORA L., *Lasery w stomatologii*, Laser Instruments, Warszawa 1992.
- [8] BRUNNER W., RADLOFF W., JUNGE K., *Elektronika kwantowa. Wprowadzenie do fizyki laserów*, WNT, Warszawa 1980.
- [9] KACZMAREK F., *Wstęp do fizyki laserów*, PWN, Warszawa 1986.
- [10] AINSWORTH M.D., PIPER J.A., *Laser systems for photodynamic therapy in phototherapy of cancer*, ed. G. Morstyn, A.H. Kaye, Haerwood Ac. Publ., 1990.
- [11] JÓZWICKI R., *Optyka laserów*, WNT, Warszawa 1981.
- [12] Praca zbiorowa pod red. LESZCZYŃSKIEGO M. i MIERCZYKA Z., *Optoelektronika, lasery, detektory, sensory*, Ministerstwo Gospodarki, Warszawa 2007.
- [13] JANKIEWICZ Z., *Lasery w medycynie*, X Krajowa Szkoła Optoelektroniki, Zegrze 1995.
- [14] Laser Rangefinders, JANE's Armour and Artillery Upgrades, Jane's Information Group Ltd., Coulsdon, Surrey, UK, 2003.
- [15] SLINEY D.H., *Selected papers on laser safety*, SPIE Milestone Series, Vol. MS-117, Bellingham, Washington 1995.
- [16] IEC Standard EN 825-1: Safety of laser product. Equipment classification, requirements and user's guide, 2000.
- [17] American National Standard for the Safe Use of Lasers, ANSI Z-136.1-1993, 1993.
- [18] JIANG S., MYERS J., RHONEHOUSE D., MYERS M., BELFORD R., HAMLIN S., *Laser and thermal performance of a new erbium doped phosphate glass*, Ed. Kigre, Inc. Hilton Head Island, 1990.
- [19] OBATON A-F., BERNARD J., PARENT C., LE FLEM G., FERNANDEZ-NAVARRO J.M., ADAM J-L., MYERS M.J., BOULON G., *New laser materials for eye-safe sources: Yb³⁺-Er³⁺-codoped phosphate glasses*, OSA Proc. on Advanced Solid-State Lasers, 1999, Vol. 26, 655–657.
- [20] FLUCK R., KELLER U., GINI E., MELCHIOR H., *Eye-safe pulsed microchip laser*, OSA TOPS Advanced Solid State Lasers, 1998, Vol. 19, 146–149.
- [21] WANG P., DAWE J.M., BURNS P., PIPER J.A., ZHANG H., ZHU L., MENG X., *Diode-pumped CW tunable Er³⁺:Yb³⁺:YCOB laser at 1.5–1.6 μm*, Opt. Mat., 2002, Vol. 19, 383.
- [22] MIERCZYK Z., KWAŚNY M., KOPCZYŃSKI K., GIETKA A., ŁUKASIEWICZ T., FRUKACZ Z., KISIELEWSKI J., STĘPIEŃ R., JĘDRZEJEWSKI K., *Er³⁺ and Yb³⁺-doped active media for "eye safe" laser systems*, *Journal of Alloys and Compounds*, 2000, Vol. 300–301, 398–406.
- [23] MIERCZYK Z., *"Eye-safe" laser systems*, Proc. SPIE, 2000, Vol. 4237, 177–188.
- [24] Streszczenia referatów i komunikatów 9. Sympozjum Techniki Laserowej, Szczecin 2009.



LaserBoxx

Lasery DPSS i diodowe

- Wzbudzenie Fluorescencji
- Spektroskopia Ramana
- Cytometria Przepływowa
- Holografia
- Mikroskopia Konfokalna
- Metrologia



Ochrona wzroku przed laserem oraz IPL

- Medycyna
- Stomatologia
- Terapeutyka
- Fluorescencja
- Farmaceutyka
- Lampy Błyskowe / IPL

Pozostałe produkty:

- Lasery UV-VIS-IR
- Urządzenia Laserowe
- Pomiary Laserowe
- Okulary Ochronne
- Komponenty Optyczne
- Urządzenia Pozycjonujące
- Szerokopasmowe Źródła Światła
- Sensory IR
- Sensory UV
- Urządzenia Detekcyjne UV
- Spektrometry
- Wyświetlacze
- Fluorymetry
- Urządzenia Pomiarowe

Scitec Instruments Polska
Malinowskiego 1/12
02-776 Warszawa
Polska

t1. 22 406 81 27
t2. 22 254 92 18
k. 605 083 692
f. 22 406 81 27
e. sales@scitecinstruments.pl

scitec
SCITEC INSTRUMENTS POLSKA

www.scitecinstruments.pl

ROZDZIAŁ 7

ODDZIAŁYWANIE ŚWIATŁA Z TKANKĄ

Agnieszka Ulatowska-Jarża, Halina Podbielska

Spis treści


7.1. Wstęp	179
7.2. Parametry optyczne tkanek	182
7.3. Propagacja światła w tkankach	187
7.4. Właściwości termiczne tkanek	190
7.5. Oddziaływanie ultrafioletu na tkanki	193
7.5.1. Oddziaływanie ultrafioletu na skórę	194
7.5.2. Działanie UV na struktury oka	196
7.5.3. Światłolecznictwo	196
7.5.4. Szkodliwe działanie promieniowania słonecznego	198
7.6. Oddziaływanie promieniowania laserowego na tkanki	202
7.6.1. Efekty fotobiochemiczne	204
7.6.2. Efekty fototermiczne	205
7.6.3. Fotoablacja	208
7.6.4. Efekty fotojonizacyjne	209

7.1. Wstęp

Spektrum promieniowania elektromagnetycznego obejmuje fale od bardzo krótkich (poniżej $<10-11$ m) poprzez światło widzialne aż do fal radiowych. Im dłuższe fale, tym niższa częstotliwość, a tym samym energia (patrz tab. 1).

Głównym źródłem promieniowania elektromagnetycznego docierającego do Ziemi jest Słońce. Najwięcej, bo 49% energii słonecznej przypada na zakres widzialny i bliskiej podczerwieni. Fale o długości większej niż 800 nm stanowią 44% energii słonecznej. W średnim i bliskim ultrafiolecie (120–300 nm) emitowane jest 7% energii słonecznej, a promieniowanie rentgenowskie i w dalekim nadfiolecie nie przekracza 0,001% całkowitej energii [1, 2].

Tabela 1. Podział widma elektromagnetycznego. Długości fal podane w metrach

Fale radiowe	mikrofale	podczerwień	światło widzialne	ultrafiolet	promieniowanie X	promieniowanie gamma
						
submilimetrowe do kilometrowych	10^{-4} – 10^{-1}	$7 \cdot 10^{-7}$ – 10^{-5}	$7 \cdot 10^{-7}$ – $4 \cdot 10^{-7}$	10^{-8} – $3 \cdot 10^{-7}$	10^{-8} – 10^{-11}	$<10^{-11}$

Oddziaływania promieniowania z materią zależą od długości fali, podobnie, jak zjawiska fizyczne zachodzące w wyniku zaabsorbowania promieniowania elektromagnetycznego (patrz tab. 2).

Tabela 2. Oddziaływania odpowiedzialne za procesy absorpcji

Zakres promieniowania	Zjawisko fizyczne
Promieniowanie gamma	Oddziaływanie z jądrami atomu prowadzące do wzbudzenia jąder lub reakcji jądrowych
Promieniowanie rentgenowskie, nadfiolet	Wzbudzenie elektronów wewnętrznych powłok elektronowych
Promieniowanie widzialne, bliska podczerwień	Wzbudzenie elektronów zewnętrznych powłok (walencyjnych)
Średnia podczerwień	Wzbudzenie wyższych stanów oscylacji cząsteczek
Podczerwień daleka, fale radiowe	Wzbudzenie stanów rotacyjnych cząstek

Stosowany w fizyce podział zakresów fal elektromagnetycznych różni się nieznacznie od podziału stosowanego w naukach biologicznych, co zaprezentowano w poniższej tabeli (patrz tab. 3).

Tabela 3. Podział widma elektromagnetycznego w ujęciu fizycznych i biologicznym (na podstawie [3, 4])

Zakres promieniowania	Podział fizyczny	Podział fotobiologiczny
Ultrafiolet, nadfiolet, UV	Próżniowy 1–10–180 nm Średni 180–300 nm Bliski 300–400 nm	UV-C 100–280 nm UV-B 280–320 nm UV-A 320–380/400 nm
Widzialne, VIS	Światło 380–800	Światło 380/400–760/780
Podczerwień, IR	Bliska 760–4000 nm Średnia 4000–14000 nm Daleka 14000–100 μ m Submilimetrowe 100 μ m–1 mm	IR-A 760/780–1400 nm IR-B 1,4–3 μ m IR-C 3 μ m–1 mm

Oddziaływanie promieniowania elektromagnetycznego z materią obejmuje zjawiska, które zachodzą zarówno w składnikach ośrodka, jak i w fali elektromagnetycznej,

wymieniającej energię z ośrodkiem. Wynikiem tych oddziaływań mogą być następujące efekty: absorpcja promieniowania elektromagnetycznego, odbicie, refrakcja, polaryzacja, rozpraszanie lub wtórna emisja (luminescencja, fosforescencja czy fluorescencja). Zjawiska te zostały omówione w rozdziale 3. *Podstawy fotofizyki* i 4. *Podstawowe pojęcia fotochemii i fotobiologii*.

Oddziaływania światła z ośrodkiem nie można opisać tylko jednym z tych pojęć, ponieważ wymienione procesy pozostają we wzajemnych zależnościach. W zależności od długości fali i rodzaju obiektu, niektóre z nich mogą dominować, podczas gdy inne będą minimalne:

- absorpcja, gdy transmisja i reflektancja (odbicie) są niskie, np. dla węgla,
- transmisja, gdy transmisja jest wysoka, a reflektancja niska, np. dla szkła, tworzyw sztucznych, miki,
- rozpraszanie, gdy transmisja i reflektancja są wysokie, np. dla papieru, śniegu, kredy,
- odbicie, gdy transmisja jest niska, a reflektancja wysoka, np. dla metali.

Jeśli chodzi o promieniowanie widzialne, ośrodki biologiczne można podzielić na dwa rodzaje; takie, w których przeważają procesy rozpraszania i takie, w których przeważają procesy transmisji. W zakresie widzialnym właściwości rozpraszające mają: skóra, mięśnie, ściany naczyń krwionośnych, tkanka mózgowa, krew, limfa. Rozpraszanie światła jest natomiast niewielkie w porównaniu do procesów transmisji, w strukturach oka: rogówka, soczewka, przednia komora, ciało szkliste.

Aby określić rodzaj oddziaływania światła na obiekty czy układy biologiczne, należy przeanalizować także specyficzne cechy obiektów lub układów. Dotyczy to w szczególności tkanek ludzkich, które ze względu na niejednorodność budowy, są bardzo trudne do badania. Struktury komórkowe i subkomórkowe, niezwykle różne pod względem wielkości, kształtu, budowy, wzajemnych odległości, zarówno absorbują, jak i rozpraszają promieniowanie.

Stopień rozpraszania promieniowania i absorpcja zależą od długości fali i parametrów optycznych tkanki.

W makroskali na efektywność zjawisk najistotniejszy wpływ ma grubość poszczególnych warstw badanego ośrodka i występowanie w nim substancji absorbujących. W przypadku tkanek bierze się również pod uwagę gęstość sieci naczyń krwionośnych oraz wielkość przepływu krwi, zawartość wody i obecność barwników w strukturach tkankowych. Przykładowo najsilniej rozpraszane są fale długości zbliżonej do odległości międzycząsteczkowych w naświetlanym ośrodku, ponadto rozpraszanie następuje na niejednorodnościach ośrodka.

W mikroskali, na zdolność absorpcji fotonów w układach najistotniejszy wpływ mają aminokwasy, kwasy nukleinowe, melanina, hemoglobina, bilirubina, związki sterydowe, dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD), rodopsyna i inne fotoakceptory. Większość z nich skutecznie pochłania promieniowanie ultrafioletowe, pozostałe zaś promieniowanie widzialne (hemoglobina, melanina, rodopsyna, cytochromy), a niektóre pod-

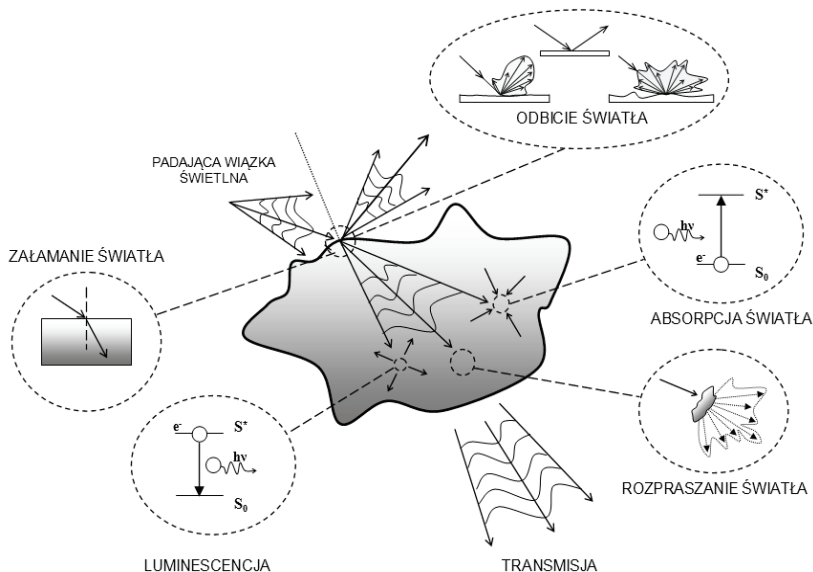
czerwone. Również organizmy roślinne i bakteryjne zawierają chromofory (barwniki fotoczułe). Szczególnie bogate w substancje absorbujące są organizmy fotosyntezujące.

Badania właściwości optycznych tkanek mają duże znaczenie z powodów aplikacyjnych, zarówno w diagnostyce, jak i w terapii. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się badania oddziaływania światła laserowego ze względu na rozwijającą się medycynę laserową i małoinwazyjną optyczną diagnostykę medyczną [5]. Wiele grup badawczych zajmuje się badaniami parametrów optycznych tkanek i analizą efektów oddziaływania promieniowania na struktury biologiczne [6, 7, 8, 9].

Badane są często spektra absorpcyjne wody, hemoglobiny i innych składników tkanek [10]. Godną polecenia jest strona Centrum Medycyny Laserowej w Oregonie, USA (*The Oregon Medical Laser Center at Providence St. Vincent Medical Center*), gdzie zademonstrowano wiele wyników badań widm absorpcyjnych elementów tkanek [11].

7.2. Parametry optyczne tkanek

Światło padające na ciało może zostać od niego odbite (całkowicie lub częściowo), część zaś, która nie uległa odbiciu, może zostać przez ciało przepuszczona (transmisja). Promieniowanie przechodzące przez ciało, może również zostać rozproszone przez elementy rozpraszające lub też pochłonięte (absorpcja), a pochłonięta energia zamieniona na inne rodzaje energii (patrz rys. 7.1).



Rys. 7.1. Zjawiska towarzyszące oddziaływaniu światła z materią
(Rys. 3.9 z rozdziału 3. *Podstawy fotofizyki*, I. Buzalewicz, H. Podbielska)

Zrozumienie podstaw fizycznych oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z materią wymaga usystematyzowania pewnych pojęć i wprowadzenia parametrów opisujących właściwości optyczne różnych ciał. Parametry te dzielą się na dwie grupy: mikro- i makroskopowe. Wielkości mikroskopowe to podstawowe (bazowe) wielkości charakteryzujące oddziaływanie światła na dany obiekt (współczynniki absorpcji, rozpraszania, fazowa funkcja rozpraszania i współczynnik załamania). Makroskopowe wielkości, które można wyliczyć na podstawie mikroskopowych, służą przede wszystkim do opisu wielkości dostrzegalnych, takich jak odbicie czy transmisja.

Tabela 4. Parametry mikroskopowe tkanek

Parametr	Opis	Przykładowe wartości w tkankach
1	2	3
Współczynnik absorpcji μ_a	<p>Opisuje prawdopodobieństwo pochłonięcia fotonu na jednostkowej drodze w badanym medium nierozpraszającym:</p> $\mu_a = -d^{-1} \ln \frac{I_{wyj}}{I_0}$ <p>Jest wielkością addytywną w przypadku małego natężenia światła: współczynnik absorpcji mieszaniny jest sumą współczynników absorpcji poszczególnych składników:</p> $\mu_a(\lambda) = \sum_n \varepsilon_n(\lambda) \cdot c_n$ <p>gdzie c_n (mol/l) stężenie molowe <i>n-tego</i> absorbera, ε_n to współczynnik molowy absorpcji (współczynnik ekstynkcji)</p>	0,01–4 cm ⁻¹
Współczynnik rozpraszania μ_s	<p>Określa prawdopodobieństwo rozproszenia fotonu na jednostkowej drodze. Można go też zdefiniować jako stratę natężenia promieniowania na jednostkowej drodze na skutek rozpraszania, czy też liczbę procesów rozpraszania N_{rozp} na drodze d w próbce:</p> $\mu_s = \frac{N_{rozp}}{d} \quad [\text{cm}^{-1}]$	Współczynnik rozpraszania określany w zakresie widmowym 600–1300 nm dla większości tkanek miękkich (mózg, skóra, płuca, wątroba) waha się w granicach 10–100 mm ⁻¹ .
Zredukowany współczynnik rozpraszania μ'_s	$\mu'_s = \mu_s (1 - g) \quad [\text{cm}^{-1}]$ <p>gdzie g oznacza bezwymiarowy współczynnik anizotropii tkanki. Jest to średni kosinus kąta rozproszenia fotonu na centrum rozpraszającym:</p> $g = \langle \cos(\theta_{rozp}) \rangle$	W większości tkanek miękkich współczynnik $g = 0,9$, co odpowiada kątowi rozpraszania około 26°. $g = -1$ w przypadku całkowitego wstecznego rozproszenia, współczynnik ten jest równy $g = 1$ dla całkowitego rozpraszania w kierunku propagacji wynosi 1. $g = 0$ w przypadku rozpraszania izotropowego

1	2	3
Funkcja fazowa rozpraszania $p(\theta)$	$p(\theta_{\text{rozp}}) = \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos(\theta_{\text{rozp}}))^{3/2}}$ <p>Charakteryzuje kątowny rozkład prawdopodobieństwa rozproszenia fotonu pod danym kątem θ_{rozp} w stosunku do początkowego kierunku propagacji</p>	W układach biologicznych, np. w większości tkanek, światło rozpraszane jest pod stosunkowo niewielkimi kątami, zawierającymi się w przedziale 5–45°
Współczynnik załamania n	<p>średni współczynnik załamania \bar{n} w tkance zależy od współczynników załamania centrów rozpraszających n_s i otaczającego środowiska n_0:</p> $\bar{n} = \text{vol}_s n_s + (1 - \text{vol}_s) n_0$ <p>gdzie vol_s jest frakcją objętości wszystkich centrów rozpraszających. W tkankach takimi centrami rozpraszającymi są np. błony i organelle komórkowe, np. mitochondria (średnica 500–1500 nm)</p>	W świetle widzialnym i NIR 1,335–1,62 Przykładowo: zębina – 1,62 rogówka – 1,376 ciecz wodnista – 1,336 tkanka tłuszczowa – 1,455 mięśnie – 1,410

Współczynnik załamania tkanki jest wielkością zależną od długości fali i występowania centrów rozpraszających w tkance.

Od powyżej przedstawionych parametrów (patrz tab. 4), zależą tłumienie w tkance, średnia droga swobodna, współczynnik anizotropii rozpraszania i albedo. Często do opisu funkcji fazowej stosuje się przybliżenie Henyeya–Greensteina [12]:

$$p(\theta_{\text{rozp}}) = \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos(\theta_{\text{rozp}}))^{3/2}}. \quad (1)$$

Użyteczną wielkością jest współczynnik tłumienia μ_t , będący sumą współczynnika absorpcji μ_a i rozpraszania μ_s :

$$\mu_t = \mu_a + \mu_s = \frac{N_{\text{abs}} + N_{\text{roz}}}{d}. \quad (2)$$

Parametr ten informuje o prawdopodobieństwie zajęcia rozpraszania i/lub absorpcji na jednostkowej drodze, jaką foton pokonuje w ośrodku. Odwrotność całkowitego współczynnika tłumienia określa średnią drogę swobodną pomiędzy aktami rozpraszania i absorpcji:

$$\delta_T = \frac{1}{\mu_T} \quad [\text{cm}]. \quad (3)$$

W tkankach miękkich foton zanim zostanie rozproszony lub zaabsorbowany przebywa około 10–100 μm .

W układach biologicznych np. w większości tkanek, światło rozpraszane jest pod stosunkowo niewielkimi kątami, zawierającymi się w przedziale 5–45°, zatem promieniowanie jest rozpraszane do przodu, ze stosunkowo niewielkimi odchyleniami od swego pierwotnego kierunku. Dopiero po przebyciu drogi $\frac{1}{\mu_s(1-g)}$ kierunek propagacji staje się zupełnie inny od pierwotnego – staje się losowy. Dla $g = 0,9$, foton musi zostać rozproszony 10 razy zanim osiągnie stan odpowiadający rozpraszaniu izotropowemu.

Inną wielkością charakteryzującą parametry optyczne obiektu jest albedo, które jest miarą zdolności rozpraszających danej substancji:

$$a = \frac{\mu_s}{\mu_t} . \quad (4)$$

W tzw. oknie terapeutycznym dla tkanek miękkich wartość albedo wynosi około 0,99–0,999. O dominującej absorpcji mówimy wtedy, gdy $a = 0$. Jeżeli $a = 1$ to mamy do czynienia z dominującym rozpraszaniem, natomiast dla $a = 1/2$ współczynniki rozpraszania i absorpcji są sobie równe.

Współczynniki anizotropii i rozpraszania zostały razem ujęte w formie zależności zwanej współczynnikiem transportu rozproszenia lub efektywnym współczynnikiem rozproszenia:

$$\mu'_s = \mu_s(1-g) . \quad (5)$$

Efektywna droga swobodna wynosi:

$$\bar{x} = \frac{1}{\mu_a + \mu'_s} \quad (6)$$

Efektywny współczynnik tłumienia opisany jest poniższą zależnością:

$$\mu_{eff} = \sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu'_s)} . \quad (7)$$

Odwrotność efektywnego współczynnika tłumienia określa się jako głębokość wnikania lub inaczej głębokość penetracji:

$$\delta = \frac{1}{\mu_{eff}} . \quad (8)$$

Charakteryzuje ona penetrację światła w danej substancji lub tkance. Promieniowanie w zakresie 600–1300 nm wnika głęboko w tkankę wskutek wysokiego albedo i dużej anizotropii.

Jeżeli wymiary cząstki rozpraszającej są wiele razy mniejsze niż długość fali padającej, to mamy do czynienia z rozpraszaniem Rayleigha. Jeśli natomiast cząstka jest

większa niż $1/10$ długości fali, mamy do czynienia z rozpraszaniem Mie. Rozproszenie Mie dla bardzo małych struktur rozpraszających przechodzi w rozproszenie Rayleigha, a dla bardzo dużych struktur rozpraszających w prawo odbicia, załamania i interferencji.

Biologiczne struktury rozpraszające to m.in. błony, włókna kolagenu, jądra komórkowe. Światło jest najsilniej rozpraszane przez te obiekty, których rozmiar zbliżony jest do długości fali promieniowania rozproszonego (patrz rys. 7.2).



Rys. 7.2. Rozpraszanie Rayleigha i Mie na ultrastrukturach komórkowych. Po prawej podano skalę wielkości poszczególnych struktur (na podstawie [13])

Jak już było wspomniane, oddziaływanie światła zależy też współczynnika załamania tkanki, zarówno na poziomie komórkowym, jak i strukturalnym. Jednym z takich przykładów są mitochondria. Mitochondria to wewnątrzkomórkowe organelle o długości około $1 \mu\text{m}$, które są złożone z wielu połańdowanych wewnętrznych błon lipidowych nazywanych grzebieniami. Podstawowa lipidowa dwuwarstwa ma szerokość około 9 nm . Różnice współczynnika załamania pomiędzy obszarami lipidu i wodnego otoczenia medium wynoszą ok. $0,02\text{--}0,03$, co powoduje silne rozpraszanie promieniowania [14].

Innym przykładem może być periodyczna struktura, którą charakteryzują się włókna kolagenowe. Włókna kolagenu są ułożone równolegle do siebie w odległości około 70 nm , powodując fluktuacje współczynnika załamania na poziomie ultrastruktury, co z kolei przyczynia się do rozpraszania promieniowania (głównie Rayleigha), obserwowanego dla zakresu widzialnego oraz ultrafioletu. Zaobserwowano również zjawisko zmiany współczynnika załamania w czasie podziałów komórek [15]. Przykładowe wartości współczynnika załamania n wybranych struktur biologicznych przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5. Przykładowe wartości współczynnika załamania n wybranych elementów komórki (na podstawie [16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24])

Element komórki	n
Cytoplazma komórki wątroby szczura	1,30
Cytoplazma komórki jajowej chomika	1,37
Mitochondria komórek wątroby szczura	1,40–1,42
Thuszcz	1,48
Białko	1,50
Melanina	1,7
Cytoplazma	1,358–1,374
Suszone białko	1,58

Jeżeli wymiary cząstki rozpraszającej są wiele razy mniejsze niż długość fali padającej, to mamy do czynienia z rozpraszaniem Rayleigha.

Jeśli natomiast cząstka jest większa niż $1/10$ długości fali, mamy do czynienia z rozpraszaniem Mie.

Rozproszenie Mie dla bardzo małych struktur rozpraszających przechodzi w rozproszenie Rayleigha, a dla bardzo dużych struktur rozpraszających w prawo odbicia, załamania i interferencji.

7.3. Propagacja światła w tkankach

Opis modeli propagacji fotonów w ośrodkach optycznie mętnych jest dość skomplikowany. Ze względu na zastosowania medyczne promieniowania elektromagnetycznego, próbuje się stosować różne przybliżenia. Jednym z nich jest tzw. równanie transportu radiacyjnego, które zakłada, że fotony zachowują się jak neutralne cząstki [25] (patrz rozdział 2 *Natura światła* na temat dualizmu korpuskularno-falowego). Dokładne rozwiązanie tego równania możliwe jest tylko w prostych szczególnych przypadkach. W literaturze można znaleźć wyniki numeryczne dla przypadków anizotropowego rozpraszania w cienkich warstwach materiału [26]. Jeżeli założymy, że rozpraszanie jest izotropowe, to równanie transportu przechodzi w tzw. równanie dyfuzyjne. Podejście takie może mieć zastosowanie, jeżeli założymy, że prawdopodobieństwo rozproszenia fotonu jest znacznie większe niż prawdopodobieństwo aktu absorpcji. Założenie takie jest spełnione, jeżeli w danej tkance współczynnik rozpraszania jest ok. 100 wyższy niż współczynnik absorpcji, bądź też ruch fotonów jest losowy, czyli odległość od emitera do detektora jest znacznie większa niż średnia droga swobodna fotonów w badanym ośrodku.

$$\frac{dI(r, s, t)}{ds} = -s \nabla L(r, s, t) - (\mu_a + \mu_s) I(r, s, t) + \frac{\mu_a + \mu_s}{4\pi} \int_{4\pi} p(s, s') I(r, s', t) d\omega' + Q. \quad (9)$$

Równanie propagacji (9) mówi, że na zmianę natężenia promieniowania I [$\text{W}/\text{m}^2 \cdot \text{sr}$] w punkcie r na drodze s wpływa: zmiana natężenia z powodu gradientu strumienia energii (pierwszy człon), zmiana z powodu tłumienia (drugi człon) i z powodu rozpraszania, gdzie $p(s, s')$ jest prawdopodobieństwem, że rozproszenie nastąpi w kierunku s' , a ω jest kątem bryłowym pomiędzy s i s' . Ostatni człon charakteryzuje źródło promieniowania (radiacyjna funkcja źródła promieniowania). Rozwiązanie tego równania jest dość trudne, szczególnie ze względu na zjawiska na granicy ośrodków, wpływ geometrii tkanki i źródła światła [27].

Głównym celem analizy rozchodzenia się światła w tkankach jest wyznaczenie zmian natężenia promieniowania wskutek propagacji fotonów w tkance. Najprostszymi pomiarami są pomiary np. zmian natężenia promieniowania w cienkich próbkach tkanki. Gdy medium jest grube obliczenia znacznie się komplikują. Najczęściej stosowane przybliżenia do wyznaczenia rozchodzenia się światła w tkankach to aproksymacja dyfuzyjna, metoda Monte Carlo, metoda Kubelki–Munka (patrz tab. 6) i statystyczna metoda błędzenia losowego (ang. *Random Walk Theory*) [28]. Ta ostatnia zakłada, że tkanka to zbiór np. sześciątów, a fotony mogą się poruszać się wzdłuż boków sześciątów.

Opisane metody są wykorzystywane w badaniach *in vitro* i *in vivo*, obejmujących tomografię optyczną, spektroskopię w bliskiej podczerwieni, mikroskopowe obrazowanie biomedyczne, a także radioterapię. W Grupie Optyki Biomedycznej na Uniwersytecie w Londynie *University College London* można przeczytać prezentowane *on-line* prace doktorskie w tej tematyce [29]. W Polsce takie badania prowadzą prof. Liebert i prof. Maniewski w IBIB PAN w Warszawie, koncentrując się na pomiarach utlenowania mózgu i laserowo-dopplerowskich badaniach układu krążenia [30, 31].

Śledzenie rozchodzenia się światła w tkankach może być wykorzystane w tzw. biopsji optycznej, czyli w badaniu tkanek *in situ*, bez pobierania wycinków [32, 27].

Tabela 6. Najczęściej stosowane podejścia do opisu propagacji światła w tkankach

Aproksymacja dyfuzyjna
Natężenie promieniowania w ośrodku można wyrazić jako sumę natężenia składowej nierozproszonej i rozproszonej (dyfuzyjnej): $I(r, s, t) = I_c(r, s, t) + I_d(r, s, t)$
Dla promieniowania nierozproszonego otrzymujemy równanie:
$\frac{dI_c(r, s, t)}{ds} = -s \nabla L(r, s, t) - (\mu_a + \mu_s) I_c(r, s, t),$
a w przypadku części rozproszonej:
$\frac{dI_d(r, s, t)}{ds} = -(\mu_a + \mu_s) I_d(r, s, t) + \frac{\mu_a + \mu_s}{4\pi} \int_{4\pi} p(s, s') I_d(r, s', t) d\omega' + Q(r, s, t)$

Przy założeniu, że płaska fala pada na warstwę ośrodka, równanie dla promieniowania nierozproszonego przechodzi w równanie opisujące prawo Lamberta–Beera.

Zależne od czasu równanie dyfuzji ma następującą postać:

$\frac{1}{c} \frac{\partial \Phi(r,t)}{\partial t} = D \nabla^2 \Phi(r,t) - \mu_a \Phi(r,t) + Q(r,t)$, gdzie Φ jest gęstością fotonów, D współczynnikiem

dyfuzji, zależnym od współczynnika anizotropii rozpraszania g :

$$D = \frac{1}{3(\mu_a + (1-g)\mu_s)}$$

Metoda Monte Carlo

Metoda wykorzystuje symulacje komputerowe do kalkulacji propagacji fotonów w ośrodkach rozpraszających. Śledzi się trajektorie poruszających się w medium fotonów krok-po-kroku, przypisując każdemu krokowi długość, kierunek i wagę. Przykładowe programy można znaleźć np. na stronie Uniwersytetu w Oregon [33]. W metodzie tej realizowane są następujące kroki:

1. Zakładamy, że fotony (nazwiemy je paczką fotonów) wchodzi do ośrodka w miejscu (x, y, z) pod kątem α z wagą $W = 1$.
2. Waga zostaje zredukowana na granicy ośrodków o ΔW do wagi W_2 .
3. Zostaje wyliczony nowy kierunek poruszania się fotonów (potrzebna jest znajomość kąta α i współczynnika załamania na granicy ośrodków).
4. Długość drogi fotonów l wyliczona zostaje ze wzoru $l = -\frac{\ln(\varepsilon)}{\mu_t}$, gdzie ε jest losowo generowaną liczbą z przedziału $[0, 1]$, a μ_t oznacza całkowity współczynnik tłumienia.
5. Z powodu absorpcji następuje dalszy ubytek wagi fotonu o $\Delta W = W_2 (\mu_a/\mu_t)$.
6. Losowana jest liczba 0 lub 1, aby określić czy nastąpiło rozproszenie (1) lub nie (0). Jeżeli wylosowano 0, procedura jest powtarzana od kroku 3.
7. Jeżeli nastąpiło rozproszenie, wytycza się nowy kierunek trajektorii fotonu. Opisuje się to zjawisko podając kąt azymutalny ϕ $[0, 2\pi]$, przy czym $\phi = 2\pi \varepsilon$. Natomiast kąt ugięcia α z przedziału $[0, \pi]$ oblicza się na podstawie fazowej funkcji rozpraszania. W tkance biologicznej można przybliżyć funkcję fazową rozpraszania funkcją Heney–Greensteina, co pozwala na wyliczenie kierunku rozchodzenia się promieniowania.

$$\cos \alpha = \begin{cases} \frac{1}{2g} \left(1 + g^2 - \left(\frac{1-g^2}{1-g+2g\varepsilon} \right)^2 \right), & g \neq 0 \\ 1 - 2\varepsilon, & g = 0 \end{cases}$$

Kroki 3–6 są powtarzane dla wymaganej liczby fotonów.

Aproksymacja dwustrumieniowa – model Kubelki–Munka

Stosunkowo prostą metodę do obliczania natężenia promieniowania w silnie rozpraszających ośrodkach zaproponowali w 1913 roku Kubelka i Munk [34]. Zakłada się, że padające promieniowanie jest dyfuzyjne, a ośrodek silnie rozpraszający. Promieniowanie rozchodzące się w ośrodku jest przedstawiane w postaci dwóch dyfuzyjnych strumieni I i J rozprzestrzeniających się we wzajemnie przeciwnych kierunkach. W warstwie o grubości d zachodzi rozpraszanie i absorpcja padającego promieniowania monochromatycznego I_0 . Strumień promieniowania zgodny z kierunkiem I_0 oznaczono jako I , a strumień rozprzestrzeniający się w kierunku przeciwnym jako J . Zgodnie z teorią Kubelki-Munka zmiana natężenia I i J w cienkiej warstwie o grubości dx wynosi:

$$dI/dx = -(A + S)I + SJ$$

$dJ/dx = -(A + S)J + SI$, gdzie A i S są współczynnikami odpowiedzialnymi za absorpcję i rozpraszanie.

Widać, że w warstwie dx strumień I zmniejsza się wskutek absorpcji oraz rozpraszania w kierunku strumienia I , a wzrasta wskutek rozpraszania strumienia J . Podobnie interpretuje się drugie równanie. W metodzie Kubelki–Munka zaproponowano następujące zależności między współczynnikiem absorpcji A i S , a współczynnikami absorpcji i rozpraszania:

$$A = 2\mu_a$$

$$S = \mu_s$$

Parametry A i S można wyznaczyć, znając współczynniki transmisji T i odbicia R :

$$S/(A + S) = 2r/(1 + R^2 - T^2)$$

7.4. Właściwości termiczne tkanek

Zastosowanie światła w medycynie dotyczy zarówno diagnostyki, jak i terapii. Wyznaczanie właściwości optycznych tkanek i badanie propagacji światła w tkankach jest niezmiernie ważne z punktu widzenia diagnostyki. Terapeutyczne zastosowania światła, szczególnie laserowego, wiążą się z przemianą energii fali elektromagnetycznej na energię cieplną. Efekty termiczne w postaci cięcia, koagulacji i destrukcji cieplnej tkanek wywoływane są przez światło zaabsorbowane. Właściwości termiczne tkanek są niezmiernie istotne nie tylko z punktu widzenia chirurgii laserowej, ale także innych zabiegów, wymagających zmiany temperatury w tkankach, np. operacji za pomocą częstotliwości radiowych, zabiegów cieplnych czy wymagających obniżenia temperatury ciała, np. w hipotermii.

Właściwości termiczne tkanki zależą od następujących czynników:

- przewodność cieplna,
- pojemność cieplna,
- odprowadzanie się ciepła przez układ naczyń krwionośnych.

Na rozchodzenie się ciepła w tkankach po wpływie promieniowania lasera wpływ mają:

- właściwości termiczne tkanki,
- geometria tkanki,
- właściwości promieniowania laserowego.

Jeżeli przez q oznaczymy energię termiczną dostarczoną do pewnej małej objętości tkanki wskutek działania promieniowania laserowego, przez q_p ciepło zgromadzone w tkance, a przez q_s straty ciepła, to zgodnie z zasadą zachowania energii, mamy

$$q = q_p + q_s + W, \quad (10)$$

gdzie W oznacza pracę (praca, ciepło metaboliczne) wykonaną przez tkankę.

Przepływ ciepła powodowany jest głównie przez dwa mechanizmy:

- *przewodzenie – kondukcja*, wyrównanie energii kinetycznej cząstek – jest to przechodzenie energii cieplnej z ciała o wyższej temperaturze do ciała o niższej temperaturze,
- *przenoszenie ciepła – konwekcja*, charakterystyczna dla gazów i cieczy, nazywane konwekcją, polega na tym, że chłodniejsze części cieczy czy gazu jako cięższe przesuują się ku dołowi, a cieplejsze ku górze. W tkance głównie z powodu krążenia krwi.

Przewodzona energia cieplna jest proporcjonalna do różnicy temperatur, czasu przewodzenia t i powierzchni A , przez którą następuje kondukcja, a odwrotnie proporcjonalna do różnicy drogi ΔL :

$$Q = \frac{-kA(T_2 - T_1)\Delta t}{\Delta L}, \quad (11)$$

k oznacza współczynnik przewodności cieplnej (przewodnictwa cieplnego) [W/m·K]. Jeżeli przyjmijemy, że $S(r, z, t)$ oznacza lokalne gromadzenie się ciepła w jednostce objętości tkanki w określonym czasie t , a natężenie światła $I(r, z, t)$ po przejściu w kierunku z przez warstwę o grubości Δz wynosi $I(r, z + \Delta z, t)$, to możemy zapisać:

$$S(r, z, t) = \frac{I(r, z, t) - I(r, z + \Delta z, t)}{\Delta z}. \quad (12)$$

Jeżeli warstwa jest nieskończenie cienka ($\Delta z \rightarrow 0$) to

$$S(r, z, t) = \frac{\partial I(r, z, t)}{\partial z}. \quad (13)$$

Zatem gromadzenie się ciepła w tkankach można wyrazić wzorem:

$$S(r, z, t) = \frac{\partial I(r, z, t)}{\partial z}. \quad (14)$$

Z tego wynika, że akumulacja ciepła w tkance zależy od natężenia światła i parametru optycznego tkanki, jakim jest współczynnik absorpcji μ_a :

$$S(r, z, t) = \mu_a \cdot I(r, z, t). \quad (15)$$

Jeżeli założymy, że nie następuje przemiana fazowa (czyli nie ma odparowania lub topienia się tkanki) lub zmiany struktury tkanki (w wyniku koagulacji lub zwęglenia), to zmiana ciepła wewnątrz tkanki o wielkość dQ powoduje liniową zmianę temperatury o dT , co można wyrazić następująco:

$$dQ = m \cdot c \cdot dT, \quad (16)$$

gdzie m to masa tkanki, a c ciepło właściwe [kJ·kg⁻¹·K⁻¹].

Dla większości tkanek dobrym przybliżeniem ciepła właściwego jest zależność podana przez Takatę [35] i współczynników:

$$c = \left(1,55 + 2,8 \frac{\rho_w}{\rho} \right) \left[\frac{\text{kJ}}{\text{kg} \cdot \text{K}} \right], \quad (17)$$

gdzie ρ oznacza masę właściwą badanej tkanki [kg/m^3], a ρ_w masę właściwą wody. Stąd możemy obliczyć ciepło właściwe wody, które w temperaturze 37°C wynosi $4,35 \text{ kJ}/\text{kg} \cdot \text{K}$.

W układach biologicznych straty ciepła wynikają z przewodnictwa, unoszenia oraz wypromieniowania. Jednym z przykładów unoszenia ciepła jest transport spowodowany przepływem krwi.

Promieniowanie termiczne jest opisane prawem Stefana–Boltzmann, które mówi, że całkowita energia W emitowana w jednostce czasu, przez element powierzchni ciała doskonale czarnego jest proporcjonalna do czwartej potęgi temperatury T ciała:

$$W = \sigma \cdot T^4, \quad (18)$$

gdzie σ – stała Boltzmann ($5,67 \cdot 10^{-8} \text{ J}/(\text{s} \cdot \text{m}^2 \cdot \text{K}^4)$).

Głównym mechanizmem, który odpowiada za transport ciepła do naświetlonych warstw tkanki jest oczywiście przewodzenie, czyli przenoszenie energii, wywołane różnicą temperatur pomiędzy sąsiadującymi strukturami. Strumień ciepła j_Q jest proporcjonalny do gradientu temperatury ∇T i jest określony równaniem dyfuzyjnym:

$$j_Q = -k \cdot \nabla T, \quad (19)$$

współczynnik k przewodnictwa cieplnego większości tkanek może być obliczony z poniższego wzoru [35]:

$$\left(0,06 + 0,57 \frac{\rho_w}{\rho} \right) \left[\frac{\text{W}}{\text{m} \cdot \text{K}} \right]. \quad (20)$$

Od współczynnika k i ciepła właściwego c zależy stała termiczna dyfuzji:

$$\kappa = \frac{k}{\rho \cdot c} \left[\frac{\text{m}^2}{\text{s}} \right]. \quad (21)$$

Stała ta determinuje głębokość penetracji termicznej z_{term} , która jest wielkością zależną od czasu t i informuje nas, na jakiej odległości temperatura zmniejsza się do wartości $1/e$ wartości maksymalnej.

$$z_{term}(t) = \sqrt{4 \cdot \kappa \cdot t}. \quad (22)$$

Dla termicznego zniszczenia tkanki istotne jest dobranie czasu trwania impulsu laserowego tak, aby zminimalizować zasięg strefy uszkodzenia zdrowej tkanki (patrz podrozdział 5.4.2). Parametrem, który ma wpływ na czas naświetlania, jest tzw. czas relaksacji termicznej τ_{term} . Jest on wyznaczony przez porównanie stałej termicznej dyfuzji κ i głębokości penetracji optycznej L :

$$L = \sqrt{4 \cdot \kappa \cdot \tau_{term}} . \quad (23)$$

W sensie fizycznym parametr ten można interpretować jako podatność termiczną tkanki. Można więc przyjąć, że dla $\tau < \tau_{term}$ ciepło nie dyfunduje na odległość podaną przez wartość optycznej penetracji, dlatego zniszczenie termiczne naświetlanej tkanki jest minimalne. Natomiast dla $\tau > \tau_{term}$ ciepło może dyfundować na wielokrotność odległości penetracji optycznej, tym samym zniszczenie obszaru otaczającego rejon naświetlania jest duże. Parametr ten zależy także od długości fali promieniowania.

7.5. Oddziaływanie ultrafioletu na tkanki

Do powierzchni Ziemi dociera tylko nieznaczna ilość ultrafioletu, dużą jego część pochłania atmosfera, przede wszystkim warstwa ozonowa [36]. W praktyce w pełni eliminowane jest w ten sposób promieniowanie z zakresu UVC, znaczna część UVB, najmniej UVA. Jednakże promieniowanie UVB oddziałuje na nas 10–100 razy silniej niż UVA.

Największe natężenie ultrafioletu występuje między 30° szerokości geograficznej południowej a 30° szerokości geograficznej północnej, latem, w godzinach południowych, a także wysoko w górach. Na każde 1000 m przybywa 15% promieniowania UV.

Fotony promieniowania ultrafioletowego obdarzone są dużą energią, tym większą, im krótsza jest długość fali elektromagnetycznej. Pochłaniane przez substancję mogą wpływać na jej właściwości fizyczne i chemiczne, wywoływać m.in. reakcje fotochemiczne: utlenianie, redukcję, rozkład i polimeryzację. Z tego względu ultrafiolet odznacza się dużą aktywnością biologiczną. Szczególnie silne działanie mutagenne i bakteriobójcze ma promieniowanie z zakresu C, nieco słabsze – odpowiednio UVB i UVA. Promieniowanie to absorbowane jest przez kwasy nukleinowe, zaburza przemianę materii w komórce i może spowodować jej zniszczenie. Promienie UV ulegają również odbiciu np. od śniegu i lodu, powierzchni wody, piasku, betonu, chmur kłębiastych, co zmienia warunki ekspozycji [37].

Nie tylko atmosfera pochłania promienie UVB. Nie przechodzą one również przez tradycyjne szkło okienne. Ten rodzaj materiału nie przeszkadza jednak tak bardzo wędrowce UVA [38]. Ponieważ zwykle chodzimy ubrani, prowadzi się również badania dotyczące blokowania promieniowania UV przez tkaniny [39]. Poza noszeniem odpowiedniej odzieży, nie mniej ważną rolę odgrywa stosowanie socze-

wiek kontaktowych lub okularów posiadających szkła z odpowiednim filtrem, aby chronić wzrok [40].

7.5.1. Oddziaływanie ultrafioletu na skórę

W przypadku ludzkiej skóry większość padającego na nią promieniowania UVB nie pokonuje bariery naskórka i zostaje odbita lub pochłonięta przez jego komórki. Około 50% UVA przenika głębiej, co do niedawna nie wywoływało niepokoju, gdyż za szkodliwe uznawano jedynie nadmierne promieniowanie UVB. Tylko ono bowiem, a nie UVA, wywołuje rumień po opalaniu i przyczynia się do poważnych poparzeń skóry. Wcześniej rano i po południu, gdy słońce jest nisko nad horyzontem i jego promienie muszą przebyć dłuższą drogę przez atmosferę, działanie UVB jest słabsze, w lecie natężenie promieniowania UVA wzrasta dwukrotnie, podczas gdy UVB dziesięciokrotnie.

Ilość działającego na nas promieniowania ultrafioletowego zależy również od czystości powietrza. Każdy jednoprocenowy ubytek warstwy ozonowej pociąga za sobą dwuprocentowy wzrost natężenia samego tylko UVB. Chmury mogą pochłonąć 10–80% ultrafioletu (średnio 40%), zatrzymują jednak przede wszystkim promienie podczerwone [41]. Spacerując bez osłony przed słońcem w letni, pochmurny dzień, organizm jest narażony nieraz na większą dawkę UV, niż kiedy chronieni kremem z filtrem opalamy się w pełnym blasku słońca. Z tego powodu nie należy identyfikować maksymalnej wartości indeksu UV z godziną 12, czyli południem. Aktualny indeks UV dla terenu Polski (dane są aktualizowane co 15 minut w godz. 7–19) jest podawany na stronach internetowych Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej [38].

Indeks UV jest miarą natężenia promieniowania ultrafioletowego Słońca i odnosi się do jego oddziaływania na skórę człowieka (rumień wywołany przez UV). Intuicyjnie jest to maksymalna, przewidywana na dany dzień półgodzinna dawka promieniowania UV, docierającego do powierzchni ziemi w godzinach około południowych, z uwzględnieniem warstwy ozonu i zachmurzenia. Według definicji Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej indeks UV jest to efektywny strumień promieniowania UV otrzymany w wyniku całkowania strumienia spektralnego przez spektralną funkcję czułości do 400 nm włącznie, znormalizowany do wartości 1,0 dla 297 nm [42, 43, 44].

Indeks UV jest wyrażony numerycznie jako wynik pomnożenia uśrednionego w czasie efektywnego strumienia (W/m^2) przez 40. Na przykład efektywny strumień $0,2 W/m^2$ odpowiada wartości indeksu UV 8,0. Jeżeli są wyliczane lub prognozowane dzienne maksima indeksu UV, to do obliczeń powinny być zastosowane średnie 30-minutowe wartości efektywnego strumienia promieniowania [42].

Gdy indeks UV przekracza wartość 9, natężenie promieniowania UVB jest skrajnie silne i oparzenia powstają w czasie krótszym niż 15 minut. Zwykle czasy ekspozycji (opalania) dotyczą nieopalonych osób. Czas ekspozycji można wydłużać w zależ-

ności od typu skóry mając na uwadze, że jeżeli nawet skóra nie ulegnie oparzeniu, jest narażona na zniszczenie.

Ilość docierającego do powierzchni ziemi promieniowania ultrafioletowego zależy od:

- wysokości Słońca nad horyzontem, tj. szerokości geograficznej, pory roku i pory dnia, najsilniejsze promieniowanie w strefie zwrotnikowej, najłabsze w obszarach polarnych. W Polsce najsilniejsze promieniowanie występuje latem w godzinach południowych,
- wysokości nad poziomem morza, największe wartości indeksu UV występują w górach,
- rozpraszania w atmosferze przez aerozole i parę wodną,
- zawartości ozonu w atmosferze; szacunkowo 1% zmiana całkowitego ozonu powoduje zmianę 1,1–1,3% promieniowania UV,
- pochłaniania i odbicia promieniowania przez powierzchnię Ziemi. Wpływ albedo zaznacza się najsilniej wysoko w górach (odbicie od skał i śniegu) i nad morzem (odbicie od piasku i wody); zależy od wielkości i rodzaju zachmurzenia, ponieważ promieniowanie UV jest silnie pochłaniane przez chmury [45].

Czas opalania definiuje się jako maksymalny czas przebywania na słońcu bez żadnej ochrony, po którym nie wystąpi rumień; nazywany jest również progowym czasem wystąpienia rumienia. Aby rozsądnie móc korzystać z informacji o indeksie UV, należy poznać swój typ skóry (fototyp skóry według Thomasa Fitzpatricka [46]):

- typ I to skóra bardzo jasna, często pokryta piegami, włosy jasny blond lub rude, oczy niebieskie. Zawsze reakcja rumieniowa nawet po krótkiej ekspozycji. Opalenizna nie występuje (brak pigmentacji). Należy bezwzględnie unikać kąpiei słonecznych,
- typ II to skóra jasna, włosy blond do brązowych, oczy niebieskie, zielone lub szare. Znaczna skłonność do oparzeń słonecznych. Słaba opalenizna. Należy umiarkowanie korzystać z kąpiei słonecznych,
- typ III to skóra jasnobrązowa, włosy ciemnoblonde lub brązowe. Umiarkowana skłonność do oparzeń słonecznych. Wyrazista opalenizna. Można korzystać z kąpiei słonecznych,
- typ IV to skóra brązowa lub oliwkowa, włosy ciemnobrązowe. Brak skłonności do oparzeń słonecznych. Mocna opalenizna. Można korzystać z kąpiei słonecznych.

Niektórzy autorzy rozszerzają ten podział o dwa dodatkowe typy skóry charakterystyczne dla pewnych grup etnicznych. Typ V mają rasy mongoidalne, Indianie, Arabowie, natomiast typ VI występuje u osób czarnoskórych [47]. Bez względu na rodzaj skóry nie należy dopuszczać do oparzeń (rumienia).

Biorąc pod uwagę częstą w Polsce w okresie letnim wartość indeksu UV równą 8, czas opalania dla poszczególnych typów skóry określa się odpowiednio: I – poniżej 20 min, II – powyżej 20 min, III – 30 min, IV – ok. 40 min [42].

7.5.2. Działanie UV na struktury oka

Ozon zawarty w stratosferze ziemskiej jest odpowiedzialny za pochłanianie promieniowania UVB oraz większości UVC. Jednak w obszarach, gdzie warstwa ozonowa jest cieńsza lub występuje dziura ozonowa, natężenie najbardziej szkodliwego zakresu promieniowania UVC może być duże [48].

Promieniowanie z zakresu UVB jest absorbowane przez spojówkę i rogówkę, lecz do 10% promieniowania może dotrzeć do przedniej powierzchni soczewki [1]. Absorpcja promieniowania UVB przez tkanki oka może wywołać zapalenie spojówki i rogówki oraz przyczynić się do wystąpienia tłuszczycy, skrzydlika, zaćmy korowej czy podtorebkowej [49].

Promieniowanie z zakresu UVA jest w większości pochłaniane przez soczewkę, przyczyniając się do powstawania zaćmy [50]. Niewielka część promieniowania UVA granicząca ze światłem widzialnym dociera do siatkówki. Promieniowanie UVA umieszczono na liście czynników ryzyka wystąpienia torbielowatego obrzęku plamki czy zwyrodnienia plamki związanego z wiekiem [51, 52].

Prawidłowa soczewka oka jest przezroczysta, a jej zmętnienie nazywamy zaćmą. W miarę, jak rozwija się zaćma, blokując i zniekształcając wpadające do oka światło, następuje stopniowe zamazywanie się widzianego obrazu, tak, jakby chory patrzył przez mgłę. Zaćma rozwija się z powodu zmian zachodzących w białkach budujących soczewkę. Jest to wynik w przeważającej części naturalnego procesu starzenia się, tzw. zaćma starcza. Inne przyczyny powstawania i rozwoju zaćmy to światło słoneczne, a przede wszystkim promienie ultrafioletowe (UVB), promieniowanie rentgenowskie, zanieczyszczenie środowiska, dym papierosowy, spożywanie dużych ilości alkoholu, braki witaminowe, błędy żywieniowe, środki konserwujące.

7.5.3. Światłolecznictwo

Światłolecznictwo (inaczej, światłoterapia, fototerapia) stanowi dział fizykoterapii. We współczesnej fototerapii stosuje się źródła światła:

- naturalne – słońce (tzw. helioterapia),
- sztuczne – lampy, lasery (tzw. aktynoterapia).

Już w starożytności zdawano sobie sprawę, że promieniowanie słoneczne oddziałuje na organizm człowieka. Starożytni Egipcjanie uważali boga Słońca Ra za najważniejszego w panteonie swoich bogów. Właściwości lecznicze promieniowania słonecznego nie pozostały niezauważone przez starożytnych Greków i to im zawdzięczamy określenie helioterapii. 1903 roku uhonorowano nagrodą Nobla prace duńskiego profesora Nielsa Finsena poświęcone helioterapii jako metodzie leczenia gruźlicy toczniowej skóry [53]. W latach 20. i 30. XX wieku zwrócono uwagę na rolę promieniowania ultrafioletowego w metabolizmie witaminy D [54].

Współczesna fototerapia obejmuje m.in. zabiegi polegające na uzupełnianiu niezbędnej dziennej dawki światła słonecznego, które jest najsilniejszym zewnętrznym regulatorem wewnętrznych rytmów biologicznych człowieka, takich jak czuwanie-sen, dobowe wahania temperatury ciała, rytm dobowy wydzielania niektórych hormonów. Lampy do fototerapii polecane są w przypadkach sezonowych spadków nastroju tzw. depresji sezonowej (ang. *seasonal affective disorder*, SAD), spowodowanej niedostateczną ekspozycją na światło słoneczne. Badania potwierdzają także ich skuteczność w łagodzeniu objawów takich dolegliwości, jak m.in. bezsenność, bulimia, zespół napięcia przedmiesiączkowego, menopauza, zespół nadpobudliwości psychoruchowej (ang. *attention deficit hyperactivity disorder*, ADHD). Optymalny czas dziennego naświetlania wynosi ok. 30 minut, w odległości 50 cm od lampy lub ok. 60 minut przy odległości 75 cm.

Pożyteczny wpływ fototerapii na organizm ludzki dotyczy następujących obszarów:

- skóra – lepsze ukrwienie, bardziej elastyczna i mniej podatna na zakażenia,
- przemiana materii – wzmożenie rozpadu białek i przemiany purynowej, zmniejszenie zwiększonego stężenia glukozy w surowicy krwi, zmniejszenie stężenia kwasu mlekowego w surowicy krwi, wpływ na przemianę cholesterolu,
- przemiana mineralna – usprawnienie mineralizacji kości,
- gruczoły wydzielania wewnętrznego – pobudzenie przysadki, gruczołu tarczowego, nadnerczy, jajników i jąder,
- układ oddechowy – zwiększenie wykorzystania tlenu,
- układ krążenia – obniżenie podwyższonego ciśnienia krwi, wpływ na histaminę, powodującą rozszerzenie naczyń krwionośnych,
- krew i układ krwiotwórczy – wzrost zmniejszonej liczby krwinek czerwonych i zwiększenie liczby krwinek białych.



a



b

Rys. 7.3. Lampy stosowane w zwalczaniu depresji sezonowych:
a) model do użytku domowego, b) wersja np. do biur lub klinik [55]

W Skandynawii od wielu lat w prawie wszystkich ośrodkach zdrowia, portach lotniczych i wielu biurach znajdują się pokoje do fototerapii [56]. Na polskim rynku są dostępne m.in. antydepresyjne lampy firmy Fotovita (patrz rys. 7.3). Zgodnie z deklaracją producenta powstały one we współpracy Philips Polska z polskimi naukowcami i mają atesty medyczne (wpis do Rejestru Wyrobów Medycznych) [57].

Innym rodzajem fototerapii jest wykorzystanie światła ultrafioletowego do leczenia łuszczycy, choroby spowodowanej przez niekontrolowany podział komórek naskórka. Chorym podaje się światłouczulacz tzw. psoralen – substancję wchłanianą z przewodu pokarmowego i wbudowującą się w komórki skóry. Psoralen jest składnikiem wielu naturalnie występujących roślin, np. korzenia lubczyku ogrodowego czy też liści ruty. Substancja ta jest zaliczana do fotouczulaczy, czyli substancji zwiększających wrażliwość na promieniowanie (w tym przypadku UVA). Po wprowadzeniu do komórki egzogenego barwnika fotoczułego następuje uaktywnienie za pomocą ultrafioletu, co wywołuje reakcję fotochemiczną [58]. Terapia ta nosi nazwę PUVA (od psoralen i UVA).



Rys. 7.4. Kabina do terapii PUVA i UVB (po lewej). Grzebień UVB do terapii głowy [60]

W ostatnich latach stosuje się też terapię promieniowaniem UVB (tzw. *narrow band*) w wąskim zakresie długości fal 311–312 nm, unikając obciążenia organizmu podawaniem środków doustnych [59]. Nowoczesne kabiny do terapii UV posiadają obie opcje: wyboru zakresu promieniowania UVA lub UVB (patrz rys. 7.4). Mogą pracować w trybie rozdzielnym lub łączonym. Ponadto charakteryzują się niską emisją ciepła [60].

7.5.4. Szkodliwe działanie promieniowania słonecznego

Promieniowanie słoneczne jest niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu. Ma korzystny wpływ na samopoczucie, aktywność fizyczną, pobudza wydzielanie wielu hormonów, umożliwia syntezę witamin z grupy D. Aż 90% ustrojowej prewitaminy D powstaje w skórze na skutek działania UVB na 7-dehydrocholesterol [61].

Opalanie, czyli ekspozycja skóry na działanie promieni UV, stało się symbolem zdrowia dopiero na początku XX wieku, ponieważ kojarzyło się z uprawianiem różnego rodzaju sportów. Wcześniej opalenizna była niepożądaną cechą wyróżniającą niższe warstwy społeczne (robotnicy i chłopcy nie mogli jej uniknąć przy pracach na świeżym powietrzu).

Pierwsze obserwacje dotyczące szkodliwości działania słońca pochodzą z końca XIX wieku [38]. Pojawiły się informacje o reakcjach fototoksycznych i fotoalergiczyńskich, po zastosowaniu niektórych leków i kosmetyków. W ostatnich latach opisano odległe skutki działania słońca na skórę w postaci przedwczesnego jej starzenia się oraz możliwości rozwoju stanów przedrakowych i nowotworów skóry [62, 63]. Coraz powszechniejsze wykorzystywanie w ostatnich latach sztucznych źródeł energii świetlnej, które stosuje się zarówno w celach leczniczych (fototerapia, fotochemioterapia), jak i kosmetycznych (solaria), co może przyczyniać się do kumulowania w skórze niekorzystnych zjawisk fotobiologicznych.

Efekt działania promieniowania ultrafioletowego na skórę człowieka zależy od takich czynników jak: położenie geograficzne, zanieczyszczenie środowiska (zmniejszenie stężenia ozonu w stratosferze) oraz pora roku i dnia. Duże znaczenie odgrywa również zawód, tryb życia, wiek, a także sposób ubierania się. Skutki biologiczne działania promieniowania ultrafioletowego na skórę obserwuje się bezpośrednio i wkrótce po naświetlaniu. Mogą pojawić się skutki odległe w czasie.

Promieniowanie ultrafioletowe ma największy wpływ na procesy zachodzące w skórze, m.in. rumień, opaleniznę i pogrubienie skóry. Promieniowanie UVB odpowiada za odczyny rumieniowe pojawiające się do 24 godzin po naświetlaniu skóry oraz za ostre odczyny posłoneczne [49]. Promieniowanie UVB dociera do granicy skórno-naskórkowej i jest kilkaset razy bardziej aktywne niż UVA [64].

Ostre oparzenia skóry w dzieciństwie mogą mieć wpływ na rozwój nowotworów w przyszłości. Odległe niekorzystne zjawiska skumulowanego działania promieniowania słonecznego polegają na szybszym starzeniu się skóry i stymulacji rozwoju nowotworów. Długotrwała ekspozycja na UV może powodować wiele niekorzystnych zmian wyglądu skóry, jej struktury i funkcji. Całość tych zmian określa się jako starzenie skóry spowodowane światłem (ang. *photoaging*) [65]. Skóra narażona na przewlekłe działanie promieni słonecznych staje się szorstka, pogrubiała, nieelastyczna. Powstała nawet angielska nazwa *celebrity sun damage* na określenie zmian, które dotknęły m.in. znanych aktorów [66].

Promieniowanie UVA wnika do skóry bardzo głęboko i niszczy jej strukturę, złożoną m.in. z włókien kolagenu i elastyny, powodując jej starzenie. Wskutek tego dochodzi do stopniowego zmniejszenia elastyczności skóry, która wizualnie staje się cieńsza i bardziej sucha [67]. Promieniowanie UVA działa z taką samą intensywnością przez cały dzień. Ze względu na odbicie i rozproszenie promieniowania na budynkach, problem ten dotyczy zwłaszcza terenów zurbanizowanych [68].

Promieniowanie UV jest aktywatorem wolnych rodników, które mogą pośredniczyć w uszkodzeniu białek komórkowych, lipidów i węglowodanów. Jednym z najbardziej niebezpiecznych efektów jest destrukcja materiału genetycznego komórki i niebezpieczeństwo powstania nowotworu [69]. Nie ma zgodności, czy w procesie tym istotniejszą rolę odgrywa długotrwała ekspozycja, czy ostre nasłonecznienie, prowadzące do oparzeń słonecznych. Wiadomo, że ostre oparzeniowe odczyny posłoneczne mogą prowokować występowanie w obrębie skóry znamion barwnikowych. Liczne znamiona barwnikowe są z kolei czynnikiem ryzyka rozwoju czerniaka złośliwego [70].

Opisane zjawiska obejmują bezpośrednio i odległe czasowo efekty biologiczne działania promieniowania słonecznego na skórę osób zdrowych. Promieniowanie UVB, choć jest go tylko 23% i które wydaje się mniej szkodliwe, działa głównie na naskórek i wywołuje pigmentację, ale czasem również powoduje nowotwory skóry. Naukowo udowodniono związek pomiędzy rakiem skóry a promieniowaniem, dlatego też zaleca się, aby dzieci poniżej 3 lat były traktowane jak osoby o fototypie I i w ogóle nie były wystawiane na bezpośrednie promieniowanie Słońca [44]. Dowiedziono, że również promieniowanie UVB przyspiesza starzenie i niszczy ważne elementy skóry. Promieniowanie UVB przyczynia się do powstania katarakty i alergii na światło. Ponadto osłabia system immunologiczny [71].

Istnieje grupa pacjentów wykazujących wrodzoną lub nabytą nadwrażliwość na światło słoneczne. W wyniku tej nadwrażliwości mogą rozwijać się choroby skóry zwane fotodermatozami [72]. Chociaż nie ma ścisłej klasyfikacji tych chorób, najczęściej dzieli się je na trzy grupy:

- idiopatyczne; do grupy fotodermatoz idiopatycznych zalicza się przede wszystkim wielopostaciowe osutki świetlne, pokrzywkę słoneczną oraz zespół przetrwałych odczynów świetlnych,
- wynikające z wrodzonej lub nabytej utraty właściwości ochronnych skóry przed promieniowaniem UV; wśród schorzeń związanych z utratą właściwości ochronnych skóry przed światłem słonecznym należy wymienić skórę pergaminową i barwnikową, bielactwo oraz pelagrę,
- oraz związane z endogennymi (wewnątrzustrojowymi) lub egzogennymi (zewnętrznymi) czynnikami uczulającymi na światło.

Stale notuje się wzrastającą liczbę odczynów posłonecznych związanych z egzogennymi czynnikami uczulającymi na światło. Wiąże się to nie tylko z działaniem niektórych substancji zawartych w kosmetykach, rozpowszechnieniem roślin zawierających substancje światłouczulające, ale przede wszystkim z wprowadzeniem wielu nowych leków o różnym, często nieprzewidywalnym działaniu ubocznym. Reakcje związane z egzogennymi czynnikami światłouczulającymi powodowane są przez połączenie efektu działania zewnątrzpochodnych substancji mających zdolność absorbowania energii świetlnej oraz światła. Każdy z tych czynników, działając osobno, nie wywołałby nieprawidłowej reakcji. Zależnie od mechanizmu powstawania, odczyny te dzielą się na fototoksyczne i fotoalergiczne. Wśród leków wywołujących takie reakcje znajdują się niektóre antybiotyki,

sulfonamidy, leki obniżające ciśnienie, antyarytmiczne, moczopędne, przeciwpadaczkowe, jak również doustne środki antykoncepcyjne [73].

Odczyny fototoksyczne powstają na drodze uwalniania energii przez substancje chemiczne będące w kontakcie ze skórą, np. po nałożeniu maseczki ziołowej zawierającej rutę zwyczajną [74]. Zmiany skórne (np. przebarwienia) mogą powstać już po pierwszorazowym kontakcie z tymi związkami. Reakcje fototoksyczne mogą być wywołane przez wiele substancji o działaniu światłouczulającym [75].

Odczyny fotoalergiczne powstają jak klasyczne alergię pod wpływem aplikacji substancji uczulającej, a promieniowanie UV jest czynnikiem wywołującym reakcję alergiczną. Reakcja alergiczna jest bardzo specyficzną reakcją organizmu. W reakcji na pojawienie się substancji uczulającej, organizm produkuje przeciwciała, najczęściej typu IgE lub specyficzne limfocyty T, co uznaje się za dowód odczynu alergicznego [76]. Gwałtowna reakcja alergiczna pojawia się tylko u niektórych osób poddanych działaniu substancji fotoalergizujących. W większości pod wpływem substancji o działaniu fotoalergicznym powstają zmiany określane jako fotoalergiczny wyprysk kontaktowy, odpowiadający zwykłemu wypryskowi kontaktowemu [77]. Po upływie 24–48 godzin od ekspozycji na promienie UV pojawiają się wykwity grudkowe z towarzyszącym świądem.

Osobną grupę chorób stanowią porfirie, w których nadwrażliwość na światło spowodowana jest działaniem substancji światłouczulającej pochodzenia endogennego [78]. Znane są również stany pseudoporfirii wywołanej zażyciem leków [79, 80]. W obu przypadkach obecne w organizmie człowieka porfiryny absorbują promieniowanie UVA ($\lambda \sim 400$ nm). Następnie pochłoniętą energię oddają cząsteczkom tlenu, wracając do stanu podstawowego. Powstają w ten sposób reaktywne rodniki tlenowe, które mogą uszkadzać różne struktury komórkowe. Ten sam mechanizm wykorzystuje się w medycynie fotodynamicznej [81, 82].

Naturalną linią obrony organizmu człowieka przed promieniowaniem UV jest wytwarzanie endogennego barwnika – melaniny [83]. Pod względem chemicznym jest ona mieszaniną dwóch polimerów: brązowo-czarnej eumelaniny [84] i czerwono-brunatnej feomelaniny. Melaniny są syntetyzowane w melanocytach tworząc skupiska zwane melanosomami [85]. Melanocyty ulokowane są w warstwie podstawnej naskórka i za pomocą wypustek przekazują melanosomy do otaczających je keratynocytów. Wielkość i ilość melanocytów, ich rozmieszczenie w różnych warstwach naskórka, jak również stosunek zawartości poszczególnych polimerów są zależne od rasy i czynników genetycznych. Melanina jest unikalnym związkiem absorbującym promieniowanie zarówno UVB, UVA jak i światła widzialne, chroniącym DNA przed uszkodzeniami świetlnymi [85].

Do innych elementów chroniących skórę przed UV należą również komórki warstwy rogowej naskórka. Ważną rolę odgrywa również warstwa lipidowa na powierzchni naskórka, absorbująca światło słoneczne w całym spektrum oraz kwas transurokainowy, znajdujący się w naskórku i w pocie.

Naturalne mechanizmy obronne skóry mogą okazać się niewystarczające przy intensywnym promieniowaniu słonecznym lub długiej ekspozycji na słońce, szczególnie u osób o jasnej karnacji. Konieczne staje się wówczas stosowanie zewnętrznych środków chroniących przed światłem (ZSC). Są to preparaty zawierające w swoim składzie filtry zmniejszające niekorzystne skutki działania promieni ultrafioletowych. Obecnie w różnych krajach stosuje się kilkadziesiąt substancji, które uznawane są za filtry przeciwsłoneczne. Wyróżnia się filtry chemiczne, mające zdolność absorpcji promieni UV oraz filtry fizyczne, chroniące skórę na skutek odbijania i rozpraszania tych promieni [49]. Poszczególne filtry charakteryzują się nieco odmiennymi właściwościami ochronnymi.

W grupie filtrów chemicznych znajdują się różne związki chemiczne [49]. Najpopularniejsze na rynku są pochodnymi kwasu paraaminobenzoowego (PABA), kwasu cynamonowego, kwasu salicylowego, związków terpenowych, benzofenonu. Wadą filtrów chemicznych jest ich niezbyt dobra tolerancja przez skórę i słabe pochłanianie promieniowania UVA. Zdarzają się bowiem również uczulenia na składniki filtrów [86].

Filtry fizyczne to przede wszystkim tlenek i ditlenek tytanu oraz cynku. Znaczenie tych związków jako środków promieniochronnych wzrosło wraz z opracowaniem technologii ich produkcji w postaci mikropigmentów. Współczesne silne preparaty chroniące przed światłem zawierają z reguły mieszaninę kilku filtrów chemicznych i fizycznych [78]. Siłę działania preparatu chroniącego przed promieniowaniem UV określa się międzynarodowym wskaźnikiem SPF (ang. *sun protective factor*, *skin protection factor*). SPF wskazuje, o ile dłużej można przebywać na słońcu po zastosowaniu danego preparatu do momentu wystąpienia rumienia skóry, w porównaniu do analogicznego czasu bez ochrony skóry. Podczas opalania w klimacie śródziemnomorskim zaleca się stosować filtry o odpowiednio wyższym SPF (o 10–15 jednostek).

Tabela 7. Zalecenia dotyczące stosowania filtrów w zależności od fototypu [78]

Fototyp	1–3 dzień opalania	4–6 dzień opalania
I	30–35	20–30
II	20–30	15–20
III	12–20	10–12
IV	8–12	4–8

7.6. Oddziaływanie promieniowania laserowego na tkanki

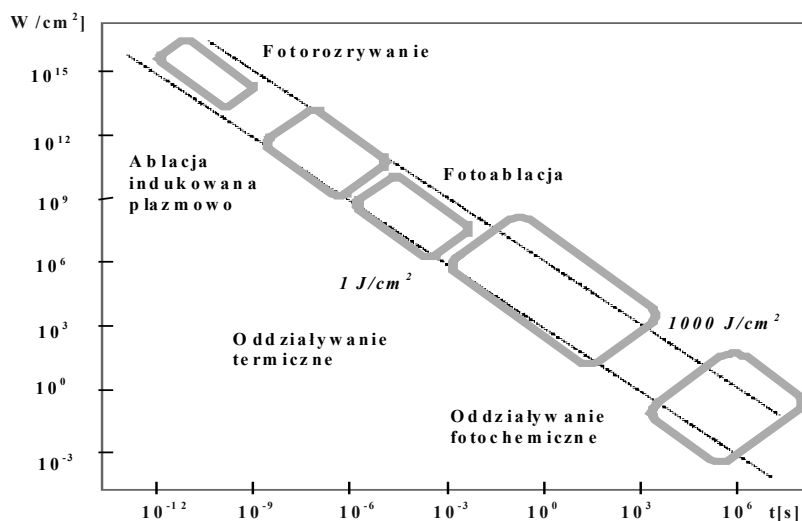
Efekty wywołane działaniem promieniowania laserowego na tkanki można podzielić dwie grupy: efekty, w których nie dochodzi do zmiany temperatury w tkance (atermiczne) i efekty, które prowadzą do podniesienia temperatury w tkance (patrz tab. 8). Energia promieniowania laserowego jest absorbowana przez tkankę i zamieniana na inne rodzaje energii. Może to zapoczątkować w tkance zmiany fototermiczne lub fotome-

chaniczne i fotojonizacyjne, obserwowalne makroskopowo lub fotobiochemiczne, które mogą być badane pośrednio.

Tabela 8. Zmiany w tkance spowodowane działaniem promieniowania laserowego (na podstawie [87, 88])

Zmiany temperatury po zadziałaniu promieniowania laserowego	Zmiany obserwowane w tkance
37 °C	Brak efektów makroskopowych, temperatura nie podnosi się, może dochodzić do fotoaktywacji
42–45 °C	Hypertermia, tkanka przegrzana, zmiany odwracalne, aktywacja termiczna
50 °C	Redukcja aktywności enzymatycznej, kinetyki komórek
60 °C	Denaturacja białek i kolagenu, początek koagulacji, nekroza (martwica tkanki)
80 °C	Rozpuszczanie błon komórkowych, waporyzacja (parowanie)
100 °C	Waporyzacja, ablacja (dekompozycja termiczna)
>150 °C	Karbonizacja (zwęglenie tkanek)
>300 °C	Stopienie

Reakcje te zależą od rodzaju lasera, gęstości energii i rodzaju tkanki. Gęstości energii stosowane w medycynie są w zakresie od 10^{-2} do 10^4 J/cm², najczęściej od 1 do 1000 J/cm² [88]. Odpowiadający im przedział gęstości mocy to zakres od 10^{-3} do 10^{16} W/cm² (patrz rys. 7.5).



Rys. 7.5. Oddziaływanie promieniowania laserowego na tkankę w zależności od gęstości mocy i czasu ekspozycji

7.6.1. Efekty fotobiochemiczne

Promieniowanie laserowe o określonej długości fali może być selektywnie absorbowane przez chromofory (endogenne lub egzogenne substancje światłoczułe) i wzbudzać je bez wytwarzania ciepła. Wzbudzony barwnik ulega relaksacji do stanu podstawowego i emituje promieniowanie luminescencyjne, co wykorzystywane jest w diagnostyce nowotworów (ang. *Photodynamic Diagnosis*, PDD). Po ponownej absorpcji promieniowania wzbudzony barwnik może reagować chemicznie z innymi składnikami tkanki, co z kolei wykorzystywane jest w fotodynamicznej terapii nowotworów (ang. *Photodynamic Therapy*, PDT). Zagadnienia te są omówione w rozdziale 13. *Fotodiagnostyka medyczna w czasie rzeczywistym. Aparatura i aplikacje kliniczne* i w rozdziale 17. *Terapia fotodynamiczna*.

W neonatologii stosowana jest fototerapia żółtaczki noworodków. Niedojrzałość wątroby powoduje niepożądaną kumulację bilirubiny w organizmie. Ponieważ światło niebieskie powoduje przemianę bilirubiny, stosuje się naświetlania promieniowaniem w tym zakresie. Mechanizm reakcji to absorpcja niebieskiego światła, która powoduje przegrupowanie (rozrywanie) wiązań wodorowych w cząsteczkach bilirubiny dzięki czemu stają się one wystarczająco polarne by być usunięte przez wątrobę [89].

Innym rodzajem efektów fotobiochemicznych są efekty biostymulacyjne. Pierwsze badania w tej dziedzinie prowadził Mester i wsp. na Uniwersytecie Semmelweissa w Budapeszcie. Pierwsza opublikowana praca dotyczyła wpływu promieniowania laserowego małej mocy na porost włosów u myszy [90]. W 1984 roku opublikowano pracę, w której udowodniono, że zaabsorbowane promieniowanie stymuluje m.in. transport elektronów w łańcuchu oddechowym, co sprzyja zwiększeniu aktywności enzymów i produkcji ATP (adenozynotrójfosforanu) [91].

Tabela 9. Reakcje fotobiochemiczne i ich wykorzystanie w medycynie

Reakcje fotobiochemiczne	
Główny cel	Wywołanie reakcji fotochemicznych endogennych lub po podaniu egzogenego fotouczulacza. Wywołanie reakcji fotobiochemicznych na poziomie komórkowym
Zjawisko	Brak zmian makroskopowych
Typowe lasery	He-Ne, półprzewodnikowe, barwnikowe, przestrajalne na ciele stałym. Mogą być też źródła światła nielaserowe: lampy halogenowe, ksenonowe
Czas trwania impulsu	Długie impulsy sekundowe lub lasery o promieniowaniu ciągłym
Gęstość mocy	0,001–1 W/cm ²
Zastosowania	Medycyna fotodynamiczna, diagnostyka, fototerapia, laseroterapia niskoenergetyczna

Zjawisko to jest coraz lepiej poznawane i np. za pomocą magnetycznego rezonansu jądrowego wykazano, że pod wpływem promieniowania o długości fali 780 nm

poprawia się ukrwienie tkanki. Prawdopodobnie usprawnieniu ulega dysocjacja oksyhemoglobiny, co wpływa korzystnie na zaopatrzenie tkanek w tlen [92]. Zarejestrowano również wzmożenie procesów regeneracyjnych i za główny mechanizm procesu regeneracji uznano przyspieszoną proliferację komórek [93, 94]. Sugerowany jest też informacyjno-energetyczny aspekt laseroterapii [100]. Wybrane zastosowania zostały też przedstawione w rozdziale 15. *Wykorzystanie oddziaływania światła w bliskiej podczerwieni na struktury biologiczne* i w rozdziale 16. *Przykładowe zastosowania laserów w medycynie*. Podsumowanie zawarto w tab. 9.

7.6.2. Efekty fototermiczne

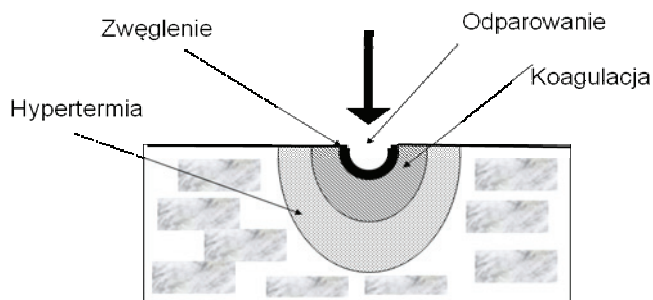
Promieniowanie laserów niskoenergetycznych nie wywołuje podwyższenia temperatury tkanki o więcej niż 0,1–0,5 °C. Lasery o średniej i dużej mocy mogą natomiast spowodować wzrost temperatury w tkankach (patrz tab. 8, tab. 10). Energia promieniowania laserowego po zabsorbowaniu w tkance może zostać zamieniona na energię termiczną. Oddziaływanie termiczne obserwuje się dla gęstości mocy o wartościach powyżej 1 W/cm². Pierwszym efektem wzrostu temperatury już o 5 °C są konformacyjne zmiany cząsteczek. Do temperatury 42 °C nie obserwuje się żadnych zmian w tkance w skali makroskopowej. W przedziale 42–50 °C wzrost temperatury powoduje hipertermię i związane z nią zmiany w strukturze błon biologicznych określane wspólną nazwą. Powyżej 50 °C następuje redukcja aktywności enzymatycznej, a mechanizmy regeneracyjne komórek są całkowicie wyłączone. W temperaturze 60 °C następuje denaturacja białek oraz kolagenu, co prowadzi do koagulacji i martwicy komórek. W temperaturze 100 °C wzrasta ciśnienie w komórce, a cząsteczki wody zaczynają parować. Duża wartość ciepła parowania wody (2259 kJ/kg, 539,6 kcal/kg) powoduje, że tworząca się para unosi ciepło, co pomaga ograniczyć wzrost temperatury w przylegających tkankach. Z powodu wzrostu objętości podczas przemiany fazowej tworzą się pęcherzyki gazu, następuje rozbicie struktur tkanki i nekroza. W przypadku laserów wysokoenergetycznych możliwe jest uzyskanie temperatury >150 °C. W temperaturze powyżej 150 °C ma już miejsce karbonizacja (zwęglenie), co objawia się zaczernieniem przylegającej tkanki oraz unoszeniem się dymu. W temperaturze powyżej 300 °C, w zależności od materiału tkankowego, może pojawić się topienie (np. tkanki zęba).

Trzeba pamiętać, że podczas cięcia lub usuwania tkanki za pomocą promieniowania lasera powyższe efekty mogą występować równocześnie. Na brzegach krateru po odparowanej tkance pojawiają się zmiany nieodwracalne: strefa zwęglenia otoczona strefą koagulacji. Na zewnątrz rozciąga się strefa hipertermii (zmiany odwracalne) (patrz rys. 7.6).

Efekty termiczne spowodowane zaabsorbowaniem światła laserowego przebiegają stopniowo. Najpierw ogrzewany jest mały obszar tkanki, który uzyskuje temperaturę

umożliwiająca przemianę w fazę gazową, by wkrótce potem osiągnąć maksymalne rozszerzenie. Tkanka w obszarze tego regionu absorbuje nadal energię laserową bez podwyższania temperatury. Jeżeli zaabsorbowane promieniowanie osiągnie pewien próg krytyczny, nastąpi wyparowanie wody zawartej w tkance, która zabierze ze sobą mikroskopijne fragmenty tkanki. Z rozpoczęciem ablacji na powierzchni tworzy się krater, który wdziera się w tkankę. Średnica krateru odparowanej tkanki ma wielkość średnicy wiązki laserowej. Przy naświetlaniu następuje dostarczenie ciepła do strefy otaczającej krater, co powoduje rozgrzanie tej okolicy, tworzenie się pęcherzyków i denaturację białka; powstaje więc strefa martwicy.

Głębokość krateru i zasięg strefy martwicy tkanki przylegającej do niego w dużej mierze zależy od długości fali promieniowania i od czasu. Głębokość martwicy ma zakres od ok. 5 μm nawet do 5 mm. W przypadku promieniowania z zakresu UV (lasery ekscymerowe XeCl, ArF, KrF) oraz podczerwieni (laser CO_2 i Er:YAG) głębokość wnikania jest mała. Natomiast w przypadku promieniowania z zakresu widzialnego (np. laser argonowy) i z zakresu bliskiej podczerwieni (np. laser Nd:YAG) – głębokość wnikania jest większa. Najmniejszy zasięg strefy martwicy uzyskuje się, stosując krótkotrwałe impulsy płytko wnikającego promieniowania o dużej gęstości mocy.

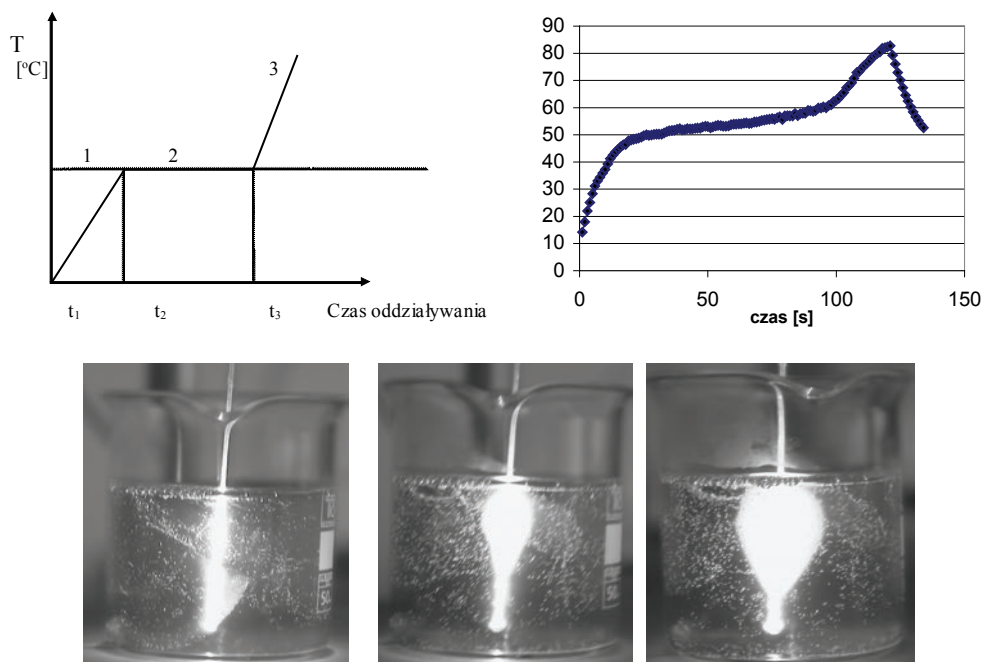


Rys. 7.6. Schematyczne przedstawienie stref pojawiających się w wyniku termicznego działania promieniowania laserowego na tkanki (na podstawie [95])

Promieniowanie laserowe oddziałuje termicznie, jeżeli gęstość mocy jest równa lub wyższa od 10 W/cm^2 , a i czas trwania impulsu laserowego wynosi przynajmniej 1 μs . Efekty fototermiczne wykorzystywane są m.in. do spawania tkanek, cięcia, koagulacji lub odparowania tkanek.

Zaabsorbowane światło rozgrzewa tkankę, przy czym następuje lokalny wzrost temperatury i część ciepła dyfunduje zgodnie z gradientem temperatury na zewnątrz oraz do innych części tkanki. Jeśli nie ma przekształceń fazowych, wzrost intensywności światła prowadzi do wzrostu temperatury w oświetlanej strefie. Dlatego dyfuzja ciepła przy określonym natężeniu (oczywiście tylko w pewnym ograniczonym zakresie) prowadzi do ograniczenia maksymalnej temperatury w tym regionie. Przez pe-

wien czas temperatura nie rośnie lub rośnie minimalnie. Jeżeli promieniowanie działa nadal, po czasie równowagi, temperatura znów zaczyna rosnąć (patrz rys. 7.7). Czas trwania poszczególnych faz zależy m.in. od rodzaju tkanki, długości fali i gęstości mocy promieniowania.



Rys. 7.7. Zmiany temperatury podczas oddziaływania lasera na układy biologiczne. Po lewej stronie u góry: uproszczony model wzrostu temperatury T podczas termicznego działania promieniowania laserowego. Po prawej u góry: zmiany temperatury białka kurzego (zdjęcia na dole) podczas koagulacji za pomocą lasera półprzewodnikowego 980 nm, 20W. W temperaturze około 60 °C białko zaczyna koagulować. Następuje wtedy szybki wzrost temperatury. Po osiągnięciu temperatury maksymalnej, obserwowany jest spadek (Dane pochodzą z badań prowadzonych w Grupie Bio-Optyki, H. Podbielska, I. Hołowacz)

Tabela 10. Reakcje fototermiczne i ich wykorzystanie w medycynie

Reakcje fototermiczne	
Główny cel	Osiągnięcie odpowiedniej temperatury w tkance i destrukcja tkanki
Zjawisko	Koagulacja, odparowanie, zwęglenie, stopienie
Typowe lasery	CO ₂ , Nd:YAG, Er:YAG, Ho:YAG, Ar
Czas trwania impulsu	1 μ s–1 min, lasery CW
Gęstość mocy	10–10 ⁶ W/cm ²
Zastosowania	Koagulacja, odparowanie, dekompozycja termiczna, interstycjalna termoterapia laserowa, leczenie np. odklejania się siatkówki

7.6.3. Fotoablacja

Innym przykładem oddziaływania laserowego jest proces fotoablacji, czyli nietermicznego usuwania tkanki. Podstawową i najważniejszą cechą procesu fotoablacji jest usuwanie tkanki przy bardzo małym termicznym uszkodzeniu otaczających ją struktur, gdzie strefa zniszczenia ma grubość ułamka mikrometra (patrz tab. 11). Wysokoenergetyczny impuls laserowy działa na tkankę w bardzo krótkim czasie, co nie pozwala na szerzenie się zmian temperaturowych w tkance.

Zastosowanie znalazły tu na początku lasery emitujące wysokoenergetyczne promieniowane UV. Zamiana energii promieniowania z zakresu UV w bardzo małej objętości i bardzo krótkim czasie powoduje powierzchniowe usuwanie warstw tkanki. W wyniku absorpcji promieniowania lasera z zakresu UV zachodzą procesy dysocjacji molekuł, następuje zniszczenie wiązań międzycząsteczkowych i gwałtowne rozerwanie struktur komórkowych. Następstwem tego jest usunięcie tkanki na małej głębokości - grubość warstwy usuniętej pojedynczym impulsem lasera leży w obszarze submikrometrowym albo mikrometrowym. Szybkość usuwania od 10 do 100 $\mu\text{m/s}$ można osiągnąć poprzez częstotliwość powtarzania impulsów w zakresie 10–50 Hz. Jeżeli absorbowany jest foton o częstotliwości z zakresu UV, osiągnięta energia wzbudzenia jest zwykle wystarczająco wysoka, aby osiągnąć stan energetyczny przekraczający energię wiązania. Efekty nietermiczne mają też zastosowanie np. w systemach laserowej poracji [96, 97, 98].

W latach 90. tych pojawiły się rozwiązania techniczne specjalnych systemów działających w podczerwieni, które wykorzystywane są m.in. do zabiegów dermabrazji laserowej. Użycie tego typu laserów umożliwia kontrolowane usuwanie nawet bardzo cienkich powierzchniowych warstw tkanki o dużej powierzchni przy ograniczeniu do minimum wpływu termicznego na tkanki otaczające. Do tego celu używane są obecnie impulsowe lasery CO_2 , oraz impulsowe lasery Er:YAG [99].

Tabela 11. Reakcje fotoablacji i ich wykorzystanie w medycynie

Proces fotoablacji	
Główny cel	Powierzchnowe usunięcie warstw tkanki
Zjawisko	Czysta ablacja z towarzyszącymi efektami akustycznymi i widoczną fluorescencją
Typowe lasery	Lasery ekscymerowe, ArF, KrF, XeCl, FeF, lasery emitujące w podczerwieni CO_2 , Er:YAG
Czas trwania impulsu	10–100 ns
Gęstość mocy	10^7 – 10^{10} W/cm ²
Zastosowania	Fotorefrakcyjna chirurgia rogówki, dermoabrazja laserowa

Bezwęglowe odparowanie tkanek za pomocą lasera CO_2 wymaga dużej mocy i zogniskowania promienia laserowego. Długość fali generowanej przez laser Er:YAG

(2940 nm) jeszcze lepiej odpowiada maksimum absorpcji wody. Laser ten znakomicie nadaje się do odparowania naskórka, nie wywołując żadnych uszkodzeń termicznych w tkankach otaczających. Ponieważ promień wnika bardzo płytko, laser ten stosowany jest najczęściej do usuwania bardzo powierzchniowych zmian na skórze. Ze względu na atermiczne działanie, laser ten nie posiada właściwości koagulujących.

7.6.4. Efekty fotojonizacyjne

Efekty fotojonizacyjne występują na skutek działania bardzo krótkotrwałych impulsów (wartości rzędu 100 fs–100 ns) promieniowania laserowego o dużej gęstości mocy, tj. powyżej 10^{10} W/cm². Promieniowanie to powoduje jonizację cząstek tkanki i lokalne wytworzenie plazmy, która silnie absorbuje promieniowanie laserowe. W miejscu powstania plazmy następuje usunięcie tkanki. Etap ten nazwano ablacją indukowaną plazmowo (patrz tab. 12).

Tabela 12. Reakcje fotoablacji indukowanej plazmowo i ich wykorzystanie w medycynie

Ablacja plazmowa	
Główny cel	Ablacja poprzez jonizujące tworzenie plazmy
Zjawisko	Czysta ablacja z towarzyszącymi efektami akustycznymi i widocznymi niebieskimi rozbłyskami plazmy
Typowe lasery	lasery ekscymerowe, Nd:YAG, Ti:Sapphir
Czas trwania impulsu	100 fs–500 ps
Gęstość mocy	10^{11} – 10^{13} W/cm ²
Zastosowania	literypsja, oftalmologia, stomatologia

Drugi etap nosi nazwę fotorozrywania (fotofragmentacja, fotodestrukcja, ang. *photodisruption*) (patrz tab. 13). Jest on wynikiem ekspansji plazmy, której towarzyszy powstanie uderzeniowej fali akustycznej przenoszącej energię w głąb tkanki. Rozrywanie jest więc wynikiem zjawisk termicznych i mechanicznych.

Tabela 13. Reakcje fotofragmentacji i ich wykorzystanie w medycynie

Fotofragmentacja	
Główny cel	Fragmentacja i cięcie tkanek siłami mechanicznymi
Zjawisko	Wybuch plazmy, generacja fal uderzeniowych, kawitacja, powstawanie strumienia plazmy
Typowe lasery	Nd:YAG, Ho:YAG, Ti:Sapphire, Nd:YLF
Czas trwania impulsu	100 fs–100 ns
Gęstość mocy	10^{11} – 10^{16} W/cm ²
Zastosowania	Fragmentacja soczewki, litotrypsja

Zjawiska te są przez niektórych autorów nazywane oddziaływaniem elektromechanicznym, ponieważ impuls lasera o bardzo dużej mocy zostaje skupiony na małej powierzchni i głównym efektem jest mechaniczne niszczenie tkanki. W miejscu skupienia występuje bardzo silne pole elektryczne, rzędu 10^9 V/cm, które powoduje jonizację tkanki [100].

Bez względu na terminologię, zjawiska te występują przy bardzo dużych wartościach gęstości mocy promieniowania laserowego i nie zależą od wartości współczynnika absorpcji tkanki. Wykorzystuje się je w przypadku tkanek o dużej wartości transmisji promieniowania laserowego.

Efekty te są obecnie wykorzystywane w okulistyce w mikrochirurgii przedniego odcinka oka do fragmentacji ludzkiej soczewki [101], do rozbijania złożeń nerkowych i żółciowych [102], do usuwania kamieni nerkowych (litotrypsja) [103, 104], a także do rozbijania zatorów w naczyniach krwionośnych i niszczenie skrzepów krwi (laserowa tromboliza) [105, 106]. Te ostatnie zabiegi próbuje się stosować do oczyszczania naczyń ze złożeń.

Literatura

- [1] SECKMEYER G. et al., *Variability of UV irradiance in Europe*, Photochemistry and Photobiology, 2008, Vol. 84, 172–179.
- [2] POŚCIK A., WOLSKA A., OWCZAREK G., *Ocena narażenia na promieniowanie nadfioletowe z zastosowaniem indywidualnych fotochromowych dozymetrów*, na zlecenie ZUS wykonał Centralny Instytut Ochrony Pracy Państwowy Instytut Badawczy, www.zus.pl/files/dpir/20091211_Dozymetry_UV.pdf
- [3] GLINKOWSKI W., POKORA L., *Lasery w terapii*, Laser Instruments Centrum Techniki Laserowej, Warszawa 1993.
- [4] PODBIELSKA H., *Metody optyczne w fizyce środowiska*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1996.
- [5] TUCHIN V., *Light-tissue interaction*, 3-1-3-23, w: Biomedical Photonics Handbook, Vo-Dinh T. (Ed.), CRC Press, 2003.
- [6] MÜLLER G., SCHALDACH B., *Basic Laser Tissue Interaction*, Lasers in Medical Science, Vol. 4, Supplement 1, 7–15, DOI: 10.1007/BF02276665, 1989.
- [7] NIEMZ M., *Laser-Tissue Interactions, Fundamentals and Applications*, Springer, 3rd enlarged ed. 2003, 2nd printing, 2004.
- [8] BERLIEN H.P., MÜLLER G., *Applied Laser Medicine*, Springer, 2003.
- [9] FIRDOUS SH., *Laser tissue interaction and wave propagation in random media, Mueller matrix polarimetry*, VDM Verlag, 2010.
- [10] ELWELL C., HEBDEN J., *Near infrared spectroscopy*, artykuł na stronie <http://www.ucl.ac.uk/medphys/research/borl/intro/nirs>
- [11] <http://omlc.ogi.edu/spectra/>
- [12] TOUBLANC D., *Henyey-Greenstein and Mie phase functions in Monte Carlo radiative transfer computations*, Applied Optics, 1996, Vol. 35, No. 18, 3270–3274.
- [13] JACQUES S.L., PRAHL S.A., *Some biological scatterers*, ECE532 Biomedical Optics, 1998 <http://omlc.ogi.edu/classroom/ece532/class3/index.html>

- [14] TYCHINSKY V., KRETUSHEV A., VYSHENSKAJA T., *Mitochondria optical parameters are dependent on their energy state: a new electrooptical effect?*, Eur. Biophys. J., 2004, Vol. 33, 700–705.
- [15] ROSS K.F.A., *The changes of water distribution in cytoplasm and nuclear sap during division as indicated by changes in their refractive indices*, Quarterly Journal of Microscopical Science, 1954, Vol. 95, No. 4, 425–432.
- [16] CURL C.L., BELLAIR C.J., HARRIS T., ALLMAN B.E., HARRIS P.J., STEWART A.G., ROBERTS A., NUGENT K.A., DELBRIDGE L.M., *Refractive index measurement in viable cells using quantitative phase-amplitude microscopy and confocal microscopy*, Cytometry A, 2005, Vol. 65, No. 1, 88–92.
- [17] BEUTHAN J., MINET O., HELFMAN J., MÜLLER G., *The spatial variation of the refractive index in biological cells*, Physics in Medicine and Biology, 1996, Vol. 41, No. 3, 369–382.
- [18] KOHL M., COPE M., *Influence of glucose concentration on light scattering in tissue*, Optics Letters, 1994, Vol. 19, No. 24, 2170–2172.
- [19] BRUNSTING A., MULLANEY P., *Differential light scattering from spherical mammalian cells*, Biophysical Journal, 1974, Vol. 14, No. 6, 439–453.
- [20] LIU H., BEAUVOIT B., KIMURA M., CHANCE B., *Dependence of tissue optical properties on solute-induced changes in refractive index and osmolarity*, Journal of Biomedical Optics, 1996, Vol. 1, No. 2, 200–211.
- [21] VITKIN I., WOOLSEY J., WILSON B., ANDERSON R., *Optical and thermal characterization of natural (sepia officinalis) melanin*, Photochemistry and Photobiology, 1994, Vol. 59, No. 4, 455–462.
- [22] LANNI F., WAGGONER A., TAYLOR D., *Internal reflection fluorescence microscopy*, Journal of Cell Biology, 1985, Vol. 100, No. 4, 1091–1102.
- [23] BEREITER-HAN J., FOX C., THORELL B., *Quantitative reflection contrast microscopy of living cells*, Journal of Cell Biology, 1979, Vol. 82, No. 3, 767–779.
- [24] BARER R., JOSEPH S., *Refractometry of living cells*, Quarterly Journal of Microscopical Science, 1954, Vol. 95, No. 3, 399–423.
- [25] CHANDRASEKHAR S., *Radiative transfer*, Courier Dover Publications, 1960
- [26] HULST H. C., *Multiple light scattering: tables, formulas, and applications*, Academic Press, 1980
- [27] MOBLEY J., VO-DINH T., *Optical properties of tissue*, 2-1-3-72, w: Biomedical Photonics Handbook, Vo-Dinh T. (Ed.), CRC Press, 2003.
- [28] CHERNOMORDIK V., HATTERY D., GROSENICK D., WABNITZ H., RINNEBERG H., MOESTA K. T., SCHLAG P., GANDJBAKHICHE A., *Quantification of optical properties of a breast tumor using random walk theory*, J. Biomed. Opt., 2002, Vol. 7, 80; doi:10.1117/1.1427049
- [29] <http://www.medphys.ucl.ac.uk/research/borg/theses.htm>
- [30] MANIEWSKI R., LIEBERT A., *Metoda laserowo-dopplerowska w badaniach mikrokrążenia krwi*, EXIT, Warszawa 2003.
- [31] LIEBERT A., *Wybrane metody diagnostyki medycznej z wykorzystaniem spektroskopii w bliskiej podczerwieni*, Adam Liebert ; Polska Akademia, Nauk. Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej, Warszawa 2004.
- [32] HUA-JIANG WEI, DA XING, GUO-YONG WU, YING JIN, HUAI-MIN GU, *Optical properties of human normal small intestine tissue determined by Kubelka-Munk method in vitro*, World J. Gastroenterol. 2003, Vol. 9, No. 9, 2068–2072.
- [33] <http://omlc.ogi.edu/news/sep98/montecarlosampling/index.html>
- [34] KUBELKA P., MUNK F., *Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche*, [in:] Zeitschrift für technische Physik, 1931, 12, 593–601.
- [35] TAKATA A.N., ZANEVELD L., RICHTER W., *Laser-Induced Thermal Damage of Skin*, USAF, School of Aerospace Medicine, Report SAM-TR-77-38, Brooks AFB, TX, 1977.

- [36] DE GRUIJL F.R., VAN DER LEUN J.C., *Environment and health: 3. Ozone depletion and ultraviolet radiation*, CMAJ, 2000, Vol. 163, No. 7, 851–855.
- [37] Serwis NASA <http://earthobservatory.nasa.gov/Features/UVB/>
- [38] Serwis Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej; http://www.imgw.pl/index.php?option=com_content&view=article&id=144:aktualny-indeks-uv&catid=68:uv&Itemid=177
- [39] DULĘBA-MAJEK M., *Comparative analyses of UV radiation transmission through virtual and real woven fabrics for selected weaves*. *Fibres & Textiles in Eastern Europe*, 2009, Vol. 17, No. 4, 52–55.
- [40] Laboratorium Powłok Optycznych <http://www.vigosl.com.pl/strona.php?28812>
- [41] TANSKANEN A. et al., *Validation of daily erythemal doses from Ozone Monitoring Instrument with ground-based UV measurement data*, *Journal of Geophysical Research*, 2007, Vol. 112, D24S44, 15.
- [42] Serwis Międzynarodowej Komisji Oświetleniowej <http://www.cie.co.at/>
- [43] Dokumenty Międzynarodowej Komisji Oświetleniowej <http://files.cie.co.at/529.pdf>
- [44] Serwis Instytutu Meteorologii i Gospodarki Wodnej; http://www.imgw.pl/index.php?option=com_content&view=article&id=146&Itemid=179
- [45] KROTKOV N.A., HERMAN J.R., BHARTIA P.K., FIOLETOV V., AHMAD Z., *Satellite estimation of spectral surface UV irradiance 2. Effects of homogeneous clouds and snow*, *Journal of Geophysical Research – Atmospheres*, 2001, Vol. 106, No. D11, 11743–11759.
- [46] FITZPATRICK T.B., *The validity and practicality of sun-reactive skin types I through VI*, *Arch. Dermatol.*, 1988, Vol. 124, No. 6, 869–871.
- [47] FITZPATRICK T., JOHNSON R., WOLFF K., SUURMOND R., *Color atlas and synopsis of clinical dermatology*, McGraw-Hill, Baltimore 2000.
- [48] PAKULSKI J.D., KASE J.P., MEADOR J.A., JEFFREY W.H., *Effect of stratospheric ozone depletion and enhanced ultraviolet radiation on marine bacteria at Palmer Station, Antarctica in the early austral spring*, *Photochemistry and Photobiology*, 2008, Vol. 84, 215–221.
- [49] KLIMOWICZ A., BIELECKA-GRZELA S., CZUBA E., ŻEJMO M., *Środki światłochronne – budowa i zastosowanie*, *Roczniki Pomorskiej Akademii medycznej w Szczecinie*, 2007, Vol. 53, No. 1, 11–15.
- [50] WEINREB O., DOVRAT A., DUNIA I., BENEDETTI E. L., BLOEMENDAL H., *UVA-related alterations of young and adult lens water-insoluble α -crystallin, plasma membranous and cytoskeletal proteins*, *Eur. J. Biochem.*, 2001, Vol. 268, No. 3, 536–543.
- [51] Serwis dla lekarzy <http://www.ahaf.org/macular/about/risk.html>
- [52] HAWKINS B. S., BIRD, A., KLEIN, R., WEST S. K., *Epidemiology of age-related macular degeneration*, *Molecular Vision*, 1999, Vol. 5, 26–29.
- [53] http://nobelprize.org/nobel_prizes/medicine/laureates/1903/finsen-bio.html
- [54] ALBERT M.R., OSTHEIMER K.G., *The evolution of current medical and popular attitudes toward ultraviolet light exposure*, part 2, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2003, Vol. 48, No. 6, 909–918.
- [55] Parametry techniczne i modele lamp firmy Ultraviol <http://www.fotovita.eu/tematy/fotovita-lampy-antydepresyjne-ceny-parametry/>
- [56] http://www.lighting.philips.com/pl_pl/
- [57] Strona internetowa firmy Ultraviol <http://www.fotovita.eu/>
- [58] Ogólnopolskie Stowarzyszenie Chorych na Łuszczycę "Psoriasis" <http://luszczycyca.org/pl/>
- [59] <http://www.psoriasis.org/page.aspx?pid=430>
- [60] www.medisun.de
- [61] Serwis Mediweb http://mediweb.pl/nutrition/wyswietl_vad.php?id=1021, data publikacji 3.11.2002.
- [62] AMBROZIAK M., LANGNER A., *Uszkodzenie posłoneczne skóry i stany przednowotworowe: zapobieganie i leczenie*, [w:] *Współczesne leczenie wybranych chorób skóry*, pod red. A. Langnera, OIN Polfa, Warszawa 2002, 111–124.
- [63] HUSSEIN M.R., *Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms*, *J. Cutan. Pathol.*, 2005, Vol. 32, 191–205.
- [64] MOLONEY F.J., COLLINS S., MURPHY G.M., *Sunscreens. Safety, efficacy and appropriate use*, *Am. J. Clin. Dermatol.*, 2002, Vol. 3, No. 3, 185–191.

- [65] YAROSH D., DONG K., SMILES K., *UV-induced degradation of collagen I is mediated by soluble factors released from keratinocytes*, Photochemistry and Photobiology, 2008, Vol. 84, 67–68.
- [66] www.skinema.com
- [67] RITTIÉ L., FISHER G.J., *UV-light-induced signal cascades and skin aging*, Ageing Research Reviews, 2002, Vol. 1, 705–720.
- [68] ROBAA S.M., *A study of ultraviolet solar radiation at Cairo urban area, Egypt*, Solar Energy 2004, Vol. 77, 251–259.
- [69] MULLER H.K., MALLEY R.C., MCGEE H.M., SCOTT D.K., WOZNIAK T., WOODS G.M., *Effect of UV radiation on the neonatal skin immune system - implications for melanoma*, Photochemistry and Photobiology, 2008, Vol. 84, 47–54.
- [70] MARKOVIC S. N. et al., *Malignant Melanoma in the 21st Century, Part I: Epidemiology, Risk Factors, Screening, Prevention, and Diagnosis*, Mayo Clin Proc. 2007, Vol. 82, No. 3, 364–380.
- [71] NORVAL M., MCLOONE P., LESIAK A., NARBUTT J., *The effect of chronic ultraviolet radiation on the human immune system*, Photochemistry and Photobiology, 2008, Vol. 84, 19–28.
- [72] AGAR N., YOUNG A.R., *Melanogenesis: a photoprotective response to DNA damage?*, Mutation Research, 2005, Vol. 571, No. 1–2, 121–132.
- [73] STĘPIEŃ K., *Leki a wrażliwość na słońce*, Puls Medycyny 2005, Vol. 8, No. 105
<http://www.pulsmedycyny.com.pl/index/archiwum/5739/1.html>
- [74] Portal lekarzy alergologów, artykuł <http://alergologia.org/spis-publicacji/106-photoallergy-and-photopatch-test-course/879-Pathomechanisms-of-phototoxic-dermatitis>
- [75] ONOUE S., SETO Y., GANDY G., YAMADA S., *Drug-induced phototoxicity; an early in vitro identification of phototoxic potential of new drug entities in drug discovery and development*, Curr. Drug Saf., 2009, Vol. 4, No. 2, 123–136.
- [76] OBTUŁOWICZ K., *Environment and its impact on allergy*, Probl Hig Epidemiol 2006, Vol. 87, No. 4, 359–363.
- [77] ŚPIEWAK R., *Wyprysk fotoalergiczny i fitotoksyczny*, Alergoprofil, 2009, Vol. 5, No. 2, 2–7.
- [78] EDLICH R.F., WINTERS K.L., LIM H.W., COX M.J., BECKER D.G., HOROWITZ J.H., NICHTER L.S., BRITT L.D., LONG W.B., *Photoprotection by sunscreens with topical antioxidants and systemic antioxidants to reduce sun exposure*, Journal of Long-Term Effects of Medical Implants, 2004, Vol.14, No. 4, 317–340.
- [79] DOLAN C.K., HALL M.A., BLAZES D.L., NORWOOD C.W., *Pseudoporphyria as a result of voriconazole use: a case report*, Int. J. Dermatol., 2004, Vol. 43, No. 10, 768–771.
- [80] PATEL A.R., TURNER M.L., BAIRD K. et al., *Voriconazole-induced phototoxicity masquerading as chronic graft-versus-host disease of the skin in allogeneic hematopoietic cell transplant recipients*, Biol. Blood Marrow Transplant., 2009, Vol. 15, No. 3, 370–376.
- [81] GUPTA A.K., RYDER J.E., *Photodynamic therapy and topical aminolevulinic acid: an overview*, Am. J. Clin. Dermatol., 2003, Vol. 4, No. 10, 699–708.
- [82] HOULE J.M., STRONG H.A., *Duration of skin photosensitivity and incidence of photosensitivity reactions after administration of verteporfin*, Retina, 2002, Vol. 22, No. 6, 691–697.
- [83] KOCHEVAR I.E., PATHAK M.A., PARRISH J.A., *Photophysics, photochemistry and photobiology*, [w:] *Dermatology in General Medicine*, [w:] red. Fitzpatrick T.B., Eisen A.Z., Wolff K., Freedberg I.M., Austen K.F., McGraw-Hill, New York 1987, 1441–1451.
- [84] MEREDITH P., RIESZ J., *Radiative relaxation quantum yields for synthetic eumelanin*, Photochemistry and Photobiology, 2004, Vol. 79, No. 2, 211–216.
- [85] GRUBSKA-SUCHANEK E., *Naturalne mechanizmy obronne*, <http://www.zdrowie.med.pl>
- [86] SCHEUER E., WARSHAW E., *Sunscreen allergy: A review of epidemiology, clinical characteristics, and responsible allergens*, Dermatitis, 2006, Vol. 17, 3–11.
- [87] CALDERHEAD R.G., OHSHIRO T., *Progress in Laser Therapy*, John Wiley & Sons, 1991.

- [88] HELFMAN J., *Thermal effects*, [w:] *Applied Laser Medicine*, Berlien H.-P., Mueller G. (Eds.), Springer, 2003, 111–117.
- [89] Wytyczne Amerykańskiej Akademii Pediatrii dotyczące postępowania w przypadku hiperbilirubinemii u noworodków opublikowane w dokumencie: *Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation*, Pediatrics, 2004, Vol. 114, 297–316.
- [90] MESTER E., SZENDE B., TOTA J.G., *Effect of laser on hair growth of mice* (in Hungarian), 1967, Kiserl Orvostud, 19, 628–631.
- [91] PASSARELLA S., CASAMASSIMA E., MOLINARI S., PASTORE D., QUAGLIARIELLO E., CATALANO I.M., CINGOLANI A., *Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by helium-neon laser*, FEBS Letters, 1984, Vol. 175, No. 1, 95–99.
- [92] SCHAFFER M., BONEL H., SROKA R., SCHAFFER P.M., BUSCH M., SITTEK H., REISER M., DÜHMKE E., *Magnetic resonance imaging (MRI) controlled outcome of side effects caused by ionizing radiation, treated with 780 nm-diode laser – preliminary results*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2000, Vol. 59, No. 1–3, 1–8.
- [93] DE SOUZA S.C., MUNIN E., ALVES L.P., SALGADO M.A.C., PACHECO M.T.T., *Low power laser radiation at 685 nm stimulates stem-cell proliferation rate in Dugesia tigrina during regeneration*, Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology, 2005, Vol. 80, No. 3, 203–207.
- [94] KARU T.I., *Effects of visible radiation on cultured cells*, Photochemistry and Photobiology, 1990, Vol. 52, No. 6, 1089–1098.
- [95] PHILIPP C.M., BERLIEN H.-P., *Laser-Induced Thermotherapy (LITT), Basics*, [w:] *Applied Laser Medicine*, Berlien H.-P., Mueller G. (Eds.), Springer, 2003, 235–249.
- [96] JACQUES S.L., MCAULIFFE D.J., BLANK I.H., PARRISH J.A., *Controlled removal of human stratum corneum by pulsed laser*, Journal of Investigative Dermatology, 1987, Vol. 88, 88–93.
- [97] NELSON J.S., MCCULLOUGH J. L., GLENN T.C., WRIGHT W.H., LIAW L.H., JACQUES S.L., *Mid-infrared laser ablation of stratum corneum enhances in vitro percutaneous transport of drugs*, Journal of Investigative Dermatology, 1991, Vol. 97, 874–879.
- [98] JACQUES S. L., EJECKAM F. E., TITTEL, F. K. *How micro is microdissection? Laser removal of stratum corneum of skin to expose the epidermal battery*, SPIE Proceedings of Laser-Tissue Interaction IV, ed. by S.L. Jacques, A. Katzir, 1993, Vol. 1882, 23–33.
- [99] ROHDE E., MÜLLER G., *Dermabrazja laserowa: porównanie urządzeń laserowych*, Acta Bio-Optica et Informatica Medica, 1998, Vol. 4, 87–91.
- [100] KACZMAREK S., MIERCZYK Z., KUZAKA B., *Oddziaływanie promieniowania laserowego na tkankę biologiczną*, Wiadomości lekarskie, 1994, Vol. 47, No. 21–24, 868–880.
- [101] GEERLING G., ROIDER J., SCHMIDT-ERFURT U., NAHEN K., EL-HIFNAWI E., LAQUA H., VOGEL A., *Initial clinical experience with the picosecond Nd:YLF laser for intraocular therapeutic applications*, Br. J. Ophthalmol., 1998, Vol. 82, 504–509.
- [102] LESZCZYŚZYN J., MASSOPUST R., SKOCZYŁAS M., *Litotrypsja laserem barwnikowym w kamicy żółciowej przewodowej*, Polski Przegląd Chirurgiczny, 1994, Vol. 66, 342–356.
- [103] DUDA W., KAWECKI J., PIETRUSA A., *Rola lasera holmowego w urologii*, Przegląd Urologiczny, 2004, Vol. 5, No. 3, <http://www.przegląd-urologiczny.pl/artykul.php?67>
- [104] HUMAŃSKI P., DYKCZYŃSKI P., *Laser holmowy – nowy złoty standard w endourologii*, Przegląd Urologiczny, 2007, Vol. 8, No. 3, <http://www.przegląd-urologiczny.pl/artykul.php?1262>
- [105] SHAH R., MARTIN R.E., TOPAZ O., *Laser angioplasty and laser-induced thrombolysis in revascularization of anomalous coronary arteries*, J. Invasive Cardiol., 2002, Vo. 14, No. 4, 180–186.
- [106] TOPAZ O., *Holmium laser coronary thrombolysis – a new treatment modality for revascularization in acute myocardial infarction: review*, J. Clin. Laser Med. Surg., 1992, Vol. 10, No. 6, 427–431.

ROZDZIAŁ 8

BADANIA MIKROSKOPOWE W BIOMEDYCYNIE

**Marta Kopaczyńska, Joanna Pucińska,
Agnieszka Ulatowska-Jarża, Halina Podbielska**

Spis treści

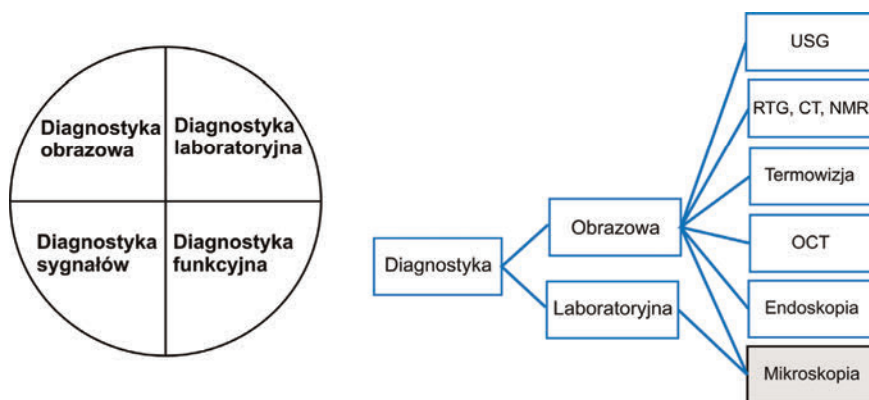
8.1. Wstęp	215
8.2. Mikroskopia optyczna	218
8.3. Badania mikroskopowe wykorzystujące zjawisko fluorescencji	224
8.3.1. Mikroskopia fluorescencyjna	224
8.3.2. Mikroskopia konfokalna	228
8.3.3. Mikroskopowe obrazowanie czasu zaniku fluorescencji (FLIM)	230
8.3.4. Mikroskopia rezonansowego transferu energii (FRET)	231
8.4. Mikroskopia elektronowa	234
8.4.1. Elektronowy mikroskop transmisyjny	235
8.4.2. Elektronowy mikroskop skaningowy (SEM)	236
8.5. Mikroskopia sond skanujących	238
8.5.1. Skaningowy mikroskop tunelowy (STM)	238
8.5.2. Mikroskop sił atomowych (AFM)	239
8.6. Zastosowanie technik mikroskopowych w medycynie	241

8.1. Wstęp

Postęp w medycynie dotyczy zarówno rozwoju nowych form terapii, jak i ulepszonej diagnostyki. Diagnostyka medyczna obejmuje badania komórek, tkanek, części organów lub badania całego organizmu. Badane są wycinki tkanki, płyny, wymazy, wydzieliny i wydaliny. We współczesnej medycynie mamy możliwości nie tylko zobrazowania poszczególnych struktur, ale i badania ich funkcji czyli np. analizy sygnałów EKG, EEG czy śledzenia metabolizmu, jak np. pozytonowej tomografii emisyjnej czy scyntygrafii. Historycznie rzecz ujmując, pierwotna diagnostyka medyczna polegała głównie na oglądaniu, ewentualnie wążaniu. Z czasem do arsenału metod

diagnostycznych doszło osłuchiwanie i opukiwanie. Dopiero w epoce Renesansu zaczęto konstruować przyrządy, które mogły ułatwić oglądanie (luneta Galileusza, szkła powiększające i pierwsze konstrukcje mikroskopów). Współczesna diagnostyka medyczna może być podzielona na cztery obszary (patrz rys. 8.1). Mikroskopia optyczna należy z jednej strony do metod diagnostyki obrazowej, z drugiej zaś strony wykorzystywana jest w diagnostyce laboratoryjnej. Badania mikroskopowe, podobnie jak endoskopowe [1] czy badania za pomocą optycznej tomografii koherentnej (OCT) [2] należą do metod optycznej diagnostyki medycznej.

Pierwsze mikroskopy optyczne pojawiły się w 16. wieku. Związane to było m.in. z rozwojem szkieł optycznych i konstrukcjami pierwszych teleskopów. Dużą rolę w rozwoju mikroskopii odegrali Hans Lippershey, Zachariasz Janssen i jego syn Hans. Pierwsze badania komórek krwi i mikroorganizmów wykonał Antoni van Leeuwenhoek, który udoskonalił konstrukcję mikroskopu i spopularyzował tę technikę badawczą. Kolejny postęp w technikach mikroskopowych nastąpił w latach trzydziestych 20. wieku, gdy pojawił się mikroskop elektronowy skonstruowany w Berlinie. Jego twórcami byli Ernst Ruska i Maks Knoll.



Rys. 8.1. Mikroskopia we współczesnej diagnostyce biomedycznej

Postępy w rozwoju mikroskopii otworzyły przed naukami biologicznymi i medycznymi zupełnie nowe perspektywy badawcze, przyczyniając się do ulepszenia technik badania i diagnostyki medycznej. Możliwe stały się nieinwazyjne i precyzyjne badania wnętrza komórek organizmów żywych. Istnieją różne techniki mikroskopowe, a ich podział może się odbywać według różnych kryteriów (patrz tab. 1). Mikroskopy można podzielić w zależności od tego, jakie źródło używane jest do obrazowania. Jeżeli jest to światło, to mówimy o mikroskopii optycznej. Jeżeli obrazowanie dokonuje się za pomocą wiązki elektronowej, to mamy do czynienia z mikroskopią elektronową. Obraz może być utworzony za pomocą wiązki, która przeszła przez badany obiekt (mikroskopia transmisyjna) lub została odbita od powierzchni obiektu (mikroskopia odbiciowa). Wiązka może też skanować badaną powierzchnię (mikroskopia skaningowa).

Tabela 1. Przykładowy podział technik mikroskopowych

Kryteria klasyfikacyjne	Techniki mikroskopowe
Rodzaj źródła wykorzystanego do obrazowania obiektów	<ul style="list-style-type: none"> – Mikroskopia optyczna – Mikroskopia jonowa – Mikroskopia elektronowe – Mikroskopia ultradźwiękowa
Metoda obrazowania	<ul style="list-style-type: none"> – Mikroskopia transmisyjna – Mikroskopia odbiciowa – Mikroskopia skaningowa – Mikroskopia holograficzna

Badanie mikroskopowe umożliwia uzyskiwanie różnych informacji np. na temat morfologii obiektu, powierzchni, składu chemicznego lub struktury krystalicznej, właściwości mechanicznych, magnetycznych lub elektrycznych (patrz tab. 2). W niniejszym rozdziale zostaną omówione niektóre wybrane techniki mikroskopowe.

Tabela 2. Przykładowy podział technik mikroskopowych

Technika mikroskopowa	Rodzaj mikroskopu
Mikroskopia optyczna	<ul style="list-style-type: none"> – Mikroskop świetlny – Mikroskop stereoskopowy – Mikroskop holograficzny – Mikroskop polaryzacyjny – Mikroskop kontrastu fazowego – Mikroskop jasnego i ciemnego pola
Mikroskopia fluorescencyjna	<ul style="list-style-type: none"> – Mikroskop konfokalny – Mikroskop fluorescencyjny kontrastu interferencyjnego (FLIC) – <i>Fluorescence Interference Contrast Microscope</i> – Mikroskop fluorescencyjny całkowitego wewnętrznej odbicia (TIRFM) – <i>Total Internal Reflection Fluorescence Microscope</i> – Mikroskop obrazowania czasu zaniku fluorescencji (FLIM) – <i>Fluorescence Lifetime Imaging Microscope</i> – Mikroskop rezonansowego transferu energii (FRET) – <i>Fluorescence Resonance Energy Transfer Microscope</i>
Mikroskopia elektronowa	<ul style="list-style-type: none"> – Elektronowy mikroskop transmisyjny (TEM) – <i>Transmission Electron Microscope</i> – Elektronowy mikroskop skaningowy (SEM) – <i>Scanning Electron Microscope</i>
Mikroskopia skaningowa	<ul style="list-style-type: none"> – Skaningowy mikroskop tunelowy (STM) – <i>Scanning Tunneling Microscope</i> – Mikroskop sił atomowych (AFM) – <i>Atomic Force Microscope</i> – Skanujący optyczny mikroskop bliskiego pola (SNOM) – <i>Near-field Scanning Optical Microscope</i>
Mikroskopia akustyczna (ultradźwiękowa)	<ul style="list-style-type: none"> – Skaningowy mikroskop akustyczny

8.2. Mikroskopia optyczna

Mikroskopia optyczna jest najpowszechniejszą metodą badań mikroskopowych, mającą szerokie zastosowanie w badaniach biologii komórki. Pozwala obserwować morfologię utrwalonych bądź żywych komórek, ich ruch oraz niektóre funkcje. Rozwój i ciągle udoskonalanie tej techniki pozwalają na obserwację coraz mniejszych obiektów, takich jak np. organelle komórkowe [3].

W mikroskopie świetlnym możemy badać mikroorganizmy, tkanki lub inne obiekty biologiczne w trybie transmisyjnym. W trybie tym wiązka światła oświetla badany obiekt z jednej strony, a obserwacja lub rejestracja ma miejsce z drugiej strony obiektu. Dokładna budowa mikroskopu optycznego opisana jest w wielu podręcznikach do optyki. Na uwagę zasługuje edukacyjna strona *National High Magnetic Field Laboratory (NHMFL)* na Florydzie [4]. Bardzo dobre i przejrzyste materiały edukacyjne oferują też firmy produkujące mikroskopy [np. 5, 6, 7]. Istnieje też podręcznik w języku polskim, wydany dość dawno, bo w 1982 roku, niemniej jednak opisane tam podstawy fizyczne działania mikroskopów nie straciły nic na aktualności [8].

Ważnym parametrem każdego układu optycznego jest zdolność rozdzielcza, czyli najmniejsza odległość dwóch punktów przedmiotu, które mogą być rozróżnione jako oddzielne. Zdolność rozdzielcza mikroskopu R zależy od długości fali światła oświetlającego preparat i jest do niej wprost proporcjonalna, a także od numerycznej apertury obiektywu (NA), do której jest odwrotnie proporcjonalna. Apertura numeryczna zależy od kąta aperturowego α i współczynnika załamania n środowiska przed obiektywem.

Apertura numeryczna obiektywu: $NA = n \sin \alpha$.

Zdolność rozdzielcza mikroskopu jest wprost proporcjonalna do długości fali, a odwrotnie proporcjonalna do apertury numerycznej.

W literaturze można spotkać się z różnymi wzorami na zdolność rozdzielczą mikroskopu: $R = \lambda/(2NA)$, $R = 0,61\lambda/NA$ lub $R = 1,22\lambda/(NA_{\text{obiektywu}} + NA_{\text{kondensora}})$. Ten ostatni wzór bierze pod uwagę również aperturę numeryczną kondensora. Parametr R jest przeważnie podawany przez producentów urządzeń mikroskopowych.

Innym parametrem odwzorowania mikroskopowego jest powiększenie. Powiększenie układu mikroskopowego jest iloczynem powiększenia obiektywu i okularu. Trzeba jednak pamiętać, że najważniejsze jest tzw. powiększenie użyteczne, czyli gwarantujące dobrą jakość obserwowanego/rejestrowanego obrazu, które zależy od apertury numerycznej mikroskopu. Zazwyczaj przyjmuje się, że powiększenie użyteczne UM (ang. *usefull magnification*) wynosi 500 do $1000 \times NA_{\text{obiektywu}}$. Mikroskopy optyczne osiągają maksymalne powiększenia około 1500 razy. Przykładowo obiektyw

o powiększeniu $100\times$ i aperturze numerycznej $NA_{\text{obiektywu}} = 1,42$ pozwala uzyskać powiększenie 1420 razy. Dobierając więc okular, powinno się pamiętać, że powiększenie okularu może być $10\times$ lub $12,5\times$, gdyż większe powiększenie i tak nie pozwoli na obserwację mniejszych szczegółów. W takim wypadku mówimy o tzw. powiększeniu pustym.

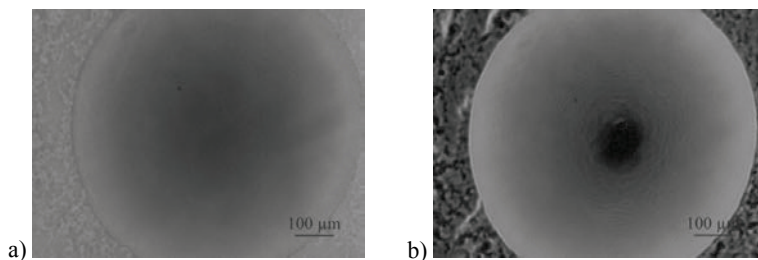
Powiększenie użyteczne mikroskopu = $500 \text{ do } 1000 \times NA_{\text{obiektywu}}$

Mikroskopy świetlne dają możliwość badań w polu jasnym i ciemnym, w zależności od sposobu oświetlenia obiektu. W przypadku obserwacji w polu jasnym widzimy ciemne szczegóły obiektu na jasnym tle (patrz rys. 8.2a). Natomiast w przypadku obserwacji w polu ciemnym (jasne szczegóły obiektu na ciemnym tle) można niektóre szczegóły bardziej uwidocznić (patrz rys. 8.2b). Omawiane tu obrazy są zdjęciami pojedynczej kolonii bakterii *Salmonella enteritidis*. W ciemnym polu widać dobrze środek kolonii, jak i strukturę podłoża, na którym bakterie rosły. W jasnym polu szczegóły są nierozróżnialne.

Obrazowanie w jasnym polu wykorzystuje światło wychodzące z kondensora do oświetlenia obiektu w trybie transmisyjnym. Ma zastosowanie do obiektów, które mają zabarwienie lub są w jakiś sposób barwione. Obrazowanie takie realizowane jest w każdym mikroskopie transmisyjnym.

W przypadku obiektów przezroczystych stosuje się obrazowanie w ciemnym polu. Najprostszym sposobem oświetlenia jest zasłonięcie ciemnym krążkiem centralnej części wiązki wychodzącej z kondensora. Tylko promieniowanie rozproszone dociera do okularu, promieniowanie przechodzące jest wycinane.

Można też oświetlać obiekt wiązką padającą pod kątem. Obrazowanie w ciemnym polu pozwala na wyróżnienie szczegółów niewidocznych w obrazowaniu w jasnym polu.



Rys. 8.2. Obrazy pojedynczej kolonii bakterii *Salmonella enteritidis* zarejestrowane za pomocą mikroskopu: a) jasnego pola, b) ciemnego pola (zdjęcia pochodzą z badań prowadzonych w Grupie Bio-Optyki, I. Buzalewicz, H. Podbielska)

Innym sposobem oświetlenia obiektu jest technika kontrastu fazowego, szczególnie przydatna w badaniach przyżyciowych, gdyż nie wymaga stosowania środków barwiących. Wynalazcą tej techniki był Frits Zernike, za co otrzymał w 1953 Nagrodę Nobla w fizyce. W klasycznym mikroskopie transmisyjnym fala oświetlająca nie zmienia swojej fazy przez przejściu przez obiekt. W mikroskopie z kontrastem fazowym w płaszczyźnie obrazu dyfrakcyjnego umieszcza się specjalną płytkę fazową, która pokrywa centralne maksimum dyfrakcyjne i zmienia fazę fali o $\pi/2$. Natomiast w kondensorze znajduje się sprzężony z nim przesłona pierścieniowa. W ten sposób poprawia się kontrast obrazowania (patrz rys. 8.3).



Rys. 8.3. Obraz zarejestrowany za pomocą mikroskopu z kontrastem fazowym. Przekrój poprzeczny soczewki kontaktowej; widać wyraźnie niejednorodności materiału (zdjęcia autorstwa I. Buzalewicz z badań prowadzonych w Grupie Bio-Optyki)

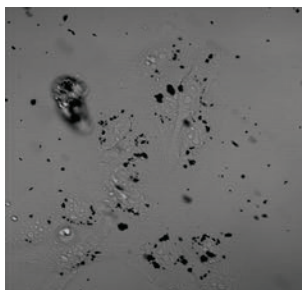
Zalety obrazowania w mikroskopie z kontrastem fazowym są następujące:

- możliwość obserwacji przezroczystych struktur, które zmieniają fazę światła i/lub nieznacznie je uginają, nie powodując jednocześnie spadku amplitudy promieniowania,
- brak konieczności barwienia preparatu,
- możliwość obserwacji organelli komórkowych, które nie są dostrzegalne w mikroskopie jasnego pola,
- możliwość obserwacji procesów życiowych komórki (np. ruch cytoplazmy lub endocytoza).

Dokładne informacje na temat podstaw fizycznych obrazowania mikroskopowego z kontrastem fazowym wraz z interaktywnymi pokazami można znaleźć na stronie internetowej *Molecular Expressions* [9].

Inną techniką poprawy kontrastu jest mikroskopia z kontrastem interferencyjnych (ang. *differential interference contrast* DIC) [10]. Mikroskop z kontrastem interferencyjnym posiada na drodze promieni świetlnych zmodyfikowane pryzmaty Wollastona tzw. pryzmaty Nomarskiego. Jeden znajduje się w układzie kondensora, a drugi pomiędzy obiektywem a okulem. Światło ze źródła światła przechodzi przez polaryzator, pada na pierwszy pryzmat, gdzie ulega podziałowi na dwie składowe, których kierunki drgań są do siebie prostopadłe i dzieli je niewielka różnica dróg optycznych,

następnie przechodzi przez kondensator, badany obiekt, gdzie różnica dróg optycznych jest większa, drugi pryzmat, analizator i trafia do okularu. Wtedy obie składowe interferują ze sobą, tworząc obraz. Szczegóły obiektu są odwzorowywane z wysokim kontrastem, sprawiają wrażenie trójwymiarowości (patrz rys. 8.4).



Rys. 8.4. Obraz zarejestrowany za pomocą mikroskopu z kontrastem interferencyjnym DIC. Światłoczułacz protoporfiryna PPIX w stężeniu 10 $\mu\text{g/ml}$ w komórkach HeLa po 12 h inkubacji. Technika DIC uwidoczniła nierozpuszczone frakcje PPIX (zdjęcie pochodzi z badań prowadzonych w Grupie Bio-Optyki, H. Podbielska, L. Czernielewski, M. Przybyło)

Mikroskopię optyczną wykorzystuje się z powodzeniem w diagnostyce krwi. W obrazie mikroskopowym żywej kropli krwi można ocenić liczbę, jakość i aktywność czerwonych krwinek (erytrocytów), aktywność systemu immunologicznego (limfocyty, granulocyty), obecność pleśni, grzybów, pasożytów, bakterii chorobotwórczych, jak również złogi: toksyczne, cholesterolowe, metali ciężkich, martwych krwinek, niestrawionych białek oraz cukrów. Rutynowym badaniem jest badanie tzw. rozmazu krwi celem oceny białych krwinek, ich liczebności i procentowego podziału na granulocyty, eozynofile, monocyty i limfocyty.

Można obserwować również preparaty mikrobiologiczne np. badać morfologię bakterii [11]. Jednak w celu uwidocznienia ich cech morfologicznych należy zastosować odpowiednie barwniki.

Mikroskopia optyczna jest też stosowana w patomorfologii do identyfikowania nieprawidłowych komórek, w tym komórek nowotworowych [12]. Podstawą charakterystyki mikroskopowej może być zarówno materiał histologiczny (skrawek pobranej tkanki), jak też materiał cytologiczny (komórki). Cytopatologia to metoda diagnostyczna, polegająca na badaniu pod mikroskopem świetlnym komórek pobranych przyżyciowo. Ocena mikroskopowa polega na analizie składu komórkowego preparatu, szczegółów cytologicznych poszczególnych komórek, sposobu grupowania się komórek (płaty, gniazda, komórki rozproszone etc.) oraz tzw. „tła” preparatu (bakterie, składniki nieupostaciowane, wydzielina białkowa). Badanie cytopatologiczne jest wykorzystywane zwłaszcza w diagnostyce wczesnych postaci chorób nowotworowych, a także w ocenie zaburzeń hormonalnych oraz w monitorowaniu postępu leczenia. W przypadkach wątpliwych, ocena cytopatologiczna powinna być potwierdzona

badaniem histopatologicznym, które umożliwia ocenę większej liczby szczegółów obrazu mikroskopowego. Bada się np. wymazy z błon śluzowych (np. jamy ustnej, szyjki macicy, gardła i innych) lub części tkanek pobrane za pomocą biopsji. Po pozyskaniu materiał cytologiczny umieszcza się na szkiełku mikroskopowym, poddaje barwieniu i utrwaleniu. W wyniku skomplikowanej procedury komórki warstw powierzchniowych barwią się na kolor różowo-czerwony, a komórki warstw pośrednich zielono-niebieski. Jądra komórkowe barwią się hematoksyliną na kolor fioletowo-niebieski, erytrocyty są czerwone, leukocyty mają ciemno barwiące się hematoksyliną jądra i zielonkawą cytoplazmę. O komórkach barwiących się na czerwono mówimy, że są eozynochłonne, a o przyjmujących barwę zielono-niebieską – cyjanochłonne.

Mikroskopia optyczna jest bardzo ważną techniką badawczą, wykorzystywaną między innymi w badaniach żywych komórek [13]. Niestety nie pozwala na obrazowanie struktur komórkowych, takich jak rybosomy czy pojedyncze cząsteczki białek.

W badaniach biologicznych i medycznych korzysta się najczęściej z mikroskopii transmisyjnej, obserwując światło przechodzące przez badany obiekt. Większość składników komórkowych jest przezroczysta, pojawia się więc problem detekcji niewielkich różnic w natężeniu przechodzącego światła. W 19. wieku zaobserwowano, że niektóre barwniki mają zdolność wybiórczego oddziaływania z wybranymi składnikami komórki, takimi jak kwasy nukleinowe (DNA i RNA), lipidy, białka itp. Na tej podstawie opracowano procedury wybarwiania preparatów, pozwalające na uwidocznienie ważnych elementów i struktur komórki.

Obecnie standardowe procedury wybarwiania opierają się na kombinacji barwników, co prowadzi do wizualizacji wielu składników komórkowych w obrębie jednego preparatu. Stosowane barwniki wewnątrzkomórkowe muszą spełniać następujące wymagania:

- zdolność przenikania do wnętrza komórki,
- selektywne wiązanie się z określonymi elementami komórki,
- odporność na warunki panujące w środowisku, głównie pH,
- absorpcja światła pozwalająca na identyfikację wybarwianych struktur.

Barwniki stosowane w mikrobiologii można podzielić na:

- zasadowe – np. fiolet krystaliczny, gencja, fiolet metylenowy, fuksyna, błękit metylenowy, zieleń malachitowa,
- kwaśne – np. eozyna, erytrozyna, barwnik Kongo.

W przypadku komórek i tkanek organizmów eukariotycznych najczęściej stosuje się barwienie niebieską hematoksyliną, barwiącą kwasowe struktury komórek, takie jak jądro, czy rybosomy i czerwoną eozyną, wybarwiającą struktury bazofilowe, jak cytoplazma czy włókna kolagenowe. Szczególnym rodzajem barwienia jest barwienie metachromatyczne, polegające na tym, iż barwione struktury zostają zabarwione innym kolorem, niż kolor barwnika użytego do barwienia. Do barwienia metachromatycznego używa się np. błękitu toluidyny, który daje różowo-fioletowe zabarwienie struktur. Poniżej zaprezentowano najważniejsze metody barwienia stosowane w badaniach komórek do uwidaczniania wybranych grup związków chemicznych (patrz tab. 3).

Tabela 3. Sposoby barwienia wybranych związków chemicznych występujących w komórkach

Identyfikowany związek	Reakcja
Kwasy nukleinowe	DNA – reakcja Feulgena, RNA – reakcja Bracheta
Tłuszcze	Dyfuzja barwników słabo lub nierozpuszczalnych w wodzie, takich jak czerń sudanowa, Sudan IV
Wielocukry	Reakcja PAS (<i>Periodic acid-Schiff staining</i>)
Enzymy	Różne reakcje zależne od enzymu

Reakcja Feulgena pozwala na selektywne barwienie kwasu nukleinowego DNA. Metoda ta jest oparta na hydrolizie kwasowej DNA oraz zastosowaniu odczynnika Schiffa (wodny roztwór fuksyny nasycony tlenkiem siarki(IV)), w wyniku czego materiał genetyczny barwi się na czerwono.

Reakcja Bracheta stosowana jest do różnicowego wykrywania DNA i RNA w tym samym materiale za pomocą mieszaniny zieleni metylenowej (dla kwasu deoksyrybonukleinowego – DNA) i pironiny (dla kwasu rybonukleinowego – RNA). Efektem tej reakcji jest zabarwienie się RNA na kolor czerwony i DNA na kolor zielono-fioletowy.

Reakcja PAS pozwala na wykrywanie w preparatach histochemicznych monosacharydów, polisacharydów i mukopolisacharydów. Stosuje się w tym przypadku mieszaninę barwników: kwas jodowy(VII) i odczynnik Schiffa.

Mikroskopia optyczna jest też wykorzystywana w badaniach mikrobiologicznych do identyfikacji bakterii. Często stosuje się barwienie metodą Grama, pozwalające na odróżnienie bakterii tzw. Gram-dodatnich od Gram-ujemnych (posiadających dodatkową barierę – błonę zewnętrzną). W procesie barwienia Grama utrwalone komórki barwi się ciemnym barwnikiem – fioletem krystalicznym. Następnie dodaje się związki jodu (np. płyn Lugola – wodny 1% roztwór jodu i 2% jodku potasu), które wewnątrz komórki tworzą kompleks z barwnikiem. Na tym etapie obydwie typy komórek mają zabarwienie granatowe. Płukanie w alkoholu powoduje, że w komórkach Gram-dodatnich następuje zmniejszenie pustej przestrzeni w wielowarstwowych ścianach komórkowych. W rezultacie kompleksy fioletu krystalicznego z jodem nie mogą ulec wypłukaniu, co w przypadku 1–2 warstw u bakterii Gram-ujemnych nie jest przeszkodą i alkohol świetnie wypłukuje barwnik. Po zakończonym płukaniu komórki Gram-dodatnie są granatowe, zaś Gram-ujemne – bezbarwne. Dodatkowy barwnik (np. safranina, fuksyna) niezbyt mocno dobarwia komórki Gram-ujemne, nie zmieniając barwy komórek Gram-dodatnich.

Do barwienia preparatów bakteryjnych stosuje się również metodę Ziehla-Neelsena. Jest to rodzaj metody diagnostycznej służącej do odróżniania bakterii kwasoopornych i niekwasoopornych, co jest wykorzystywane w diagnostyce gruźlicy. Kwasooporność np. prątków jest zależna od budowy fizykochemicznej i obecności kwasu mikołowego. Metodą tą można też barwić zarodniki grzybów i przetrwalniki bakterii. Na utrwalone rozmazy bakterii nanosi się barwnik podstawowy – fuksynę. Następnie barwnik spłukuje się wodą destylowaną oraz odbarwia się w 3% roztworze

kwasu solnego w alkoholu etylowym (tzw. kwaśny alkohol) i ponownie spłukuje wodą destylowaną. Następnie nanosi się barwnik kontrastowy np. błękit metylenowy. W wyniku takiego postępowania bakterie kwasooporne przybierają kolor czerwony, pochodzący od fuksyny (nie odbarwiają się one bowiem w kwaśnym alkoholu). Natomiast bakterie niekwasooporne są wrażliwe na działanie kwaśnego alkoholu, odbarwiają się w nim z fuksyny i mają kolor niebieski, pochodzący od błękitu metylenowego.

Czołowi producenci mikroskopów oferują wysokiej jakości mikroskopy biologiczne, przemysłowe, stereoskopowe. Większość mikroskopów wyposażona jest w systemy cyfrowego zapisu obrazu i analizy otrzymanych danych. Producentami mikroskopów optycznych są m.in. firmy: Nikon, Olympus, Zeiss oraz Leica [14, 15, 16, 17]. Specjalne binokularne mikroskopy chirurgiczne dają możliwość prowadzenia zabiegów z zakresu mikrochirurgii np. w chirurgii naczyniowej, w okulistyce, w stomatologii, otolaryngologii czy neurochirurgii.

W ostatnich latach duże zainteresowania wzbudza telemikroskopia, czyli możliwość przesyłania obrazów mikroskopowych do innych centrów badawczych celem konsultacji. Transmisja odbywa się za pomocą internetu lub telefonu komórkowego. W 2010 roku za pomysł połączenia mikroskopu z telefonem komórkowym nagrodę firmy *Nokia Health Award* zdobył Daniel Fletcher z Uniwersytetu Berkeley w Kalifornii [18]. Na uwagę zasługuje też zautomatyzowany mikroskop fluorescencyjny COOLSCOPE firmy Nikon, który również umożliwia szybkie przesyłanie danych obrazowych. COOLSCOPE posiada najwyższej jakości optykę o możliwość cyfrowej rejestracji obrazu, a wyniki badań obrazowane są bezpośrednio na wysokiej rozdzielczości monitorze [19].

8.3. Badania mikroskopowe wykorzystujące zjawisko fluorescencji

8.3.1. Mikroskopia fluorescencyjna

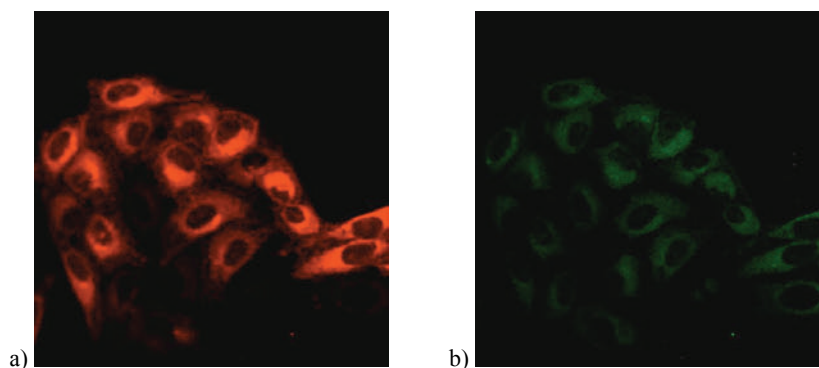
Mikroskop fluorescencyjny to mikroskop świetlny, wykorzystujący zjawisko fluorescencji. Może być stosowany w badaniach zarówno substancji organicznych, jak i nieorganicznych. Większość używanych mikroskopów fluorescencyjnych to mikroskopy tzw. epi-fluorescencyjne. Oznacza to, że wzbudzenie próbki fala światła, jak i obserwacja fali wzbudzonej zachodzą z tej samej strony próbki.

W wielu substancjach organicznych występuje zjawisko fotoluminescencji, które polega na wzbudzeniu promieniowaniem świetlnym elektronów w atomach do wyższych poziomów energetycznych, a następnie powrotu wzbudzonych elektronów do stanu podstawowego z równoczesną emisją światła. Długość fali promieniowania (wyemitowanego światła) jest dłuższa od długości fali zaabsorbowanej. W zjawisku

luminescencji wyróżniamy dwa rodzaje przejść: promieniste i bezpromieniste. Jednym z przejść promienistych jest fluorescencja, która zachodzi wtedy, gdy emisja promieniowania kończy się jednocześnie z zanikiem wzbudzenia. Drugim rodzajem przejść promienistych jest fosforescencja, która charakteryzuje się dłuższym czasem emisji promieniowania po zakończeniu wzbudzenia. Zjawiska te zostały dokładniej opisane w tej książce w rozdziale 3. *Podstawy fotofizyki* i 4. *Podstawowe pojęcia fotochemii i fotobiologii*.

Fluorescencja ma miejsce wtedy, gdy po zaniku czynnika pobudzającego następuje szybki zanik emisji w czasie około 10^{-8} s. Gdy czas zaniku jest znacznie dłuższy, to mamy do czynienia z **fosforescencją**.

Technika mikroskopii fluorescencyjnej opiera się na pomiarze fluorescencji związków chemicznych (tzw. barwników fluorescencyjnych), wiążących się z pewnymi typami komórek, strukturami subkomórkowymi lub grupami chemicznymi. Za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej można badać też rozkład niektórych związków, np. fotouczulaczy w komórkach (patrz rys. 8.5).



Rys. 8.5. Obraz zarejestrowany za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego.

Światłouczulacz protoporfiryna PPIX w stężeniu $10 \mu\text{g/ml}$ zamknięta w liposomach w komórkach HeLa po 12 h inkubacji. Po lewej: wzbudzenie falą 405 nm , po prawej: 488 nm (zdjęcia pochodzą z badań prowadzonych w Grupie Bio-Optyki, H. Podbielska, L. Czernielewski, M. Przybyło)

Niektóre związki chemiczne zawarte w komórkach są zdolne do fluorescencji pierwotnej czyli autofluorescencji, np. chlorofil. W wielu przypadkach konieczne jest jednak wprowadzenie do komórki barwników zewnętrznych, zwanych fluorochromami, chromoforami lub barwnikami fluorescencyjnymi.

Fluorochromy to substancje mające zdolność do fluorescencji, a dzięki ich powinowactwu do określonych związków obecnych w badanym materiale, pozwalają na ich wizualizację (np. oranż akrydynowy, który tworzy specyficzne kompleksy z kwasami nukleinowymi). Metoda fluorescencji jest na tyle czuła, że pozwala na wykrycie

i dokonanie ilościowego pomiaru bardzo niewielkich ilości substancji. Rolę fluorochromów mogą spełniać np. znakowane przeciwciała (immunofluorescencja) stosowane w cytochemii i diagnostyce klinicznej.

Barwa emitowanego światła zależy od właściwości substancji fluoryzującej. Barwniki emitują głównie światło widzialne, chociaż istnieją też takie barwniki, które mogą emitować światło podczerwone np. Cy5 (Cy – *cyjanina*) lub Cy7. W zależności od długości fali emisji, powszechnie używane barwniki emitują światło:

- zielone: Cy2, fluoresceina (wzbudzana światłem niebieskim),
- czerwone: rodamina (wzbudzana światłem zielono-żółtym) (patrz rys. 8.6a),
- podczerwone: Cy5, Cy7, (używane głównie do znakowania przeciwciał)
- żółte: Cy3,
- niebieskie: DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol), absorbuje UV, fluoryzuje na jasnoniebiesko, tworzy fluorescencyjne kompleksy z sekwencjami bogatymi w pary AT (adenina-tymina) w podwójnym łańcuchu DNA, stabilny barwnik DNA, zwłaszcza w utrwalonych komórkach) (patrz rys. 8.6b),
- oranż akrydyny (selektywny, niespecyficzny barwnik DNA i RNA); zielona fluorescencja DNA, czerwona RNA; intensywność zabarwienia zależy od stężenia barwnika. Oranż akrydyny przyłączony do DNA jest monomeryczną wytrąconą formą, a przyłączony do RNA jest kompleksem złożonym z polimerów barwnika oraz RNA).

Dobór barwnika fluorescencyjnego do obrazowania w mikroskopie fluorescencyjnym zależy od struktury, którą chcemy uwidocznić, a także od źródła wzbudzającego, którym dysponujemy (przykładowe barwniki – patrz tab. 4).

Tabela 4. Długości fali maksymalnej absorpcji i emisji wybranych barwników fluorescencyjnych

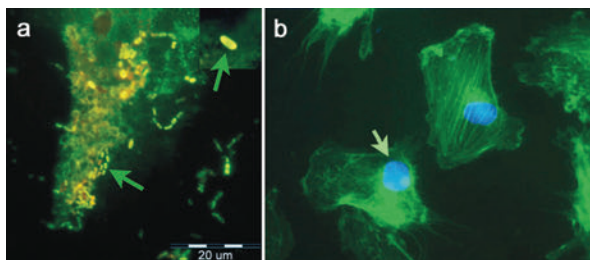
Barwnik	Maksimum absorpcji (nm)	Maksimum emisji (nm)
Rodamina 123	485	530
DAPI	344	449
Oranż akrydyny	440 (dla DNA)	520 (dla DNA)
	480 (dla RNA)	650 (dla RNA)

W mikroskopii fluorescencyjnej stosowane są również białka, najczęściej pochodzące od drobnych żyjątek morskich, wykazujące zdolność do fluorescencji:

- na kolor zielony – GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*),
- na kolor zielono-niebieski – CFP (ang. *Cyan Fluorescent Protein*),
- na kolor żółty – YFP (ang. *Yellow Fluorescent Protein*),
- na kolor czerwony – RFP (ang. *Red Fluorescent Protein*),
- na kolor niebieski – BFP (ang. *Blue Fluorescent Protein*).

W technikach wybiórczego wybarwienia konkretnych makrocząsteczek stosuje się prawie wyłącznie barwniki fluorescencyjne, a nie klasyczne barwniki absorpcyjne. Natężenie i barwa fluorescencji mogą zależeć od warunków panujących w środowi-

sku: pH, potencjał redox, lipofilowość, potencjał błonowy. Pozwala to zróżnicować komórki lub ich elementy ze względu na panujące w nich warunki.



Rys. 8.6. Obrazy zarejestrowane za pomocą mikroskopu fluorescencyjnego: a) komórka nabłonka jelita zakażona pałeczkami *Escherichia coli* (bakterie zaznaczono strzałką) po zabarwieniu oranżem akrydyny.

Bakterie zlokalizowane wewnątrzkomórkowo barwią się na kolor od zielonego do żółtego.

Technika takiego barwienia umożliwia odróżnienie bakterii wewnątrzkomórkowych od zewnątrzkomórkowych. Bakterie zewnątrzkomórkowe (przyczepione do powierzchni komórki) są niewidoczne, gdyż zastosowany fiolet krystaliczny wygasza fluorescencję oranżu akrydyny związanego z bakteriami na zewnątrz komórki, b) komórki śródbłonka zabarwione izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) i DAPI. DAPI barwi DNA na niebiesko (strzałka), natomiast FITC wybarwia włókna aktyny na kolor zielony (zdjęcia dzięki uprzejmości dr hab. Beaty Sobieszkańskiej z Katedry Mikrobiologii Akademii Medycznej we Wrocławiu)

Szczególnie interesujące dane o lokalizacji poszczególnych struktur komórkowych lub ich składników uzyskuje się, stosując barwniki fluorescencyjne połączone za pomocą wiązań kowalencyjnych z przeciwciałami monoklonalnymi (przeciwciała fluororyzujące). Wysoka specyficzność przeciwciał pozwala identyfikować w komórce lub tkance nawet pojedyncze cząsteczki białek. Obrazy mikroskopowe uzyskane dzięki wybarwieniu przy pomocy mieszaniny kilku przeciwciał o różnej selektywności i różnej barwie fluorescencji, pozwalają na uzyskanie wielu ważnych informacji. Dzięki takim obrazom można wykryć wzajemne relacje pomiędzy rozmieszczeniem różnych organelli i składników komórki.

Stosowane są dwa rodzaje przeciwciał: przeciwciała I i II rzędu. Przeciwciała I rzędu, to typowe przeciwciała monoklonalne o dużej selektywności, rozpoznające określone przeciwciała wybarwianej komórki. Przeciwciała takie można uzyskać z komórek immunologicznie kompetentnych, pochodzących od różnych zwierząt. Przeciwciała II rzędu związane są z barwnikami fluorescencyjnymi i rozpoznają przeciwciała zawierające antygeny specyficzne dla poszczególnych gatunków zwierząt.

Mikroskopia fluorescencyjna jest szeroko stosowana w biologii i medycynie przede wszystkim do obrazowania żywych obiektów biologicznych [20, 21]. Z powodzeniem jest wykorzystywana również do zliczania ilości komórek, identyfikacji obiektów biologicznych, obserwacji struktur powierzchni obiektu, badań zmian wewnątrzkomórkowego stężenia jonów (np. Ca^{2+} , H^+), diagnostyki chorób genetycznych oraz znakowania organelli i badań lokalizacji białek.

Mikroskopia fluorescencyjna jest jedną z zaawansowanych metod optycznego diagnozowania nowotworów [22]. Metoda jest stosowana do obrazowania i lokalizacji komórek rakowych w badanym preparacie [23, 24], jak również do monitoringu transportu leków przeciwnowotworowych w komórkach [25].

Mikroskopia fluorescencyjna może pomóc w badaniu sposobów leczenia różnych chorób. Niektóre leki są fluorochromami, a więc można określić miejsce ich kumulacji w komórce za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej. Przykładem takich leków są np. preparaty stosowane u chorych na schizofrenię – wywołują one wiele efektów ubocznych, nawet zagrażających życiu. Aby określić miejsca kumulacji toksycznych substancji w komórce, poddano fibroblasty działaniu różnych leków psychotropowych. Za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej odkryto, że leki wnikają do komórek i kumulują się w organellach komórkowych oraz aparacie Golgiego. Opublikowano również wyniki prac dotyczących dystrybucji leków przeciwnowotworowych w komórkach. Dzięki badaniom za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej możliwa była obserwacja transportu cis-platyny do wnętrza komórki [26].

Do czołowych producentów mikroskopów fluorescencyjnych można zaliczyć firmy, takie jak Nikon, Olympus, Leica, Zeiss [14, 15, 16, 17].

8.3.2. Mikroskopia konfokalna

Mikroskopia konfokalna jest techniką obrazowania, umożliwiającą osiągnięcie wysokiej rozdzielczości i kontrastu rejestrowanego obrazu mikroskopowego w różnych płaszczyznach przekroju preparatu [27, 28]. Do oświetlenia (wzbudzenia fluorescencji) najczęściej stosuje się wiązki laserowe. Idea obrazowania polega na punktowym oświetleniu badanego preparatu. Światło jest ogniskowane w jednym punkcie na określonej głębokości preparatu, a konstrukcja przesłony w detektorze sprawia, że zobrazowana zostaje fluorescencja emitowana dokładnie z miejsca ogniskowania. Promień lasera określonej długości fali skanuje preparat wzdłuż osi x i y w warstwie leżącej na głębokości z . Promień lasera automatycznie może skanować preparaty nawet o grubości do około $50\ \mu\text{m}$, w odstępach co $0,5\ \mu\text{m}$. Następnie serie otrzymanych obrazów są składane w jeden trójwymiarowy obraz konfokalny za pomocą specjalnych algorytmów i specjalistycznego oprogramowania komputerowego. W zależności od konfiguracji mikroskopy konfokalne mogą być transmisyjne lub odbiciowe. Do największych na świecie producentów mikroskopów konfokalnych zaliczyć można światowe firmy Nikon, Olympus oraz Zeiss [14, 15, 16].

Zdolność rozdzielcza, podobnie jak w innych rodzajach mikroskopów jest ograniczona przez dyfrakcję światła na przedmiocie. W porównaniu do mikroskopii fluorescencyjnej badanie za pomocą mikroskopii konfokalnej umożliwi osiągnięcie lepszego kontrastu i rozdzielczości [29]. Zasada pracy mikroskopu, wpływ wielkości przesłony (pinhol) i prędkości skanowania na jakość obrazu są dobrze zilustrowane w interaktyw-

nym wykładzie firmy Nikon [30]. Wiele ciekawych informacji odnośnie mikroskopii konfokalnej można też znaleźć na stronie Uniwersytetu w Arizonie USA (*Cellular Imaging Facility Core*) [31]. Typowe mikroskopy konfokalne mogą zarejestrować obraz pojedynczego punktu w czasie ok. 0,1–1 s. Rejestracja obrazów w płaszczyźnie x, y dość czasochłonna, wymaga dłuższej ekspozycji, co w konsekwencji może to doprowadzić do tzw. fotowysbielenia (ang. *photobleaching*).

Źródła promieniowania laserowego o dobranych długościach fali światła wzbudzającego mogą inicjować fluorescencję kilku typów fluorochromów, dzięki temu można rejestrować wielobarwny obraz preparatu [32].

Stosowane obecnie mikroskopy konfokalne to mikroskopy skanujące lub mikroskopy z wirującym dyskiem:

- skanujące laserowe mikroskopy konfokalne (ang. *Scanning Laser Confocal Microscopes*), dające obrazy najlepszej jakości, ale charakteryzujące się długim czasem obrazowania [33],
- mikroskopy konfokalne z wirującym dyskiem (ang. *Spinning-disk Confocal Microscopes*), pozwalające na bardzo szybkie zbieranie obrazów, co daje możliwość montowania sekwencji filmowych [34].

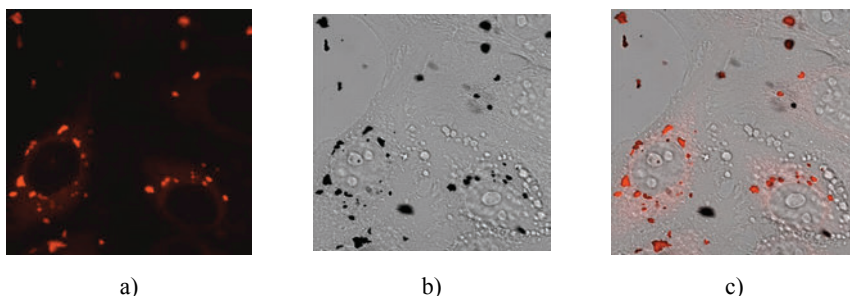
Mikroskopia konfokalna znalazła szczególne zastosowanie w naukach biomedycznych. Dzięki wyjątkowo wysokiej rozdzielczości optycznej i możliwości badania preparatów o znacznej grubości, możliwe jest obserwowanie lokalizacji poszczególnych składników komórek i odtwarzanie ich struktury trójwymiarowej na utrwalonych preparatach, a także przeprowadzenie wielu obserwacji żywych komórek. Większość mikroskopów posiada również możliwości poprawy jakości obrazów, np. za pomocą kontrastu interferencyjnego i nakładania obrazów fluorescencyjnych na obrazu rejestrowane w kontraście interferencyjnym DIC (patrz rys. 8.7).

W medycynie mikroskopia konfokalna z powodzeniem jest stosowana w okulistyce oraz dermatologii. W okulistyce służy do diagnozowania schorzeń rogówki [35, 36]. Badanie to pozwala na monitorowanie postępu leczenia oraz procesów gojenia się rogówki. Natomiast w dermatologii mikroskopia konfokalna jest nieinwazyjną techniką diagnostyczną, umożliwiającą obrazowanie naskórka oraz górnych warstw skóry właściwej. Znajduje coraz szersze zastosowanie w diagnostyce łagodnych i złośliwych nowotworów skóry [37].

Jedną z odmian mikroskopii konfokalnej jest mikroskopia konfokalna wielofotonna, gdzie wzbudzenie substancji światłoczułej dokonuje się za pomocą np. dwóch niskoenergetycznych fotonów, docierających do próbki w odstępach około 10^{-16} s. Zaletą takiego systemu jest to, że do wzbudzenia potrzebne są dwa fotony, ale o mniejszej energii, czyli możliwe jest stosowanie światła podczerwonego, które, jak wiadomo, jest mniej rozpraszane w tkance [38].

Należy również zwrócić uwagę na konfokalną endoskopię laserową – połączenie laserowego mikroskopu konfokalnego z konwencjonalnym wideoendoskopem. Jest to wspólne przedsięwzięcie firm Pentax Tokio, Japonia i firmy Optiscan, Notting Hill,

Australia. Środki kontrastowe stosowane w tym rozwiązaniu to np. fluoresceina, trypaflawina, tetracyklina lub fiolet krezolu. Laserowy endoskop konfokalny może być wykorzystywany w diagnostyce zmian patologicznych układu pokarmowego, np. do diagnostyki nowotworów jelita grubego i okrężnicy [39, 40].



Rys. 8.7. Obraz zarejestrowany za pomocą mikroskopu konfokalnego Carl Zeiss Confocor 3. Światłouczulacz protoporfiryna PPIX w stężeniu 10 μ g/ml w komórkach HeLa po 12 h inkubacji; a) obraz fluorescencyjny, b) obraz z kontrastem interferencyjnym DIC, c) nałożenie obrazów a) i b).
Na obrazach widoczna lokalizacja związku (zdjęcia pochodzą z badań prowadzonych w Grupie Bio-Optyki, H. Podbielska, L. Czernielewski, M. Przybyło)

Jednym z ciekawych osiągnięć techniki jest konfokalna światłowodowa mikroskopia fluorescencyjna (ang. *Fibred Confocal Fluorescence Microscopy* FCFM), która umożliwia tzw. biopsję optyczną czyli ocenę tkanek bez konieczności pobierania wycinków. Technika ta jest stosowana m.in. do oceny tkanki nabłonkowej w drogach oddechowych o średnicy światła 2–3 mm [41].

8.3.3. Mikroskopowe obrazowanie czasu zaniku fluorescencji (FLIM)

Kolejną metodą mikroskopii fluorescencyjnej jest rejestracja obrazów czasowego zaniku fluorescencji FLIM (ang. *Fluorescence-Lifetime Imaging Microscopy*). Natężenie promieniowania fluorescencyjnego I jest zależne od czasu t w sposób następujący [42]:

$$I(t) = I_0 \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right), \quad (1)$$

gdzie I_0 oznacza początkowe natężenie emitowanego promieniowania (w czasie $t = 0$), a τ odpowiada czasowi zaniku fluorescencji. Ponieważ czas zaniku fluorescencji τ jest charakterystyczny dla danego związku fluoryzującego, parametr ten wykorzystuje się do rozróżnienia poszczególnych barwników, a co za tym idzie struktur, w których te barwniki się znajdują.

Dzięki pomiarowi czasu zaniku fluorescencji (a nie jej natężenia) z poszczególnych obszarów próbki można uzyskać wyraźny obraz badanej struktury biologicznej [43]. W celu uzyskania obrazu FLIM, wzbudza się fluorescencję chromoforów za pomocą promieniowania laserowego (mogą to być chromofory występujące naturalnie w tkankach, jak i wprowadzone z zewnątrz). Następnie mierzy się czas zaniku fluorescencji. Próbkowanie sygnału musi zachodzić w odstępach czasowych rzędu pikosekund, ponieważ czas zaniku fluorescencji wynosi zwykle od 1 do 100 ns.

W odróżnieniu do metod bazujących na pomiarze natężenia fluorescencji, pomiar czasu życia pozwala uzyskać obrazy niezaburzone przez lokalne zmiany drogi optycznej czy różnice stężenia chromoforów [44]. Jest to szczególnie ważne w przypadku obrazowania żywych komórek. Jednak z drugiej strony trzeba pamiętać, że na czas życia fluorescencji silnie wpływa środowisko, w którym znajduje się dany fluorofor.

Mikroskopię FLIM wykorzystuje się do badania lokalnych zmian pH, lepkości, polarności czy hydrofobowości. Obecność tlenu powoduje wygaszanie fluorescencji, dzięki temu technika FLIM może posłużyć do obrazowania lokalnych zmian stężenia tlenu w badanych preparacie biologicznym [45]. Ponadto dzięki wykorzystaniu fluoroforów o czasach życia wrażliwych na obecność jonów (np. Ca^{2+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , H^+ , lub Cl^-), metoda FLIM umożliwia badanie rozkładu stężenia jonów w badanej próbce.

W mikroskopach FLIM źródłem światła są lasery impulsowe. Najczęściej są to pikosekundowe lasery półprzewodnikowe, które pozwalają emitować światło w dość dużym zakresie długości fal, np. 375–510 nm. Przykładowe parametry pracy lasera to częstotliwość 40 MHz, czas trwania impulsu 50 ps [46]. Do rejestracji sygnału fluorescencyjnego próbki wykorzystuje się specjalne, zdolne wykryć pojedyncze fotony, ultraszybkie fotodetektory (np. firma PicoQuant, Lambert Instruments, 3i) lub kamery smugowe (np. firma Hamamatsu).

8.3.4. Mikroskopia rezonansowego transferu energii (FRET)

Rezonansowy transfer energii Förstera FRET (ang. *Förster Resonance Energy Transfer*) polega na bezpromienistym przekazaniu energii od wzbudzonej cząsteczki chromoforu, zwanego donorem D, do innego chromoforu, zwanego akceptorem A [47, 48]. Wydajność FRET EFRET zależy od odległości, jaka dzieli donor i akceptor r zgodnie ze wzorem:

$$E_{FRET} = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6}, \quad (2)$$

gdzie R_0 oznacza tzw. promień Förstera (ang. *Förster radius*), czyli odległość, na której tylko 50% energii wzbudzonego donora jest bezpromieniście przekazywane akceptorowi, zwykle jest to dystans od 3 do 6 nm.

Wartość promienia Förstera R_0 zależy od wzajemnej orientacji dipoli chromoforów, od kwantowej wydajności fluorescencji donora przy braku akceptora, od współczynnika załamania ośrodka oraz od wielkości obszaru nakładania się widma znormalizowanej fluorescencji donora na widmo absorpcyjne akceptora. Wartość R_0 może być wyznaczona dla dowolnej pary donor–akceptor znajdującej się w danym środowisku [49].

Rezonansowy transfer energii między dwoma chromoforami zachodzi tylko wówczas, gdy odległość między cząsteczką donora i akceptora zawiera się w przedziale od 1 do 10 nm, a widmo emisyjne donora przynajmniej częściowo nakłada się na widmo absorpcyjne akceptora. Ze względu na zależność łączącą wydajność rezonansowego transferu energii ze wzajemną odległością donor–akceptor (wzór 2), metoda FRET jest precyzyjną techniką obrazowania zmian położenia chromoforów. Wrażliwość na zmiany odległości donor–akceptor, pozwala na wykorzystanie mikroskopii FRET do monitorowania reakcji biochemicznych (np. formowania się kompleksów białkowych), badania zmian konformacyjnych biomolekuł, śledzenia ruchów białek oraz lokalizacji określonych struktur w żywych komórkach [50]. Ciekawym zastosowaniem techniki FRET jest określenie separacji fazowej w dwuwariantach lipidowych [51].

W celu monitorowania formowania się dwucząsteczkowych kompleksów białek, jedną z biocząsteczek znakuje się donorem, a drugą akceptorem. Jeżeli obserwowane cząsteczki zbliżą się na odległość 1–10 nm, między wzbudzonym donorem a akceptorem zachodzi transfer energii, wobec czego obserwuje się wzrost natężenia sygnału fluorescencji akceptora kosztem fluorescencji donora.

W przypadku badania zmian konformacyjnych, odpowiednimi chromoforami oznaczają się określone obszary białka. Następnie wzbudza się donor i mierzy odpowiedź fluorescencyjną układu. Jeżeli na skutek skręcenia lub zgięcia oznakowanego białka dojdzie do zmiany odległości między parą donor–akceptor lub do zmiany wzajemnej orientacji dipoli chromoforów, obserwuje się zmiany sygnału fluorescencji.

Mikroskopia FRET pozwala na monitorowanie oddziaływań między białkami. Na przykład można stwierdzić czy białka występujące w mitochondrium, tracą wzajemne powinowactwo w miarę postępowania apoptozy. Znakując jedno białko oznakowano donorem np. niebieskim białkiem fluoryzującym BFP (ang. *Blue Fluorescent Protein*), a drugie akceptorem – zielonym białkiem fluoryzującym GFP (ang. *Green Fluorescent Protein*), można obserwować zmianę kompleksu w czasie [52].

W technice FRET najczęściej wykorzystuje się zielone białko fluoryzujące GFP i jego pochodne, które emitują światło niebieskie BFP, cyjanowe CFP (ang. *Cyan Fluorescent Protein*), żółte YFP (ang. *Yellow Fluorescent Protein*) i czerwone RFP (ang. *Red Fluorescent Protein*). W technikach bazujących na FRET zastosowanie znalazły również barwniki cyjaninowe (np. Cy 2, Cy 3, Cy 5, Cy 5.5).

Promień Förstera jest charakterystyczny dla danej pary donor–akceptor. Przykładowo wartość R_0 dla pary wzmocnione zielone białko fluoryzujące EGFP (D) – barwnik Alexa Fluor 546 (A) wynosi 5,7 nm, a dla pary fikoerytryna (D) – cyjanina Cy5 (A) wynosi 7,2 nm. Dzięki temu, dobierając odpowiednio parę donor–akceptor, można określić z dużą dokładnością wzajemną odległość molekuł.

W mikroskopii FRET obserwowane jest również zjawisko fotowycieplania (*ang. photobleaching*). Cząsteczki chromoforów mogą ulegać przemianom chemicznym pod wpływem absorpcji światła [53]. Prowadzić to może do nieodwracalnego zaniku ich zdolności do fluorescencji. Jednak ich wrażliwość na fotouszkodzenia występuje tylko wówczas, gdy znajdują się w stanie wzbudzonym. Zatem przekazanie energii wzbudzonej cząsteczki donora cząsteczce akceptora skraca czas życia donora w stanie wzbudzonym, co zapobiega jego fotodegradacji. Mierząc czas zaniku fluorescencji donora w obecności akceptora τ_{da} i bez obecności τ_d , można określić wydajność reakcji FRET:

$$E_{FRET} = 1 - \frac{\tau_{da}}{\tau_d} \quad (3)$$

W celu wyznaczenia tego samego parametru, można również zmierzyć czas zaniku fluorescencji akceptora w obecności i pod nieobecność cząsteczek donora. Następnie, wykorzystując uzyskane dane i zależność opisaną wzorem (2), określa się odległość dzielącą cząsteczki donora i akceptora r . Technikę FRET często łączy się również z obrazowaniem czasu zaniku fluorescencji FLIM.

Ze względu na wąskie pasmo emisji, długi czas życia fluorescencji (0,5–2 ms) i fotostabilność, jako donory wykorzystuje się także związki lantanowców (np. Tb, Eu). Długi czas zaniku fluorescencji jest pożądany ze względu na możliwość eliminacji promieniowania tła z obrazu badanej próbki. Czas zaniku promieniowania tła zwykle nie przekracza 2 μ s, co przy użyciu długożyjących fluoroforów pozwala na wycięcie niepożądanego sygnału bez pogorszenia jakości obrazu.

Jako pary donor–akceptor próbuje się także wykorzystywać kropki kwantowe (półprzewodnikowe struktury o nanometrowych wymiarach) wykonane np. z selenku kadmu pokrytego siarczkiem cynku CdSe/ZnS. Kropki kwantowe, podobnie jak związki lantanowców, charakteryzują się dużą wydajnością fluorescencji, wąskim pasmem emisji i fotostabilnością oraz długim czasem zaniku fluorescencji.

Technika FRET znajduje coraz większe zastosowanie biomedyczne, głównie w celu obserwacji transportu oraz zmian konformacyjnych białek (np. białek lub neurotransmiterów) w komórkach oraz przestrzeniach międzykomórkowych [54, 55, 56].

Mikroskopy pozwalające na obrazowanie próbek techniką FRET wykorzystują technikę konfokalną. Przykładem mogą być laserowe skanujące mikroskopy konfokalne firmy Olympus. W takim mikroskopie wiązka lasera Ar-Kr jest przepuszczana przez przestrajalny filtr akustooptyczny, a następnie kierowana na preparat. Obrazy są rejestrowane przy pomocy dwóch wysokorozdzielczych kamer CCD wyposażonych

we wzmacniacze sygnału. Każda z kamer rejestruje osobny kanał (inną długość fali) [52]. Na przykład dla wspomianej wyżej pary wzmocnione zielone białko fluoryzujące EGFP (D) - barwnik Alexa Fluor 546 (A), długości fal rejestrowanych sygnałów wynoszą odpowiednio 509 nm (D) oraz 573 nm (A) [57, 58].

8.4. Mikroskopia elektronowa

W mikroskopie elektronowym zamiast światła wykorzystuje się wiązki elektronów, przyspieszanych pod wpływem silnego pola elektrycznego. Elektrony emitowane z katody (w wyniku termoemisji lub emisji polowej) są przyspieszane na skutek różnicy potencjałów pomiędzy katodą a anodą. W wyniku oddziaływania z badanym materiałem niektóre elektrony tracą energię kinetyczną i zostają pochłonięte. Niektóre natomiast ulegają odbiciu lub wzbudzają emisję sygnałów wtórnych.

Zdolność rozdzielcza mikroskopu elektronowego jest znacznie większa niż mikroskopu świetlnego, gdyż długość fali przyspieszanych elektronów jest dużo mniejsza niż długość fal światła widzialnego, czy promieniowania ultrafioletowego. Preparaty badane w mikroskopii elektronowej muszą znajdować się w próżni (10^{-4} – 10^{-6} Pa).

Długość fali elektronów, wykorzystywana do uzyskania powiększonego obrazu w mikroskopie elektronowym, jest proporcjonalna do pierwiastka z napięcia przyspieszającego elektrony w polu elektrycznym. Bardzo cenną zaletą wysokonapięciowych mikroskopów elektronowych jest zdolność do prześwietlania preparatów o dużej grubości, nawet około 10 μm .

Zdolność rozdzielcza mikroskopu elektronowego wynosi około 1 nm (10^{-9} m.)

Mikroskopia elektronowa jest z powodzeniem stosowana do obrazowania biomateriałów na poziomie monocząsteczkowym [59]. Ograniczeniem tej techniki jest jednak konieczność wykonywania pomiarów próbek charakteryzujących się przewodnictwem elektrycznym. W przypadku materiału biologicznego konieczne jest więc odpowiednie kontrastowanie badanego preparatu. Procedura przygotowania materiału biologicznego do badań za pomocą mikroskopii elektronowej oparta jest technikach niskotemperaturowych [60, 61] lub na kontrastowaniu za pomocą soli metali ciężkich (np. soli uranu, wolframu lub molibdenu).

Zastosowanie mikroskopii elektronowej w biologii umożliwia badanie nanostruktur komórkowych, a dzięki temu poznanie metabolizmu komórkowego [62, 63]. Technika ta umożliwia bardzo precyzyjne badanie bakterii, bakteriofagów oraz wirusów [64]. Mikroskopy elektronowe znajdują również zastosowanie w badaniach materiałowych i biomateriałów, w archeologii i badaniach historycznych.

Mikroskopy elektronowe możemy podzielić na:

- skaningowe mikroskopy elektronowe,
- transmisyjne mikroskopy elektronowe,
- emisyjne mikroskopy elektronowe,
- odbiciowe mikroskopy elektronowe.

Czołowymi producentami mikroskopów elektronowych są firmy: Zeiss, FEI, TESCAN, Philips, Hitachi oraz firma Jeol Ltd. [16, 65, 66, 67, 68]. Podstawy fizyczne mikroskopii elektronowej można znaleźć na stronach internetowych lub książkach [69, 70]. Oferowany jest również interaktywny wykład na temat wirtualnej skaningowej mikroskopii elektronowej vSEM [71].

Elektronowy mikroskop transmisyjny

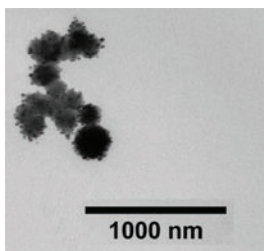
Transmisyjny mikroskop elektronowy (ang. *Transmission Electron Microscopy*, TEM) umożliwia obrazowanie wewnętrznej struktury preparatów. Źródłem elektronów jest zazwyczaj włókno wolframowe, z którego elektrony są uwalniane na drodze termoemisji. Napięcie przyspieszające elektrony jest znacznie wyższe niż w mikroskopie skaningowym SEM i wynosi 100–400 kV. Zaletą wysokiego napięcia jest zwiększona rozdzielczość obrazu, dzięki mniejszej długości fali elektronów i zwiększona głębokość wnikania w preparat. Specjalistyczne wysokonapięciowe urządzenia pracują przy napięciu nawet 1 MV.

Długość fali wiązki elektronów jest odwrotnie proporcjonalna do pierwiastka kwadratowego napięcia przyspieszającego: Im krótsza fala, tym wyższa rozdzielczość.

Transmisyjny mikroskop elektronowy TEM jest doskonałym narzędziem do badań nanostrukturalnych materiałów biologicznych [72]. Utrudnieniem w badaniach TEM jest skomplikowana i czasochłonna preparatyka próbek. Preparat do badań TEM może mieć nie więcej niż kilkaset nanometrów grubości i ma przeważnie postać dysku o średnicy około 3 mm.

Obraz mikroskopowy powstaje wskutek ugięcia elektronów na strukturach preparatu. Stopień ugięcia elektronów zależy od masy cząsteczkowej tych struktur. Im większa masa cząsteczkowa, tym więcej elektronów zostaje ugiętych. Elektrony nieugięte na strukturach przechodzą przez preparat i wzbudzają ekran do świecenia. Pierwiastki, które wchodzi w skład preparatów biologicznych należą do tzw. lekkich, np. C, P, Na, K, S. Przygotowanie takiego preparatu wymaga złożonej procedury przygotowawczej i odpowiednio precyzyjnego aparatu do krojenia – ultramikrotomu. Preparat umieszczany jest na błonach nośnych, na siateczkach podtrzymujących, następnie jest kontrastowany związkami metali ciężkich np. Os, W, U, Mo. Sole metali adsorbowane selektywnie na niektórych strukturach komórkowych zwiększają czytelność obrazu.

Dzięki bardzo wysokiej rozdzielczości transmisyjny mikroskop elektronowy może być stosowany do obrazowania nanometrowych struktur biomateriału [73, 74]. Zdolność rozdzielcza mikroskopii TEM umożliwia również obrazowanie zmian strukturalnych wewnątrz i poza komórką, a także charakterystykę procesów biochemicznych i biofizycznych, zachodzących w komórkach eukariotycznych [75]. Nadaje się również do badania bionanomateriałów (patrz rys. 8.8).



Rys. 8.8. Nanoproszek SiO_2 domieszkowany srebrem (badania prowadzone w Grupie Bio-Optyki, K. Wysocka-Król, H. Podbielska). Zdjęcia z transmisyjnego mikroskopu elektronowego Tesla BC 500 (napięcie przyspieszające 90 kV, zdolność rozdzielcza 1 nm, zakres temperatur do 1100 K).

Zdjęcia otrzymane we współpracy z Zakładem Spektroskopii Stanów Wzbudzonych Instytutu Niskich Temperatur i Badań Strukturalnych PAN we Wrocławiu dzięki uprzejmości prof. W. Stręka

Elektronowy mikroskop skaningowy (SEM)

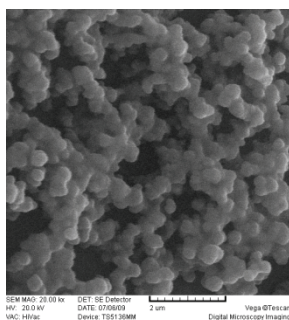
Skaningowy mikroskop elektronowy (ang. *Scanning Electron Microscopy*, SEM) jest stosowany do badania mikrostruktur, głównie powierzchni preparatów. Pomiar za pomocą SEM polega na skanowaniu badanej próbki wiązką elektronów. Podczas skanowania próbki detektor zbiera sygnały, emitowane z każdego punktu skanowanej powierzchni. Napięcie przyspieszające wynosi około 1–30 kV.

Podczas bombardowania elektronami z powierzchni próbki emitowane jest spektrum niskoenergetycznych elektronów wtórnych, biorących udział w tworzeniu obrazu. Sygnały wtórne, generowane na skutek oddziaływania wiązki pierwotnej elektronów z próbką, to:

- elektrony wtórne – to elektrony wyrzucone z wewnętrznych powłok elektronowych atomów próbki na skutek zderzeń niesprężystych z elektronami pierwotnymi (elektronami wiązki),
- elektrony wstępnie rozproszone – to pierwotne elektrony (elektrony wiązki), które na skutek zderzeń sprężystych z jądrami atomów próbki zostały „odbite” z powrotem od próbki,
- elektrony Augera – to elektrony emitowane z zewnętrznych powłok elektronowych atomu,
- promieniowanie rentgenowskie (promieniowanie X) – jest to promieniowanie elektromagnetyczne o długości fali od 10 pm do 10 nm.

Elektrony wtórne są następnie wychwytywane przez detektor, wzmacniane i generowany jest sygnał elektryczny. Sygnał jest wzmacniany elektronicznie i przesyłany do monitora, a natężenie świecenia plamki na ekranie jest proporcjonalne do wielkości sygnału z detektora. Plamka na kineskopie przesuwa się z taką samą częstotliwością, jak wiązka po powierzchni próbki. Na monitorze widać obraz odpowiadający topografii powierzchni, od której zostały odbite elektrony. Elektronowy mikroskop skaningowy, podobnie jak mikroskop transmisyjny, wymaga umieszczenia preparatu w próżni.

Zdolność rozdzielcza mikroskopu zależy przede wszystkim od średnicy wiązki: im mniejszy przekrój wiązki, tym większą uzyskuje się rozdzielczość obrazu. Powiększenia uzyskiwane za pomocą mikroskopu skaningowego nie przekraczają kilkudziesięciu tysięcy razy.



Rys. 8.9. Nanoproszek SiO₂ domieszkowany srebrem (badania prowadzone w Grupie Bio-Optyki, K. Wysocka-Król, H. Podbielska). Mikrofotografia powierzchni otrzymana za pomocą Skaningowego Mikroskopu Elektronowego VEGA TS 5136 MM (TESCAN) współpracującego z mikroanalizatorem rentgenowskim INCA x-sight (Oxford Instruments Analytical). Zdjęcia otrzymane we współpracy z Wydziałem Chemii Nieorganicznej oraz Wydziałem Fizyki Eksperymentalnej Uniwersytetu Comenius w Bratysławie dzięki uprzejmości prof. A. Plecenika i prof. G. Plescha

Za pomocą mikroskopii skaningowej możliwe jest obrazowanie preparatów roślinnych, zwierzęcych, materiałów i biomateriałów. Możliwa jest charakterystyka struktur komórkowych związanych z powierzchnią komórki, jak i struktur wewnątrzkomórkowych [76, 77, 78]. Ciekawe obrazy zarejestrowane w mikroskopie SEM można znaleźć na stronie [79].

Skaningowa mikroskopia elektronowa ma zastosowanie w badaniach *in vitro* powierzchni biomateriałów stosowanych w implantologii i inżynierii tkankowej, używanych do wspomaganie, rekonstrukcji lub zastąpienia funkcji żywych komórek. Nadaje się do charakteryzacji nanobiomateriałów (patrz rys. 8.9). Za pomocą SEM charakteryzowane są powierzchnie implantów kostnych i zębowych, soczewek kontaktowych, stentów i zastawek, jak również sztucznych organów i tkanek [80, 81, 82].

8.5. Mikroskopia sond skanujących

Do mikroskopów z sondą skanującą (ang. *Scanning Probe Microscopy*, SPM) zaliczyć należy: skaningowy mikroskop tunelowy (ang. *Scanning Tunneling Microscopy*, STM) oraz mikroskop sił atomowych (ang. *Atomic Force Microscopy*, AFM). Skonstruowano różne typy mikroskopów o podobnych założeniach konstrukcyjnych. Najbardziej znane rozwiązania to: mikroskop sił magnetycznych (ang. *Magnetic Force Microscope*, MFM), mikroskop sił elektrostatycznych (ang. *Electrostatic Force Microscope*, EFM), mikroskop optyczny bliskiego pola (ang. *Scanning Near-field Optical Microscope*, SNOM) oraz mikroskop sił tarcia (ang. *Friction Force Microscope*, FFM).

Mikroskopy z sondą skanującą wykorzystują oddziaływanie pomiędzy sondą pomiarową a materiałem badanej próbki do odwzorowania topografii oraz charakterystyki fizykochemicznej badanego materiału. Należy również zwrócić uwagę na fakt, że obrazowanie za pomocą SPM może odbywać się zarówno w powietrzu, jak i w zamkniętej komorze (gaz, próżnia, ciecz).

Mikroskopia sond skanujących z uwagi na bardzo dużą rozdzielczość, bliską rozdzielczości atomowej, jest metodą znajdującą coraz szersze zastosowanie w wielu dziedzinach nauki (fizyce, chemii, biologii), w technice (nanotechnologii, elektronice), w inżynierii materiałowej i biomedycznej oraz w medycynie [83, 84, 85, 86]. Do głównych producentów mikroskopów tej klasy należą firmy: Bruker, Veeco, JPK Instruments oraz firma Asylum Research [87, 88, 89]. Bruker Nano Surfaces Business jest wiodącym i wszechstronnym dostawcą aparatury laboratoryjnej oraz pomiarowej. W ofercie firmy znajduje się szereg wysokiej jakości urządzeń do analizy materiałowej znajdującej zastosowanie zarówno w celach naukowych jak i przemysłowych. Bruker oferuje ponadto mikroskopy AFM/SPM w tym wiodące na rynku modele MultiMode oraz Dimension ICON. Światowy koncern Bruker w roku 2011 przejął działalność amerykańskiej firmy Veeco, będącej do tej pory czołowym producentem mikroskopów SPM.

8.5.1. Skaningowy mikroskop tunelowy (STM)

W skaningowej mikroskopii tunelowej (STM) wykorzystuje się efekt tunelowania elektronów pomiędzy przewodzącą sondą a próbką pod wpływem różnicy potencjałów.

Efekt tunelowy – przenikanie cząstki przez barierę potencjału wyższą od energii kinetycznej cząstki. Prawdopodobieństwo przejścia rośnie z energią cząstki, a maleje eksponencjalnie z szerokością bariery.

Próbka przewodząca jest skanowana za pomocą sondy skanującej, której ruch można kontrolować. Ramię trzymające sondę połączone jest w pętli sprzężenia zwrotnego z układem piezoelektrycznym (tzw. skanerem piezoelektrycznym), który pod wpływem napięcia elektrycznego zmienia w niewielkim stopniu swoje wymiary w trzech prostopadłych kierunkach (x i y – skanowanie w płaszczyźnie, z – zbliżanie i oddalanie sondy od próbki). W wielu konstrukcjach układ piezoelektryczny porusza próbką, a sama sonda pozostaje nieruchoma. Skanowanie kolejnych linii i punktów obrazu próbki odbywa się według z góry zadanego programu, natomiast odległość pomiędzy sondą a próbką jest ustalana przez szybki układ sprzężenia zwrotnego, zapewniający przepływ stałego prądu. Obraz STM powierzchni próbki uzyskuje się przez pomiar natężenia prądu płynącego w układzie.

Rozdzielczość w mikroskopii sond skanujących STM wynosi 0,1 nm wzdłuż osi z , a wzdłuż osi x i y STM osiąga rozdzielczość subangstromową

Aby uzyskać tak wysoką rozdzielczość mikroskop musi być izolowany od drgań mechanicznych. W przypadku bardzo gładkich próbek możliwe jest utrzymywanie stałej wysokości i rejestrowanie wyłącznie zmian prądu tunelowego. Odległość sondy od powierzchni próbki jest rzędu od kilku angstromów do 1 nm.

Otrzymany obraz odzwierciedla topografię powierzchni oraz strukturę elektronową materiału. Ograniczeniem tej techniki jest fakt, że zarówno sonda pomiarowa, jak i próbka muszą być materiałami przewodzącymi. Mikroskop STM może być zaprojektowany do pomiarów w dwóch trybach pracy: w trybie stałej odległości oraz w trybie stałego prądu.

Skaningowe mikroskopy tunelowe znajdują szczególnie zastosowanie w obrazowaniu biomateriałów w implantologii oraz inżynierii biomedycznej. Charakterystyce nanostrukturalnej poddaje się powierzchnie materiałów, które mają rekonstruować lub zastępować żywe tkanki [90, 91, 92].

Dzięki wysokiej rozdzielczości mikroskop STM stał się pierwszym narzędziem nanotechnologicznym, mogącym z rozdzielczością atomową obrazować struktury pojedynczych cząsteczek [93, 94], jak również manipulować obiektami, znajdującymi się na powierzchni skanowanej. W nanomanipulacji wykorzystuje się fakt, że gdy do sondy zostanie przyłożone napięcie większe niż podczas skanowania, to może ona oderwać pojedynczy atom z powierzchni próbki i przełożyć go w inne miejsce. Efekt ten wykorzystuje się do modyfikacji powierzchni biomateriałów [95, 96].

8.5.2. Mikroskop sił atomowych (AFM)

Mikroskopia sił atomowych (AFM) umożliwia obrazowanie struktur biologicznych w nanoskali. Zaletą tej metody jest fakt, że pozwala badać nie tylko powierzchnię przewodników, ale również izolatorów i półprzewodników. W technice AFM sto-

suje się sondy pomiarowe o średnicy od 2–50 nm. W odróżnieniu od techniki STM sonda skanuje powierzchnię, rejestrując siłę w funkcji położenia.

Podobnie, jak w technice STM, badanie metodą AFM wykonuje się w dwóch trybach: stałej wysokości lub stałej siły. W pierwszym przypadku wysokość sondy nie ulega zmianie podczas skanowania, mierzone są zmiany wychylenia dźwigni. Metoda ta charakteryzuje się dużą szybkością skanowania, dzięki czemu możliwy jest pomiar procesów zachodzących w czasie rzeczywistym. W trybie stałej siły sonda porusza się w kierunku prostopadłym do próbki, tak aby ugięcie, a co za tym idzie siła, z jaką działa ona na powierzchnię, było stałe. Topografia powierzchni jest wyznaczana na podstawie różnic w położeniu sondy.

Ostrze AFM znajduje się na sprężystej mikrodźwigni (mikrobelce, ang. *cantilever*). Pomiar ugięcia dźwigni jest najczęściej dokonywany metodami optycznymi. Występowanie sił magnetycznych, elektrostatycznych i oddziaływań międzycząsteczkowych pomiędzy atomami ostrza i badanej powierzchni umożliwia detekcję ruchów ostrza, a dzięki temu obrazowanie powierzchni.

Metoda AFM zapewnia pomiar badanej powierzchni z bardzo dużą rozdzielczością. Pomiar AFM można prowadzić w próżni, w powietrzu, a także w cieczach.

W mikroskopie AFM rozdzielczość teoretyczna wynosi 0,1 nm względem osi x i y oraz 0,01 nm względem osi z rozdzielczość

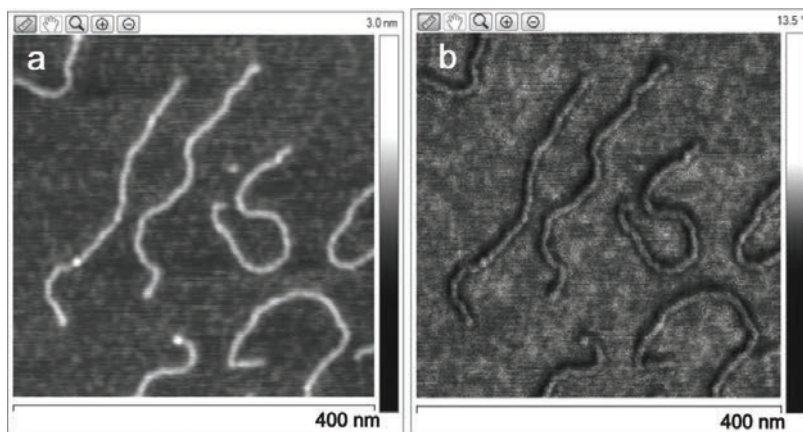
W praktyce rozdzielczość jest na ogół mniejsza i jest uwarunkowana wieloma czynnikami, między innymi takimi, jak rodzaj skanowanej próbki, sposób nanoszenia materiału, rodzaj sondy skanującej oraz warunki przeprowadzania pomiaru.

W mikroskopii sił atomowych wyróżniamy trzy podstawowe mody pracy: kontaktowy (ang. *contact mode*), bezkontaktowy (ang. *non-contact mode*) oraz kontaktu przerywanego (ang. *tapping mode*). Ten ostatni znajduje szczególne zastosowanie w pomiarach strukturalnych cząsteczek biologicznych oraz w charakterystyce procesów zachodzących między nimi. Tryb kontaktu przerywanego umożliwia rejestrację trójwymiarowych obrazów topografii oraz obrazów kontrastu fazowego, które jest rozszerzeniem metody kontaktu przerywanego (patrz rys. 8.10).

Mikroskopia AFM ma coraz szersze zastosowanie w naukach biomedycznych. Umożliwia nie tylko trójwymiarową charakterystykę badanego materiału, ale również charakterystykę fizykochemiczną, a także nanomanipulację za pomocą sondy pomiarowej.

Technika AFM jest obecnie stosowana w wielu badaniach biologicznych i medycznych, między innymi związanych z charakterystyką funkcjonalną i strukturalną DNA i RNA [97, 98], kompleksów kwasów nukleinowych z białkami [99, 100], chromosomów [101, 102], błon komórkowych [103, 104], białek [105, 106], lipidów [107, 108] oraz w badaniach morfologii komórek [109, 110]. AFM umożliwia monitoring oddziaływań leków z komórkami i tkankami [111, 112] oraz badania biodegradacji cząsteczek [113, 114]. W przeciwieństwie do mikroskopu elektronowego, próbka AFM

nie podlega kontrastowaniu, specyficznym modyfikacjom lub zamrażaniu, a pomiar w AFM może się odbywać zarówno w powietrzu, jak i w buforze.



Rys. 8.10. Obrazy AFM podwójnych nici kwasu nukleinowego DNA, a) obraz topografii, b) obrazowanie fazowe. Obrazy zarejestrowane przez dr hab. Martę Kopaczyńską na Uniwersytecie Kalifornijskim w Berkeley

Mikroskopia sił atomowych jest stosowana również w pomiarach dynamicznych zmian biocząsteczek w czasie rzeczywistym [115, 116]. Pomiary te umożliwiają badania elastyczności biomolekuł, charakterystykę sił oddziaływań międzycząsteczkowych, a także badanie kinetyki procesów komórkowych [117, 118].

Wyniki uzyskane w badaniach wykonanych za pomocą AFM mają wpływ na każdą dziedzinę nauk biologicznych i medycznych, a znaczenie samej metody rośnie wraz z nowymi wyzwaniami, jakie stawia przed nami medycyna i inżynieria biomedyczna.

8.6. Zastosowanie technik mikroskopowych w medycynie

Intensywny rozwój medycyny i nauk medycznych pociąga za sobą konieczność znajdowania narzędzi badawczych, dostarczających coraz bardziej szczegółowych informacji na temat biochemii i biofizyki badanych preparatów. Rozwój technik mikroskopowych jest uważany za jedno z najistotniejszych osiągnięć w zakresie diagnostyki medycznej. Wprowadzenie do diagnostyki klinicznej wysokorozdzielczych technik mikroskopowych umożliwiło bardzo szybkie i wysoce precyzyjne rozpoznawanie wielu schorzeń, chorób genetycznych oraz identyfikację patologii na poziomie molekularnym. Nowoczesne metody mikroskopowe odgrywają ważną rolę w badaniach dynamicznych właściwości układów biologicznych, oddziaływań międzycząsteczkowych oraz oddziaływań na poziomie nanostrukturalnym.

Jedną z technik łączących metody mikroskopowe jest mikroskopia wirtualna, która może mieć duże znaczenie w dalszym rozwoju medycyny i inżynierii biomedycznej [119]. W mikroskopii wirtualnej mamy możliwość skanowania i archiwizowania baz danych rzadkich i cennych preparatów biologicznych. Wyniki mogą być następnie udostępniane publicznie w celu prezentacji, edukacji lub podczas telekonferencji pomiędzy klinikami. Rzeczywistość wirtualna może znaleźć zastosowanie w szkoleniu i w diagnostyce oraz przy operacjach wykonywanych zdalnie za pomocą robotów medycznych. W przyszłości jej rozwój spowoduje, że wykorzystanie robota będzie tańsze niż zatrudnienie całego zespołu operacyjnego, a dokładność maszyny wielokrotnie przewyższy sprawność najzdolniejszych operatorów.

Literatura

- [1] PODBIELSKA H., BUZALEWICZ I., *Badania endoskopowe*, rozdział 9, [w:] *Optyka Biomedyczna: Wybrane zagadnienia*, Podbielska H. (red.), Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej 2011.
- [2] WOJTKOWSKI M., *Obrazowanie za pomocą tomografii optycznej OCT z detekcją fourierowską*, Wydawnictwo Naukowe Uniwersytetu Mikołaja Kopernika, 2009.
- [3] WILKINSON J.M., KUOK M.H., ADAMSON G., *Biomedical applications of optical imaging*, Med. Device Technol., 2004, Vol. 15, No. 10, 22–4.
- [4] <http://www.magnet.fsu.edu/education/tutorials/java/index.html>
- [5] <http://www.microscopyu.com/articles/formulas/index.html>
- [6] <http://www.olympusmicro.com/>
- [7] <http://zeiss-campus.magnet.fsu.edu/tutorials/axioobserver/index.html>
- [8] Pluta M., *Mikroskopia optyczna*, PWN 1982.
- [9] <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/phasecontrast/phase.html>
- [10] <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/dic/dicoverview.html>
- [11] FUNG D.C., THERIOT J.A., *Imaging techniques in microbiology*, Curr. Opin. Microbiol., 1998, Vol. 1, No. 3, 346–51.
- [12] BOUVET M., WANG J., NARDIN S.R., NASSIRPOUR R., YANG M., BARANOV E., JIANG P., MOOSSA A.R., HOFFMAN R.M., *Real-time optical imaging of primary tumor growth and multiple metastatic events in a pancreatic cancer orthotopic model*, Cancer Res., 2002, Vol. 62, No. 5, 1534–40.
- [13] STEPHENS D.J., ALLAN V.J., *Light microscopy techniques for live cell imaging*, Science, 2003, Vol. 300, No. 5616, 82–6.
- [14] www.nikon.com
- [15] www.olympus.com
- [16] www.zeiss.com
- [17] www.leica-microsystems.com
- [18] <http://fletchlab.berkeley.edu/>
- [19] <http://www.microscopyu.com/tutorials/java/coolscope/>
- [20] EMPTAGE N.J., *Fluorescent imaging in living systems*, Curr. Opin. Pharmacol., 2001., Vol. 5, 521–5.
- [21] MUNRO I., MCGINTY J., GALLETLY N., REQUEJO-ISIDRO J., LANIGAN P.M., ELSON D.S., DUNSBY C., NEIL M.A., LEVER M.J., STAMP G.W., FRENCH P.M., *Toward the clinical application of time-domain fluorescence lifetime imaging*, Biomed. Opt., 2005, Vol. 10, No. 5, 051403.
- [22] <http://www.scienceasart.org/breast-cancer-cells>
- [23] HASSANEIN M.K., SUETSUGU A., Saji S., MORIWAKI H., BOUVET M., MOOSSA A.R., HOFFMAN R.M., *Stem-like and non-stem human pancreatic cancer cells distinguished by morphology and metastatic behavior*, J. Cell Biochem., 2011 (w druku).

- [24] ZHONG H., ZHANG Q., ZHANG S., *High-Intensity Fluorescence Imaging and Sensitive Electrochemical Detection of Cancer Cells by using an Extracellular Supramolecular Reticular DNA-Quantum Dot Sheath*, Chemistry, 2011, Vol. 17, No. 30, 8388–94.
- [25] FERRIS D.P., LU J., GOTHARD C., YANES R., THOMAS C.R., OLSEN J.C., STODDART J.F., TAMANOI F., ZINK J.I., *Synthesis of biomolecule-modified mesoporous silica nanoparticles for targeted hydrophobic drug delivery to cancer cells*, Small, 2001, Vol. 7, No. 13, 1816–26.
- [26] TANG H., XING C., LIU L., YANG Q., WANG S., *Synthesis of amphiphilic polythiophene for cell imaging and monitoring the cellular distribution of a Cisplatin anticancer drug*, Small, 2011, Vol. 7, No. 10, 1464–70.
- [27] PETROLL W.M., JESTER J.V., CAVANAGH H.D., *In vivo confocal imaging: general principles and applications*, Scanning, 1994, Vol. 16, No. 3, 131–49.
- [28] PAWLEY J.B., (Ed.), *Handbook of Biological Confocal Microscopy*, 2nd Edition, Plenum, New York 1995.
- [29] <http://www.olympusfluoview.com/java/confocalvswidefield/index.html>
- [30] <http://www.microscopyu.com/tutorials/java/virtual/confocal/index.html>
- [31] <http://swehsc.pharmacy.arizona.edu/exppath/micro/confocal.php>
- [32] <http://www.grad.ucl.ac.uk/comp/2010-2011/research/gallery/index.pht?entryID=161>
- [33] SHOTTON D., WHITE N., *Confocal scanning microscopy: three-dimensional biological imaging*, Trends Biochem Sci., 1989, Vol. 14, No. 11, 435–9.
- [34] <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/techniques/fluorescence/spinningdisk/index.html>
- [35] ALOMAR T.S., NUBILE M., LOWE J., DUA H.S., *Corneal intraepithelial neoplasia: in vivo confocal microscopic study with histopathologic correlation*, Am. J. Ophthalmol., 2011, Vol. 151, No. 2, 238–47.
- [36] MARTONE G., PICHIERRI P., FRANCESCHINI R., MORAMARCO A., CIOMPI L., TOSI G.M., BALESTRAZZI A., *In vivo confocal microscopy and anterior segment optical coherence tomography in a case of alternaria keratitis*, Cornea, 2011, Vol. 30, No. 4, 449–453.
- [37] KURZEJA M., WALECKA I., RUDNICKA L., OLSZEWSKA M., *Zastosowanie refrakcyjnej mikroskopii konfokalnej in vivo w dermatologii*, Przegł. Dermatol., 2010, Vol. 97, 281–289.
- [38] <http://www.microscopyu.com/articles/fluorescence/multiphoton/multiphotonintro.html>
- [39] GOETZ M., WATSON A., KIESSLICH R., *Confocal laser endomicroscopy in gastrointestinal diseases*, J. Biophotonics, 2011, Vol. 4, No. (7–8), 498–508.
- [40] LI Z., YU T., ZUO X.L., GU X.M., ZHOU C.J., JI R., LI C.Q., WANG P., ZHANG T.G., HO K.Y., LI Y.Q., *Confocal laser endomicroscopy for in vivo diagnosis of gastric intraepithelial neoplasia: a feasibility study*, Gastrointest Endosc., 2010, Vol. 72, No. 6, 1146–53.
- [41] THIBERVILLE L., MORENO-SWIRC S., VERCAUTEREN T. et al., *In vivo imaging of the bronchial wall microstructure using fibered confocal fluorescence microscopy*, Am. J. Respir. Crit. Care Med., 2007, Vol. 1, 22–31.
- [42] URAYAMA P., MYCEK M.A., *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy of Endogenous Biological Fluorescence*, [w:] Handbook of Biomedical Fluorescence, pod red. M.A. Mycek i B.W. Pogue'a, Marcel Dekker, New York 2003, 211–236.
- [43] www.picoquant.com/getfs.htm?products/lsm_kit/ex_lsm_flim.htm
- [44] http://sales.hamamatsu.com/assets/pdf/parts_C/e_flim.pdf
- [45] <http://www.lambertinstruments.com/en/technologies/flim/non-fret-experiments.html>
- [46] <http://www.picoquant.com/getfs.htm?products/ldh/ldhseries.htm>
- [47] CLEGG R.M., *Fluorescence Resonance Energy Transfer*, Current Opinion in Biotechnology, 1995, Vol. 6, No. 1, 103–110.
- [48] SEKAR R.B., PERIASAMY A., *Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations*, The Journal of Cell Biology, 2003, Vol. 160, No. 5, 629–633.
- [49] PITSON D.W., KREMERS G.J., *Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly*, Trends in Biochemical Sciences, 2007, Vol. 32, No. 9, 407–414.

- [50] TAKANISHI C.L., BYKOVA E.A., CHENG W., ZHENG J., *GFP-based FRET analysis in live cells*, Brain Research, 2006, Vol. 1091, 132–139.
- [51] LOURA L., DE ALMEIDA R., SILVA L., PRIETO M., *FRET analysis of domain formation and properties in complex membrane systems*, Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes, 2009, Vol. 1788, No. 1, 209–224.
- [52] <http://www.olympusfluoview.com/applications/fretintro.html>
- [53] BONNET R., MARTINEZ G., *Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy*, Tetrahedron, 2001, Vol. 57, 9513–9547.
- [54] ARGAWAL S.R., MACDOUGALL D.A., TYSER R., PUGH S.D., CALAGHAN S.C., HARVEY R.D., *Effects of cholesterol depletion on compartmentalized cAMP responses in adult cardiac myocytes*, J. Mol. Cell Cardiol., 2011, Vol. 50, No. 3, 500–9.
- [55] DAVID GERECHT P.S., TAYLOR M.A., PORT J.D., *Intracellular localization and interaction of mRNA binding proteins as detected by FRET*, BMC Cell Biol., 2010, Vol. 11, 69.
- [56] LAVIV T., RIVEN I., DOLEV I., VERTKIN I., BALANA B., SLESINGER P.A., SLUTSKY I., *Basal GABA regulates GABA(B)R conformation and release probability at single hippocampal synapses*, Neuron, 2010, Vol. 67, No. 2, 253–67.
- [57] <http://www.biotek.com/resources/articles/green-fluorescent-proteins.html>
- [58] <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/References/Molecular-Probes-The-Handbook/Technical-Notes-and-Product-Highlights/The-Alexa-Fluor-Dye-Series.html>
- [59] KWON O.H., ZEWEIL A.H., *4D electron tomography*, Science, 2010, Vol. 328, No. 5986, 1668–73.
- [60] MELLER K., *Cryo-electron microscopy of nervous tissue. A review*, Electron Microsc Rev., 1992, Vol. 5, No. 2, 341–80.
- [61] KONING R.I., *Cryo-electron tomography of cellular microtubules*, Methods Cell Biol., 2010, Vol. 97, 455–73.
- [62] WISSE E., BRAET F., DUIJMEL H., VREULS C., KOEK G., OLDE DAMINK S.-W., VAN DEN BROEK M.A., DE GEEST B., DEJONG C.H., TATENO C., FREDERIK P., *Fixation methods for electron microscopy of human and other liver*, Gastroenterol., 2010, Vol. 16, No. 23, 2851–66.
- [63] FLANNIGAN D.J., BARWICK B., ZEWEIL A.H., *Biological imaging with 4D ultrafast electron microscopy*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010, Vol. 107, No. 22, 9933–7.
- [64] GOLDSMITH C.S., MILLER S.E., *Modern uses of electron microscopy for detection of viruses*, Clin. Microbiol. Rev., 2009, Vol. 22, No. 4, 552–63.
- [65] <http://www.fei.com/products/transmission-electron-microscopes/tecnaia.aspx>
- [66] www.tescan.com
- [67] www.hitachi-hta.com
- [68] www.jeol.com
- [69] <http://www.matter.org.uk/tem/>
- [70] BARBACKI A., *Mikroskopia elektronowa*, Wydawnictwo Politechniki Poznańskiej 2007.
- [71] <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/java/electronmicroscopy/magnify1/index.html>
- [72] http://mol-biol4masters.masters_grkraj.org/html/Gene_Expression_III3-Chromosomal_Nature_Before_During_and_After_Gene_Activation.htm
- [73] HIRATA E., SAKAGUCHI N., UO M., USHIJIMA N., NODOSAKA Y., WATARI F., ICHINOSE H., YOKOYAMA A., *Transmission electron microscopic observation of cells cultured on multi-walled carbon nanotube-coated sponges*, J. Electron Microsc., 2010, Vol. 59, No. 5, 447–50.
- [74] D'EMILIO A., BIAGIOTTI L., BURATTINI S., BATTISTELLI M., CANONICO B., EVANGELISTI C., FERRI P., PAPA S., MARTELLI A.M., FALCIERI E., *Morphological and biochemical patterns in skeletal muscle apoptosis*, Histol. Histopathol., 2010, Vol. 25, No. 1, 21–32.
- [75] SANDER B., GOLAS M.M., *Visualization of bionanostructures using transmission electron microscopical techniques*, Microsc. Res. Tech., 2011, Vol. 74, No. 7, 642–63.

- [76] TAUBEE F., STEININGER F., NIETZSCHE S., NOREN J.G., *Scanning electron microscopic and X-ray micro analysis on tooth enamel exposed to alkaline agents*, Swed Dent J., 2010, Vol. 34, No. 3, 129–37.
- [77] SU K., GONG Y., WANG C., WANG D.A., *A novel shell-structure cell microcarrier (SSCM) for cell transplantation and bone regeneration medicine*, Pharm. Res., 2011, Vol. 28, No. 6, 1431–41.
- [78] BAKER D., KUPKE K.G., INGRAM P., ROGGLI V.L., SHELBURNE J.D., *Microprobe analysis in human pathology*, Scan. Electron Microsc., (Pt 2), 1985, 659–80.
- [79] <http://cdin.us/be/astounding-microscopy-pics/>
- [80] SECINTI K.D., ÖZALP H., ATTAR A., SARGON M.F., *Nanoparticle silver ion coatings inhibit biofilm formation on titanium implants*, J. Clin. Neurosci., 2011, Vol. 18, No. 3, 391–5.
- [81] OKNER R., FAVARO G., RADKO A., DOMB A.J., MANDLER D., *Electrochemical codeposition of sol-gel films on stainless steel: controlling the chemical and physical coating properties of biomedical implants*, Phys. Chem. Chem. Phys., 2010, Vol. 14, No. 12(46), 15265–73.
- [82] BASALUS M.W., VAN HOUWELINGEN K.G., ANKONE M., DE MAN F.H., VON BIRGELEN C., *Scanning electron microscopic assessment of the biodegradable coating on expanded bioluminescent stents*, EuroIntervention., 2009, Vol. 5, No. 4, 505–10.
- [83] COLTON R.J., BASELT D.R., DUFRENE Y.F., GREEN J.B., LEE G.U., *Scanning probe microscopy*, Curr. Opin. Chem. Biol., 1997, Vol. 1, No. 3, 370–7.
- [84] FIRTEL M., BEVERIDGE T.J., *Scanning probe microscopy in microbiology*, Micron, 1995, Vol. 26, No. 4, 347–62.
- [85] DAVIS J.J., MORGAN D.A., WRATHMELL C.L., ZHAO A., *Scanning probe technology in metalloprotein and biomolecular electronics*, IEE Proc. Nanobiotechnol., 2004, Vol. 151, No. 2, 37–47.
- [86] HORBER J.K., MILES M.J., *Scanning probe evolution in biology*, Science, 2003, Vol. 302, No. 5647, 1002–5.
- [87] www.brucker.com
- [88] www.jpik.com
- [89] www.asylumresearch.com
- [90] PAPAGEORGIOU A.C., BEGLITIS N.S., PANG C.L., TEOBALDI G., CABAILH G., CHEN Q., FISHER A.J., HOFER W.A., THORNTON G., *Electron traps and their effect on the surface chemistry of TiO₂(110)*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2010, Vol. 107, No. 6, 2391–6.
- [91] RODRIQUEZ B.J., KALININ S.V., SHIN J., JESSE S., GRICHKO V., THUNDAT T., BADDORF A.P., GRUVERMAN A., *Electromechanical imaging of biomaterials by scanning probe microscopy*, J. Struct. Biol., 2006, Vol. 153, No. 2, 151–9.
- [92] <http://nanotechweb.org/cws/article/lab/26288>
- [93] CHEN Q., RICHARDSON N.V., *Enantiomeric interactions between nucleic acid bases and amino acids on solid surfaces*, Nat. Mater., 2003, Vol. 2, No. 5, 324–8.
- [94] GARCIA R., YUQIU J., SCHABTACH E., BUSTAMANTE C., *Deposition and imaging of metal-coated biomolecules with the STM*, Ultramicroscopy, 1992, Vol. 42–44 (Pt B), 1250–4.
- [95] CHOI J.W., ISLAM A.T., LEE J.H., SONG J.M., OH B.K., *Detection of beta-amyloid (1–42) on protein array based on electrical detection technique using scanning tunneling microscopy*, J. Nanosci. Nanotechnol., 2011, Vol. 11, No. 5, 4200–4.
- [96] BRAMBILLA D., LE DROUMAGUET B., NICOLAS J., HASHEMI S.H., WU L.P., MOGHIMI S.M., COUVREUR P., ANDRIEUX K., *Nanotechnologies for Alzheimer's disease: diagnosis, therapy, and safety issues*, Nanomedicine, 2011, (w druk).
- [97] SERVICE R.F., *DNA imaging. Getting a feel for genetic variations*, Science, 2000, Vol. 289, No. 5476, 27–8.
- [98] UEHARA H., IKAI A., OSADA T., *Detection of mRNA in single living cells using AFM nano-probes*, Methods Mol. Biol., 2009, Vol. 544, 599–608.

- [99] PASTRE D., HAMON L., LE CAM E., CURMI P.A., PIETREMENT O., *Specific DNA-Protein Interactions on Mica Investigated by Atomic Force Microscopy*, Langmuir, 2010, Vol. 26, No. 4, 2618–23.
- [100] SHLYAKHTENKO L.S., GALL A.A., FILNOV A., CEROVAC Z., LUSHNIKOV A., LYUBCHENKO Y.L., *Silatrane-based surface chemistry for immobilization of DNA, protein-DNA complexes and other biological materials*, Ultramicroscopy, 2003, Vol. 97, No. 1–4, 279–87.
- [101] BUSTAMANTE C., ZUCCHERI G., LEUBA S.H., YANG G., SAMORI B., *Visualization and analysis of chromatin by scanning force microscopy*, Methods, 1997, Vol. 12, No. 1, 73–83.
- [102] USHIKI T., HOSHI O., *Atomic force microscopy for imaging human metaphase chromosomes. Review*, Chromosome Res., 2008, Vol. 16, No. 3, 383–96.
- [103] IKAI A., AFRIN R., *Toward mechanical manipulations of cell bones and bone proteins using an atomic force microscope: an invited review*, Cell Biochem. Biophys., 2003, Vol. 39, No. 3, 257–77.
- [104] FREDERIX P.L., BOSSHART P.D., ENGEL A., *Atomic force microscopy of biological membranes*, Biophys. J., 2009, Vol. 96, No. 2, 329–38.
- [105] SILVA L.P., *Imaging proteins with atomic force microscopy: an overview. Review*, Curr. Protein Pept. Sci., 2005, Vol. 6, No. 4, 387–95.
- [106] LEE K.B., PARK S.J., MIRKIN C.A., SMITH J.C., MRKSICH M., *Protein nanoarrays generated by dip-pen nanolithography*, Science, 2002, Vol. 295, 1702–1705.
- [107] XIANG Y., YANG M., SU T., CHEN Y., BI L., HU K., *Glycolipid biotinylation on purple blone with maintained bioactivity*, J. Phys. Chem. B., 2009, Vol. 113, No. 22, 7762–6.
- [108] SEK S., LAREDO T., DUTCHER J.R., LIPKOWSKI J., *Molecular resolution imaging of an antibiotic peptide in a lipid matrix*, J. Am. Chem. Soc., 2009, Vol. 131, No. 18, 6439–44.
- [109] PELLING A.E., SEHATI S., GRALLA E.B., VALENTINE J.S., GIMZEWSKI J.K., *Local nanomechanical motion of the cell wall of Saccharomyces cerevisiae*, Science, 2004, Vol. 305, 1147–1150.
- [110] OHNESORGE F.M., HORBER J.K., HABERLE W., CZERNY C.P., SMITH D.P., BINNING G., *AFM review study on pox viruses and living cells*, Biophys. J., 1997, Vol. 73, No. 4, 2183–94.
- [111] DUWEZ A.S., CUENOT S., JEROME C., GABRIEL S., JEROME R., RAPINO S., ZERBETTO F., *Mechanochemistry: targeted delivery of single molecules*, Nat. Nanotechnol., 2009, Vol. 1, No. 2, 122–5.
- [112] KIM B.G., KANG I.J., *Evaluation of the effects of biodegradable nanoparticles on a vaccine delivery system using AFM, SEM, and TEM*, Ultramicroscopy, 2008, Vol. 108, No. 10, 1168–73.
- [113] PELLING A.E., VERAITCH F.S., CHU C.P., MASON C., HORTON M.A., *Mechanical dynamics of single cells during early apoptosis*, Cell Motil. Cytoskeleton, 2009, Vol. 66, No. 7, 409–22.
- [114] HU M., WANG J., ZHAO H., DONG S., CAI J., *Nanostructure and nanomechanics analysis of lymphocyte using AFM: from resting, activated to apoptosis*, J. Biomech., 2009, Vol. 42, No. 10, 1513–9.
- [115] LI B.S., SATTIN B.D., GOH M.C., *Direct and real-time visualization of the disassembly of a single RecA-DNA-ATPgammaS complex using AFM imaging in fluid*, Nano Lett., 2006, Vol. 6, No. 7, 1474–8.
- [116] VICARY J.A., MILES M.J., *Real-time nanofabrication with high-speed atomic force microscopy*, Nanotechnology, 2009, Vol. 20, No. 9, 95302.
- [117] HANSMA H.G., KASUYA K., OROUDJEV E., *Atomic force microscopy imaging and pulling of nucleic acids. Review*, Curr. Opin. Struct. Biol., 2004, Vol. 14, No. 3, 380–5.
- [118] FISHER T.E., MARSZALEK P.E., FERNANDEZ J.M., *Stretching single molecules into novel conformations using the atomic force microscope. Review*, Nat. Struct. Biol., 2000, Vol. 7, No. 9, 719–24.
- [119] STEINBERG D.M., ALI S.Z., *Application of virtual microscopy in clinical cytopathology*, Diagn. Cytopathol., 2001, Vol. 25, No. 6, 389–96.



Mikroskop sił atomowych BioScope Catalyst firmy Bruker

- AFM zapewniający najlepszą integrację z mikroskopami optycznymi
 - Integracja w czasie rzeczywistym obrazu optycznego oraz AFM
 - Wysokorozdzielcze obrazowanie w powietrzu oraz w cieczach
 - Dedykowane rozwiązania do badań przeźyciowych komórek

ROZDZIAŁ 9

BADANIA ENDOSKOPOWE

Halina Podbielska, Igor Buzalewicz

Spis treści	
9.1. Wstęp	249
9.2. Budowa endoskopu	250
9.3. Zasady optyczne działania endoskopu	253
9.3.1. Działanie oka – powiększenie wizualne	254
9.3.2. Działanie lupy	255
9.3.3. Podstawy optyki endoskopu	256
9.3.3.1. Soczewkowy układ przenoszenia	257
9.3.3.2. Światłowodowy układ przenoszenia	259
9.3.3.3. Układ przenoszenia zbudowany ze światłowodów gradientowych	262
9.3.4. Układy odwracające w endoskopach	264
9.3.4.1. Soczewki	264
9.3.4.2. Zwierciadła	266
9.3.4.3. Pryzmaty	267
9.3.5. Układy oświetlenia	270
9.3.6. Czynniki wpływające na jasność obrazu w endoskopie	273
9.4. Nowoczesne techniki endoskopowe	274
9.4.1. Endoskopia wirtualna i endoskopia 3D	274
9.4.2. Endoskopia kapsułkowa	278
9.5. Podsumowanie	282

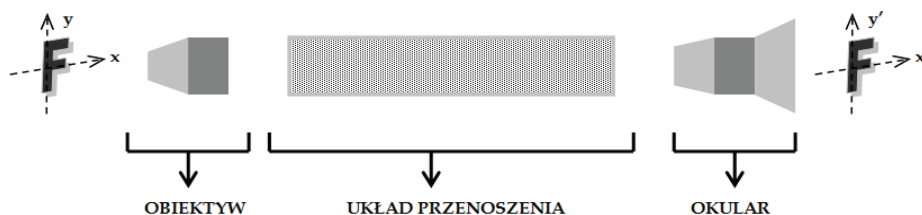
9.1. Wstęp

W książce „Mikroskopia optyczna” Prof. Pluta napisał na wstępie: „...*mikroskop jest instrumentem, w którym tkwią i skutecznie funkcjonują bodajże najbardziej fascynujące i oko cieszące zjawiska optyki fizycznej...*” [1]. Każdy, kto miał do czynienia z różnego typu endoskopami, czy to w laboratorium optycznym, czy to pracując z tym instrumentem w praktyce lekarskiej, czy też studiując literaturę przedmiotu, na pewno przy-

zna, że powyższe zdanie opisuje doskonale również naturę endoskopów. Endoskopy, czyli urządzenia pozwalające na inspekcję w trudnodostępnych miejscach, stosowane są od kilkudziesięciu lat nie tylko w medycynie [2, 3, 4, 5, 6], ale także i w technice [7, 8]. Tej tematyce, w aspekcie aplikacyjnym, poświęcone są też czasopisma, przykładowo: *Visible Human Journal of Endoscopy (VHJOE)* [9] i *Endoscopy* [10].

9.2. Budowa endoskopu

Współczesny endoskop jest urządzeniem składającym się z trzech zasadniczych części: źródła światła, kabla światłowodowego prowadzącego wiązkę oświetlającą oraz układu obrazującego, którego zadaniem jest przeniesienie obrazu z wnętrza ciała lub urządzenia technicznego na zewnątrz do obserwatora. Istnieje też dodatkowe oprzyrządowanie, umożliwiające przeprowadzenie niektórych zabiegów diagnostycznych lub terapeutycznych. Układ obrazujący endoskopu składa się z obiektywu, układu przenoszącego i okularu, przy czym układ przenoszący może stanowić system soczewek, soczewki Hopkinsa (ang. *rod lenses*) lub uporządkowana wiązka włókien światłowodowych. Schemat układu obrazującego przedstawiony jest na rys. 9.1.



Rys. 9.1. Schemat układu obrazującego endoskopu

Widzimy zatem, iż endoskop ma budowę zbliżoną do układu mikroskopowego (obiektyw, okular), jednak z tą różnicą, iż występuje w nim jeszcze jeden dodatkowy element, a mianowicie układ przenoszenia. W przypadku zwykłych mikroskopów obiektyw prowadzi do utworzenia obrazu pośredniego badanego przedmiotu, który jest następnie odwzorowywany bezpośrednio przez okular w celu uzyskania powiększonego prostego obrazu przedmiotu. W przypadku endoskopów, które są wykorzystywane do obserwacji trudnodostępnych przestrzeni, znajdujących się znacznej odległości od obserwatora, konieczne jest zastosowanie dodatkowych układów optycznych, które umożliwią przeniesienie obrazu obiektu na znaczną odległość od obiektywu. Rolę tę pełni właśnie układ przenoszenia, który może być traktowany jako układ optyczny przenoszący obraz obiektu z jednej pozycji do drugiej.

Jest on wykorzystywany nie tylko w endoskopach, lecz również w celownikach optycznych oraz peryskopach. Składa się on z szeregu układów odwracających obraz

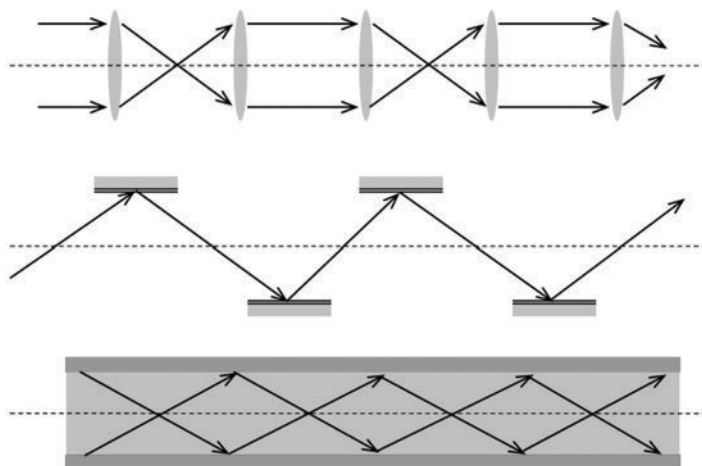
z jednostkowym powiększeniem poprzecznym. Układy te pozwalają na znaczne zwiększenie odległości pomiędzy obiektywem a okularum.

W celu przeniesienia obrazu stosuje się różne techniki związane z wykorzystaniem m.in. soczewek, zwierciadeł, pryzmatów, bądź też włókien światłowodowych. Przykładowe układy przeniesienia zostały przedstawione na rys. 9.2. To właśnie ze względu na rodzaj zastosowanego w endoskopie układu przenoszenia wprowadzono powszechny ich podział na: endoskopy sztywne i giętkie. W endoskopie sztywnym układ przenoszenia składa się z soczewek, które muszą być umieszczone w sztywnej obudowie, aby zapewnić prawidłową pracę toru optycznego (soczewki muszą być współosiowe, wyjustowane, w stałych odległościach). Natomiast w endoskopach giętkich, zwanych też fiberoskopami, układ przenoszenia stanowi wiązka światłowodów, dzięki czemu endoskop może być (w pewnych granicach) zginany.

Endoskop składa się ze źródła światła, kabla światłowodowego prowadzącego wiązkę oświetlającą oraz układu obrazującego.

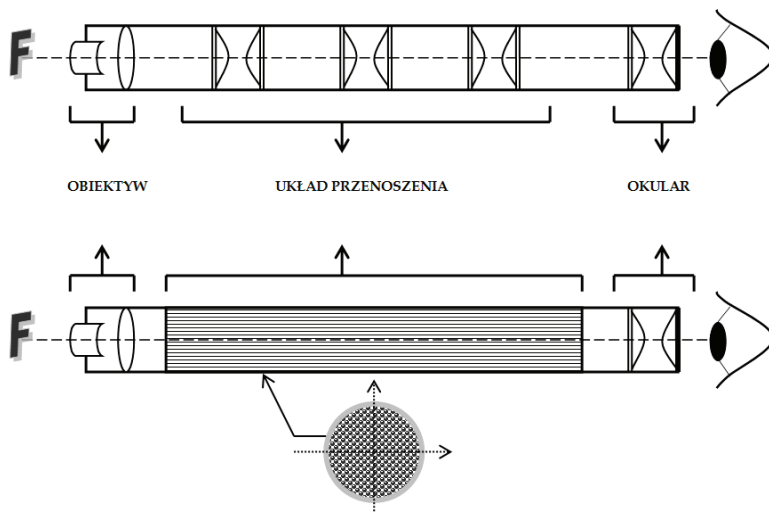
Układ obrazujący endoskopu składa się z obiektywu, układu przenoszącego i okularu.

Układ przenoszenia może być soczewkowy lub światłowodowy.



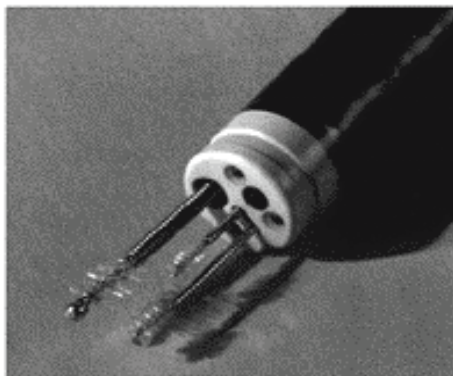
Rys. 9.2. Przykładowe techniki przenoszenia obrazu z wykorzystaniem soczewek (u góry), zwierciadeł (w środku) oraz włókien światłowodowych (na dole)

Rysunek 9.3 ilustruje budowę endoskopu sztywnego (soczewkowy układ przenoszenia obrazu) i endoskopu giętkiego (światłowodowy układ przenoszenia obrazu).



Rys. 9.3. Soczewkowy i światłowodowy układ przenoszenia obrazu w endoskopie

W endoskopach z elektronicznym układem przenoszenia głównym elementem optycznym układu obrazującego jest obiektyw, odwzorowujący obraz przedmiotu na element światłoczuły CCD. Stamtąd drogą elektroniczną obraz jest transmitowany bezpośrednio do monitora. Różne konstrukcje optyczne endoskopów światłowodowych, jak i zjawiska fizyczne z tym związane, przedstawione zostały w pracy [11]. Oprócz układów oświetlających i obrazowych, endoskopy posiadają też kanały instrumentacyjne, pozwalające na wsunięcie różnych manipulatorów np. nożyczek czy szczypczyków biopsyjnych (patrz rys. 9.4). Takie przyrządy optyczne umożliwiają lekarzom zarówno bezpośrednią obserwację i kontrolę całego zabiegu chirurgicznego w pobliżu operowanego narządu lub tkanki, jak i jego przeprowadzenie.



Rys. 9.4. Widok końca dalszego endoskopu i urządzeń dodatkowych wsuniętych przez kanały instrumentacyjne [12]

W praktyce klinicznej stosowane są obecnie różne endoskopy, zarówno sztywne, jak i giętkie – *fiberoskopy*. Ich nazwy związane są z miejscem diagnostyki:

- *gastroskop* służy do wziernikowania żołądka,
- *bronchoskop* do wziernikowania układu oddechowego,
- *atroskop* służy do badania stawów,
- *angioskop* do badania naczyń krwionośnych,
- *laparoskop* do badania jamy brzusznej,
- *hysteroskop* do badania jamy macicy,
- *ezofagoskop* do badania przełyku,
- *tracheoskop* do wziernikowania płuc/klatki piersiowej,
- *rektoskop* do wziernikowania jelit:
- *jejunoskop* – jelita cienkiego,
- *kolonoskop* – jelita grubego,
- *cystoskop* do badania pęcherza moczowego,
- *fetoskop* do diagnostyki płodu w jamie macicy.

Parametry optyczne endoskopów są w zasadzie podobne, różne są tylko ich rozmiary [13]. Zakres transmisji spektralnej jest w granicach 400–900 nm, powiększenie od 1 do 10 razy, głębia ostrości od 2 mm do kilku cm, pole widzenia od 10° do 50°. Ponadto endoskopy giętkie mają ruchome końcówki o promieniu kilku milimetrów i mogą się zginać w zakresie od -90° do $+90^\circ$, a w niektórych zastosowaniach kąt ten może być większy.

Chociaż endoskopia ma już swoje ustabilizowane miejsce w praktyce jako technika pozwalająca na inspekcję w trudnodostępnych środowiskach, jak jamy ciała czy wnętrza urządzeń technicznych, to jak dotąd, nie wyszła ona poza zakres metody czysto obserwacyjnej i zabiegowej. Połączenie endoskopii z metrologią może dać w efekcie możliwość także ilościowej oceny badanych endoskopowo obiektów.

9.3. Zasady optyczne działania endoskopu

Nazwa endoskop pochodzi z języka greckiego: **endo** od słowa *endon* = wewnątrz i **skop** od słowa *skopeo* = patrzeć. Pierwsze badania endoskopowe datuje się na początek XIX wieku. Używano wtedy rur, którymi za pomocą zwierciadła doprowadzano światło świecy do wnętrza. Obecnie endoskopy są urządzeniami w postaci cienkiego optycznego instrumentu, który jest wprowadzany do wnętrza organizmu przez otwory naturalne lub wytworzone sztucznie.

Endoskopy są urządzeniami używanymi coraz powszechniej, zarówno w diagnostyce, jak i podczas zabiegów i operacji chirurgicznych. Spowodowane jest to łatwością dostępu endoskopów do trudnodostępnych organów i możliwością przeprowadzania małoinwazyjnych bądź nieinwazyjnych zabiegów.

Funkcją endoskopu jest umożliwienie obserwacji obiektów niewidocznych podczas bezpośredniego oglądania, a więc znajdujących się w niedostępnych miejscach, jamach ciała, itp. [14]. Obraz obserwowanego obiektu musi być zgodny (poza ewentualną zmianą skali) z rzeczywistością. Ta identyczność pomiędzy obrazem i obiektem dotyczy nie tylko rozmiaru, ale także ostrości i proporcji góra–dół i prawo–lewo.

9.3.1. Działanie oka – powiększenie wizualne

Oko jest znakomitym przykładem naturalnego układu optycznego. W celu dokładnego scharakteryzowania procesu odwzorowania optycznego realizowanego przez oko ludzkie, najpierw wprowadzone zostaną pewne podstawowe pojęcia optyczne.

Układ optyczny – jest to układ powierzchni odbijających lub załamujących światło, który umożliwia tworzenie obrazów przedmiotów lub przetwarzanie wiązki światła [15]. Głównymi elementami układu optycznego są:

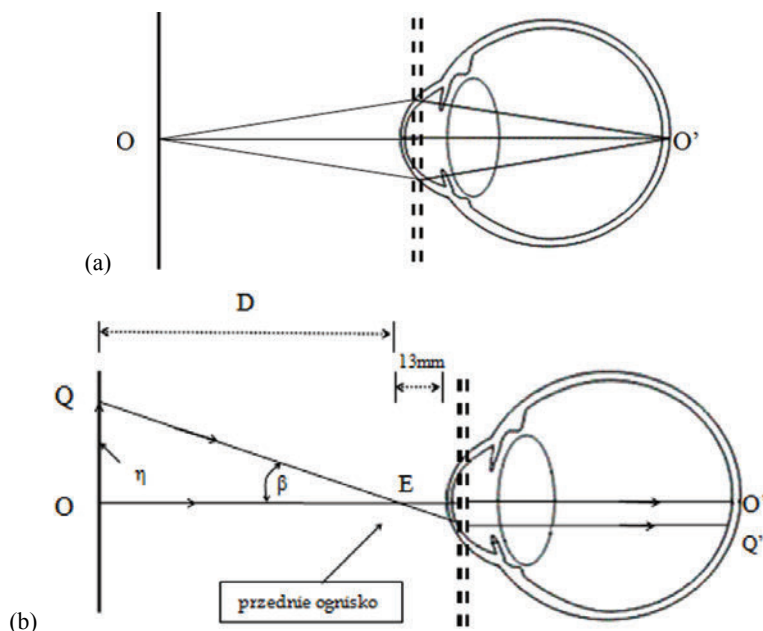
- *główna oś optyczna* – prosta łącząca środki krzywizny powierzchni łamiących układu optycznego;
- *ogniska* – punkty leżące na głównej osi optycznej; w których przecinają się promienie biegnące z nieskończoności (wiązka równoległa) po przejściu przez układ optyczny;
- *punkty węzłowe* – punkty przecięcia z główną osią optyczną promieni, które po przejściu przez układ optyczny ulegają tylko przesunięciu równoległemu;
- *płaszczyzny węzłowe* – płaszczyzny, dla których powiększenie kątowe wynosi (-1) ;
- *płaszczyzny główne* – płaszczyzny sprzężone, dla których powiększenie poprzeczne wynosi $(+1)$;
- *ogniskowa f* – odległość ogniska od najbliższej płaszczyzny głównej.

Narząd wzroku stanowi gałka oczna, która składa się z twardówki, rogówki, naczyniówki, tęczówki, siatkówki, soczewki i ciała szklanego. Z optycznego punktu widzenia najważniejsze są rogówka i soczewka, które są ogniskującymi elementami oka. Rogówka ma największą siłę łamiącą (48,83 D dla przedniej powierzchni rogówki i $-5,88$ D dla powierzchni tylnej), a soczewka odpowiedzialna jest za akomodację oka, czyli za zdolność oka do ostrego widzenia z określonej odległości (pomiędzy 250 mm a nieskończonością) [16]. Działanie oka demonstruje rys. 9.5. Z punktowego przedmiotu O wychodzą promienie, które są ogniskowane w ognisku O' na siatkówce (patrz rys. 9.5a). Linie przerywane oznaczają płaszczyzny główne układu optycznego oka.

Aby znaleźć wielkość obrazu (patrz rys. 9.5b), należy przeanalizować bieg promienia, który biegnie z górnego końca przedmiotu Q i przechodzi przez przednie ognisko oka E . Wielkość obrazu na siatkówce zależy od kąta β [14]. Kąt ten rośnie, gdy odległość D (od przedmiotu do przedniego ogniska) maleje, zgodnie z zależnością:

$$\beta = \frac{\eta}{D}, \quad (1)$$

gdzie: η – oznacza wysokość przedmiotu (OQ), a D – odległość przedmiotu do przedniego ogniska.



Rys. 9.5. Tworzenie obrazu przez oko

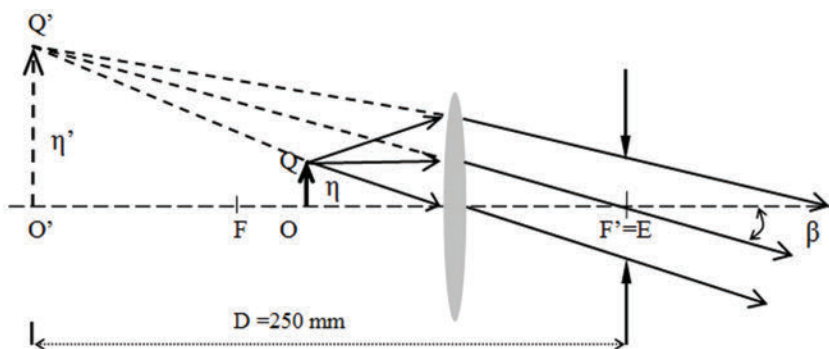
9.3.2. Działanie lupy

Okular endoskopu może być traktowany jako lupa, gdyż jego rola polega na utworzeniu powiększonego prostego obrazu przez obserwatora. Dlatego też przypomniany zostanie tutaj opis odwzorowania optycznego, realizowanego przez lupę. Lupa jest jednym z najprostszych, obok soczewki, zwierciadła i pryzmatu, układem optycznym [14]. Schemat działania lupy przedstawiono na rys. 9.6.

Obiekt o wysokości η (OQ) jest umieszczony w takiej odległości od soczewki, że promienie biegnące z punkt Q po przejściu przez soczewkę ukazują się w punkcie Q' , tak że płaszczyzna obrazu znajduje się w odległości 250 mm od obserwatora w punkcie E . Powiększenie poprzeczne obrazu M jest to wielkość charakteryzująca rozmiary obrazu optycznego, wytwarzanego za pomocą układu optycznego, w stosunku do rozmiaru przedmiotu [15]:

$$M = \frac{\eta'}{\eta}, \quad (2)$$

gdzie η oznacza wysokość przedmiotu (OQ), a η' wysokość obrazu ($O'Q'$).



Rys. 9.6. Działanie prostej lupy (objaśnienia w tekście)

Powiększenie przyrządu optycznego jest wielkością charakteryzującą warunki obserwacji obiektu za pomocą tego przyrządu, w porównaniu z warunkami obserwacji bez jego użycia [15]. Inaczej mówiąc, M jest to stosunek wielkości obrazu siatkówkowego uformowanego przy użyciu lupy zogniskowanej na odległość 250 mm do rozmiaru obrazu widzianego bezpośrednio z odległości 250 mm.

Rozdzielczość oka zależy od rozmiaru źrenicy. Optymalna rozdzielczość jest dla źrenicy o średnicy 2–3 mm. Można wtedy zobaczyć dwa obiekty oddalone od siebie o odległość kątową $\beta = 1$ min (dla odległości $D = 250$ mm wynosi ona 0,075 mm). Przyjmuje się, że rozdzielczość oka z odległości 250 mm wynosi 0,1 mm. Taka jest też granica rozdzielczości endoskopu pracującego z jednostkowym powiększeniem ($M = 1$). Jeżeli endoskop ma inne powiększenie, to granica rozdzielczości wynosi:

$$\eta = \left(\frac{0,1}{M} \right) \text{ mm.} \quad (3)$$

9.3.3. Podstawy optyki endoskopu

Jak już to było wspomniane powyżej, każdy wziernik składa się z trzech podstawowych części: obiektywu, układu przenoszenia oraz okularu. W tej części skupimy się zatem na odwzorowaniu optycznym realizowanym przez endoskopy o różnych układach przenoszenia. W przypadku współczesnych endoskopów możemy wyróżnić trzy podstawowe rodzaje układów przenoszenia, które znalazły praktyczne zastosowanie w konstrukcji endoskopów:

- zbudowane z soczewek (w endoskopach sztywnych),
- w postaci uporządkowanej wiązki włókien światłowodowych (w endoskopach giętkich),
- wykorzystujące włókna gradientowe GRIN (Gradient Index) w endoskopach sztywnych.

Poniżej przedstawione zostaną podstawy optyczne działania tych układów przenoszenia, jednakże wcześniej omówione zostaną główne zasady działania systemów optycznych. W ogólnym przypadku każdy układ optyczny może być traktowany jako układ przenoszenia, gdyż rolą układu optycznego jest przeniesienie informacji z przestrzeni przedmiotowej do przestrzeni obrazowej. Układy przenoszenia występują nie tylko w endoskopach, lecz również w innych układach, w których obrazowany obiekt znajduje się w pewnej odległości od obserwatora np. w peryskopach. W wielu układach układem przenoszenia jest wolna przestrzeń. Układy te mają zazwyczaj powiększenie poprzeczne zbliżone do jedności, ale mogą mieć i inne. Właściwości tych układów charakteryzuje niezmiennik Lagrange'a–Helmholtza [17, 18]:

$$n\eta\theta_a = \text{const} . \quad (4)$$

gdzie n oznacza współczynnik załamania, η wysokość przedmiotu, a θ_a kąt aperturowy.

Kolejnym warunkiem opisującym układy przenoszenia, jest relacja wiążąca powiększenie kątowe ϕ z powiększeniem poprzecznym M :

$$\phi = M^2 . \quad (5)$$

Niezmiennik (4) może zostać wykorzystany do sprawdzenia, czy zaprojektowany układ przenoszenia będzie odpowiedni do zastosowanego obiektywu oraz okularu wziernika. Jak wiadomo, obiektyw ma pewną ściśle określoną aperturę numeryczną, zdefiniowaną przez kąt aperturowy θ_a i tworzy obraz obiektu o określonej wysokości η' w ośrodku o współczynniku załamania n . Tym samym układ przenoszenia z nim współpracujący powinien charakteryzować się niezmiennikiem o tej samej wartości, jak obiektyw wziernika. Jednocześnie zgodnie z zależnością (5) widzimy, że układy o jednostkowym powiększeniu poprzecznym, mają w tym przypadku takie samo jednostkowe powiększenie kątowe. Ta symetria sprawia, iż odpowiednia korekcja obiektywu pozwala na wyeliminowanie aberracji poprzecznych (np. komy, dystorsji), gdyż układ przenoszenia ich nie wprowadza, lecz może jedynie przenosić te aberracje, jeżeli obiektyw nie zostanie poprawnie skorygowany. Z kolei aberracje podłużne np. aberracja chromatyczna, przenoszone są z powiększeniem kątowym równym M^2 .

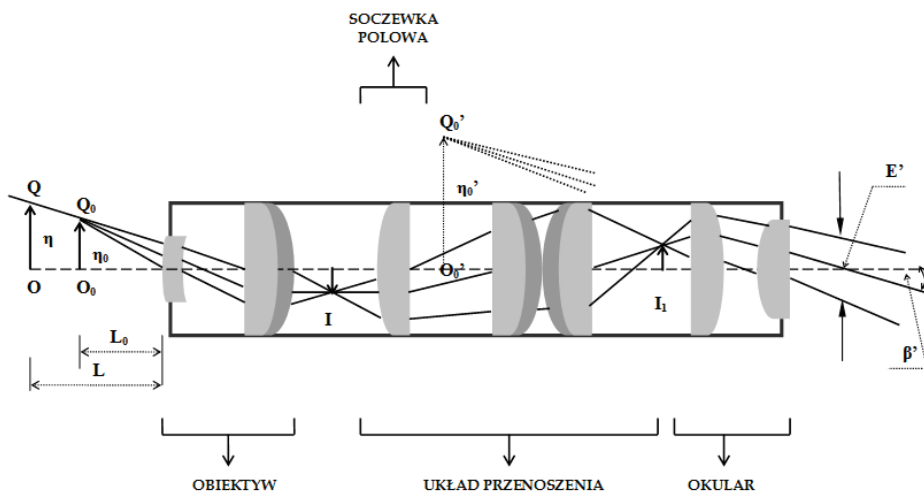
9.3.3.1. Soczewkowy układ przenoszenia

Podstawowe optyczne składniki endoskopu soczewkowego przedstawione są na rys. 9.7. W każdym endoskopie wyróżnić możemy trzy podstawowe elementy:

- *układ obiektywu* – jest to kombinacja soczewek, które dają w płaszczyźnie I odwrócony obraz przedmiotu O_0Q_0 , znajdującego się w odległości L_0 . Obraz ten jest następnie odwzorowywany przez układ przenoszenia.
- *układ przenoszenia* – składa się z soczewki polowej i obiektywu przenoszenia. Formuje obraz I w płaszczyźnie I_1 z jednostkowym powiększeniem. W endo-

skopach może być wiele takich układów przenoszenia, które mogą tworzyć kolejne (I_1, I_2, \dots) obrazy I .

- *okular* – system złożony z soczewki polowej i lupy. Soczewka polowa jest pierwszą soczewką okularu. Obraz końcowy przedmiotu odwzorowywanego przez endoskop (w tym przypadku – I_1) widziany jest przez okular, który daje powiększony obraz urojony O_0Q_0' w $O'_0Q'_0$. Widziane jest to przez obserwatora w punkcie E' .



Rys. 9.7. Odzworowanie optyczne w endoskopie soczewkowym

Jeżeli endoskop znajduje się w odległości L_0 od obiektu, takiej że końcowy obraz znajduje się 250 mm od oka obserwatora, to wtedy optyczne powiększenie jest równe liniowemu powiększeniu pomiędzy obiektem i obrazem. Powiększenie to jest iloczynem liniowego powiększenia obiektywu i optycznego powiększenia okularu.

W przypadku, gdy odległość od obiektu jest większa od L_0 ($L > L_0$) obraz jest utworzony dalej od punktu E' , ale dzięki akomodacji oka może być widziany równie ostro. Jeżeli promień wychodzący z punktu Q leżącego w odległości L (patrz rys. 9.7), przechodzi przez punkt Q_0 , leżący w odległości L_0 , to obraz obydwu obiektów ($\eta = OQ$ i $\eta_0 = O_0Q_0$). Wynika z tego, że powiększenie liniowe M dla odległości L jest mniejsze niż dla L_0 i wynosi:

$$M = \frac{\eta_0}{\eta} M_0 = \frac{L_0}{L} M_0. \quad (6)$$

Widzimy zatem, iż liniowe powiększenie jest odwrotnie proporcjonalne do odległości obiektu. Inną ważną kwestią, oprócz powiększenia endoskopu jest obracanie obrazu i rola soczewki polowej.

Powiększenie obiektywu jest ujemne, zatem obraz utworzony przez obiektyw jest obrocony. Układ przenoszenia ma także powiększenie ujemne. Ponieważ powiększenie okularu jest dodatnie, to aby końcowy obraz, widziany przez obserwatora był prosty, układ przenoszenia musi obrócić obraz, a więc musi składać się z nieparzystej liczby układów soczewkowych.

W endoskopach powiększenie liniowe zależy od odległości obrazu o endoskopu. Przedmioty położone dalej są bardziej pomniejszone w przestrzeni obrazowej.

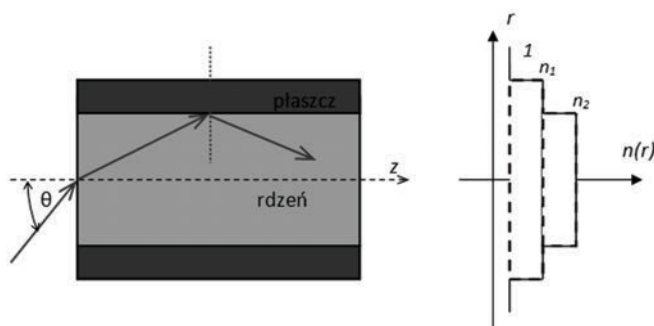
Soczewkowy układ przenoszenia musi się składać z nieparzystej liczby układów soczewkowych

Natomiast obecność soczewki polowej w układzie przenoszenia jest niezbędna, ponieważ bez niej wiązka promieni po przejściu przez płaszczyznę obrazową I zostałaby obcięta przez ściany endoskopu (zjawisko to nosi nazwę winietowania). Tylko promienie ze środka wiązki mogłyby być przeniesione przez dalsze elementy układu przeniesienia, co wiązałoby się z ograniczonym polem widzenia. Zadaniem soczewki polowej jest więc załamanie promieni w taki sposób, aby środkowy promień wiązki przeszedł centralnie przez układ przenoszenia.

Soczewka polowa zapobiega winietowaniu wiązki świetlnej przez ściany endoskopu.

9.3.3.2. Światłowodowy układ przenoszenia

Zastosowanie włókien światłowodowych w endoskopach przyczyniło się w znaczny sposób do rozwoju tej techniki diagnostycznej, ponieważ umożliwiło konstrukcję giętkich wzierników, które są w stanie dotrzeć w bardziej komfortowy dla pacjenta sposób do



Rys. 9.8. Bieg promieni we włóknie światłowodowym o skokowym profilu zmian współczynnika załamania

przestrzeni niedostępnych dla endoskopów sztywnych. Jednocześnie włókna światłowodowe umożliwiają przewodzenie światła na znaczne odległości z niewielkimi stratami. Włókna te wykonywane są z dwóch materiałów o różnych współczynnikach załamania (n_1, n_2). Rdzeń włókna jest wykonany z materiału o większym współczynniku załamania n_2 , podczas gdy płaszcz otaczający rdzeń, jest wykonany z materiału o mniejszym współczynniku załamania n_1 . Dzięki różnicy współczynników załamania ($n_1 < n_2$), na granicy ośrodków pomiędzy płaszczem a rdzeniem włókna, mamy do czynienia z całkowitym wewnętrznym odbiciem światła (patrz rys. 9.8).

Maksymalny stożek promieni świetlnych, które będą transmitowane przez włókno światłowodowe, opisuje maksymalna apertura numeryczna NA (patrz rys. 9.9), którą wyznaczyć można, korzystając z warunku na kąt graniczny, pod jakim musi padać promień świetlny na granicę płaszcz–rdzeń, aby zaszło całkowite wewnętrzne odbicie [19]:

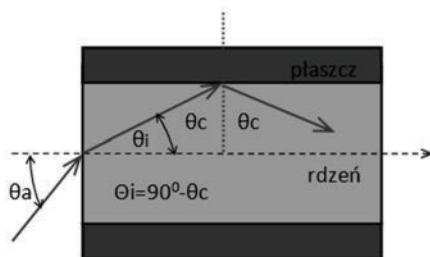
$$\sin(\theta_c) = \frac{n_1}{n_2}. \quad (7)$$

Zakładając, że włókno znajduje się ośrodku o współczynniku załamania światła równym n_0 , wówczas:

$$n_0 \sin(\theta_a) = n_2 \sin(\theta_i) \quad (8)$$

i dodatkowo $\theta_i = 90^\circ - \theta_c$, zatem ostatecznie otrzymujemy następującą zależność na aperturę numeryczną włókna światłowodowego pracującego w powietrzu:

$$NA = n_0 \sin(\theta_a) = n_0 n_2 \cos(\theta_c) = n_0 n_2 \sqrt{1 - \sin^2(\theta_c)} = n_0 \sqrt{n_2^2 - n_1^2}. \quad (9)$$

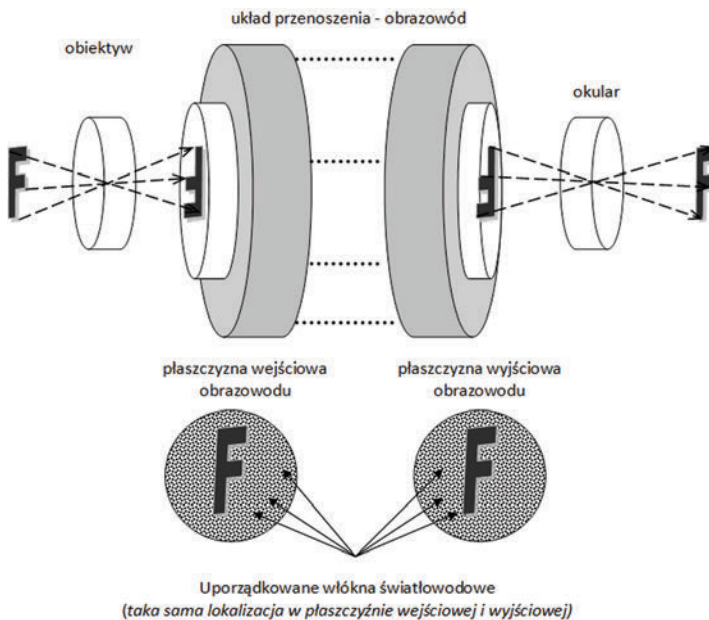


Rys. 9.9. Określenie apertury numerycznej włókna światłowodowego znajdującego się ośrodku o współczynniku załamania n_0

Średnica pojedynczego włókna wynosi od 5 do 12 mikrometrów, tym samym w celu przeniesienia całego obrazu z jednego końca układu przenoszenia na drugi, konieczne jest zastosowanie kilkudziesięciu lub nawet kilkuset włókien światłowodowych. W endoskopach stosuje się zazwyczaj światłowodowe układy przenoszenia w postaci

wiązki włókien. Jednocześnie z uwagi na fakt, iż obraz wyjściowy na powierzchni wyjściowej takiego układu przenoszenia musi być identyczny z obrazem utworzonym na jego powierzchni wejściowej, konieczne jest użycie uporządkowanej wiązki włókien światłowodowych (patrz rys. 9.10). Taką uporządkowaną wiązkę włókien światłowodowych, których obie końcówki mają identyczną lokalizację przestrzenną na powierzchni wyjściowej oraz wejściowej pęku światłowodów, nazywamy w optyce obrazowodem. Omawiany element optyczny pełni w tym przypadku rolę układu przenoszenia, gdyż obraz utworzony na jego powierzchni wejściowej jest przenoszony z jednostkowym powiększeniem na powierzchnię wyjściową. Zastosowanie okularu umożliwia zarówno rejestrację wizualną, jak również cyfrową obrazu badanego obiektu znajdującego się na powierzchni wyjściowej obrazowodu.

Zastosowanie obrazowodu – uporządkowanych włókien światłowodowych przyczyniło się do bardziej powszechnego rozwoju wzierników giętkich, które w przeciwieństwie do sztywnych wzierników soczewkowych z układami odwracającymi, są bardziej elastyczne, dzięki czemu mogą być wyginane w pewnym zakresie kątowym, a tym samym mogą dotrzeć do trudno dostępnych przestrzeni np. układu pokarmowego. Jednocześnie mogą one mieć również dowolną długość, co umożliwia obserwację obrazów obiektów położonych w znacznych odległościach od obserwatora lub też innego detektora. W przypadku układu przenoszenia w postaci obrazowodu, zdolność rozdzielcza takiego układu jest uzależniona od rozmiarów włókien światłowodowych oraz ich liczby.



Rys. 9.10. Schemat przenoszenia obrazu w endoskopie światłowodowym

9.3.3.3. Układ przenoszenia zbudowany ze światłowodów gradientowych

W poprzedniej części zaprezentowane zostały endoskopy, w których układ przenoszenia tworzyły uporządkowane włókna światłowodowe o skokowej zmianie profilu współczynnika załamania pomiędzy rdzeniem a płaszczem. Jednakże istnieje jeszcze inna grupa światłowodów w specyficzny sposób transmitujących światło, które są wykorzystywane w urządzeniach wziernikujących [13]. Są to tzw. światłowodów gradientowe, czyli takie, których profil zmian współczynnika załamania pomiędzy płaszczem a rdzeniem zmienia się radialnie lub sferycznie.

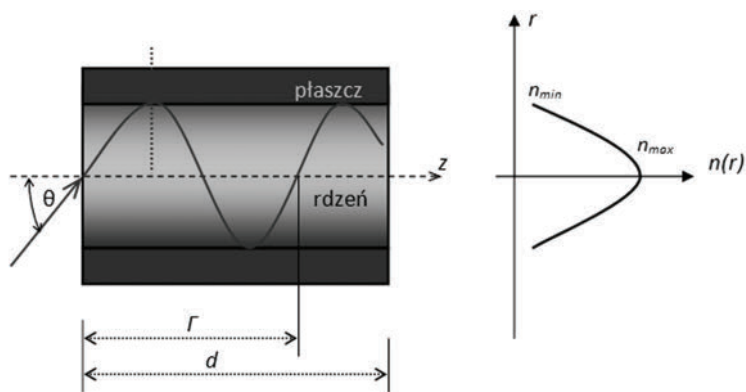
Zazwyczaj stosowane są radialne włókna gradientowe. Bieg promienia w takim włóknie oraz jego przekrój został pokazany na rys. 9.11, gdzie d oznacza długość włókna, a r promień biegnący włókna. W radialnych włóknach gradientowych typu SELFOC rozkład radialny współczynnika załamania może być opisany w następującej postaci [19]:

$$n(r) = n_{\max} \left(1 - \frac{a}{2} r^2 \right), \quad (10)$$

gdzie a oznacza pewną dodatnią stałą. Promień wchodzący do włókna pod kątem θ w punkcie osiowym powierzchni wejściowej biegnie przez nie po sinusoidzie o długości okresu Γ . Największy dopuszczalny kąt padania promienia na powierzchnię wejściową wynosi [20]:

$$\theta_a = \arcsin(n_{\max} R \sqrt{a}), \quad (11)$$

gdzie R jest promieniem włókna.



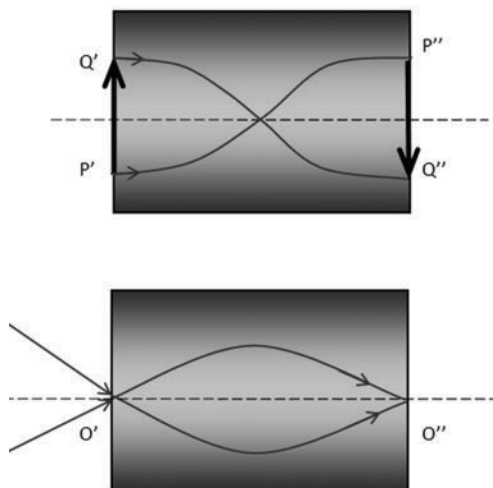
Rys. 9.11. Bieg promienia w gradientowym włóknie światłowodowym oraz profil zmian jego współczynnika załamania

Dodatkowo łatwo wykazać, iż okres sinusoidy po jakiej biegnie w tym włóknie promień świetlny jest równy:

$$\Gamma = \frac{2\pi}{\sqrt{a}}. \quad (12)$$

W zależności od długości włókna d , może się ono zachowywać, jak soczewka dodatnia, ujemna, płytka płasko równoległa (bez lub z inwersją obrazu) lub układ afokalny; w zależności od wartości długości włókna w stosunku do okresu sinusoidy Γ [20]:

- $d < \Gamma/4$: równoległa wiązka promieni jest ogniskowana w pewnej odległości za wyjściową powierzchnią włókna. W płaszczyźnie tej powstaje odwrócony obraz odległego przedmiotu;
- $d = \Gamma/4$: wiązka równoległa jest ogniskowana na powierzchni wyjściowej włókna;
- $d < \Gamma/2$: w pewnej odległości za powierzchnią wyjściową włókna powstaje odwrócony obraz przedmiotu leżącego w pewnej odległości przed powierzchnią wejściową włókna;
- $d = \Gamma/2$: w tej sytuacji włókno to może być układem afokalnym, tzn. równoległa wiązka światła wchodząca do włókna wychodzi z niego również jako wiązka równoległa, lub też na powierzchni wyjściowej włókna tworzy się obraz przedmiotu znajdującego się na powierzchni wejściowej (patrz rys. 9.12).



Rys. 9.12. Działanie włókna gradientowego o długości $d = \Gamma/2$

Oczywiście odwzorowanie obrazu przedmiotu znajdującego się na wejściu włókna uzależnione jest zarówno od średnicy samego włókna, jak również wielkości tego przedmiotu. Właściwości radialnych włókien gradientowych są podobne, jak w przypadku soczewek gradientowych. W ogólnym przypadku włókna o bardzo dużej średnicy można traktować właśnie jako soczewki gradientowe. W przypadku wykorzystania radialnych włókien gradientowych w endoskopach najważniejszym zagadnieniem

jest możliwość odwzorowania na wyjściowej powierzchni włókna gradientowego (soczewki gradientowej) obrazu przedmiotu znajdującego się na powierzchni wejściowej, co ma miejsce, gdy $d = \Gamma/2$. Jednocześnie, w tym przypadku, taki element optyczny jest tożsamy z układem odwracającym.

Podobnie, jak w przypadku endoskopów z wiązką włókien światłowodowych ze skokową zmianą współczynnika załamania, w endoskopach ze światłowodami gradientowymi układ przenoszenia ma postać uporządkowanego pęku radialnych włókien światłowodowych. Z uwagi na fakt, iż włókna te są znacznie bardziej kruche, a tym samym mniej elastyczne niż włókna ze skokową zmianą współczynnika załamania, endoskopy wykorzystujące ten układ przenoszenia są wziernikami sztywnymi i nie mają możliwości zginania się. Jednakże średnica tych włókien jest znacznie mniejsza niż średnica włókien ze skokową zmianą współczynnika załamania, zatem możliwe jest uzyskanie w tym przypadku znacznie większej rozdzielczości.

9.3.4. Układy odwracające w endoskopach

Obraz endoskopowy musi jak najwierniej oddawać obraz rzeczywistego obiektu tzn. powinien być on mieć odpowiednią orientację przestrzenną oraz zachowaną symetrię. Obraz utworzony przez obiektyw endoskopu, stanowiący pierwszy element optyczny odwzorowujący badany obiekt, jest odwrócony. Stosowane układy przenoszenia, jak to już było wspomniane powyżej, mogą opierać się na elementach optycznych, które przenosząc obraz przedmiotu na znaczne odległości od obiektywu, mogą go kolejno odwracać, jak ma to miejsce w przypadku soczewek, lub też przenosić go bez odwracania, gdy mamy do czynienia np. ze pękiem włókien światłowodowych. W tym ostatnim przypadku konieczne jest zatem zastosowanie dodatkowych układów odwracających w endoskopie. Proces ten mogą realizować m.in. takie elementy optyczne jak soczewki, pryzmaty lub też zwierciadła. W niniejszej części scharakteryzowane zostanie działanie układów odwracających.

9.3.4.1. Soczewki

Z podstaw optyki geometrycznej wiadomo, iż wzór soczewkowy opisuje relację pomiędzy odległością l od soczewki odwzorowywanego przez nią przedmiotu, odległością l' , w jakiej utworzony zostanie obraz tego przedmiotu oraz wielkością charakteryzującą tę soczewkę, czyli jej odległością ogniskową f :

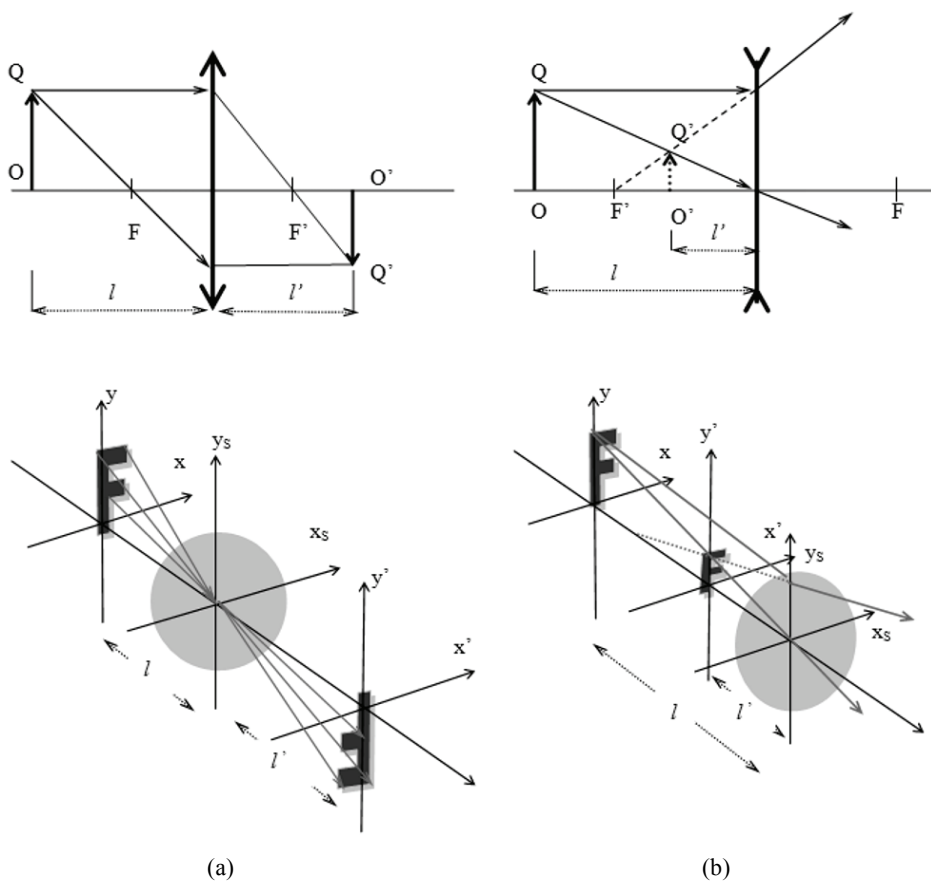
$$\frac{1}{l'} - \frac{1}{l} = \frac{1}{f}. \quad (13)$$

W soczewkach inwersja ma miejsce wokół dwóch osi – pionowej i poziomej, czyli że obraz może być obrócony góra–dół i lewa-prawa strona. Odwrócenie obrazu w so-

czewkach zależy od tego, czy jest to soczewka dodatnia, czy ujemna (patrz rys. 9.13). Poniższe rozważania dotyczą tylko tzw. soczewek cienkich. W soczewkach dodatnich, obiekt i jego obraz znajdują się po przeciwnych stronach soczewki. Powstały obraz jest obrocony (oprócz zmiany skali) o 180° względem osi optycznej. Góra obiektu staje się dołem, a strona prawa, lewą. Jest to tzw. *inwersja soczewkowa*. Powiększenie soczewki dodatniej wynosi:

$$M = -\frac{l'}{l}, \quad (14)$$

gdzie: l oznacza odległość soczewki od obiektu, a l' odległość soczewki od obrazu.



Rys. 9.13. Odzworowanie optyczne przez soczewki oraz inwersja obrazu:
(a) dodatnie (obraz odwrócony), (b) ujemne (obraz prosty)

Powiększenie ma znak ujemny (obraz jest odwrócony), ponieważ, gdy soczewka traktowana jest jako początek układu współrzędnych, to l jest ujemne, a l' dodatnie.

Aby końcowy obraz endoskopowy był prosty, konieczne jest zastosowanie parzystej liczby faz, czyli parzystej liczby soczewek dodatnich.

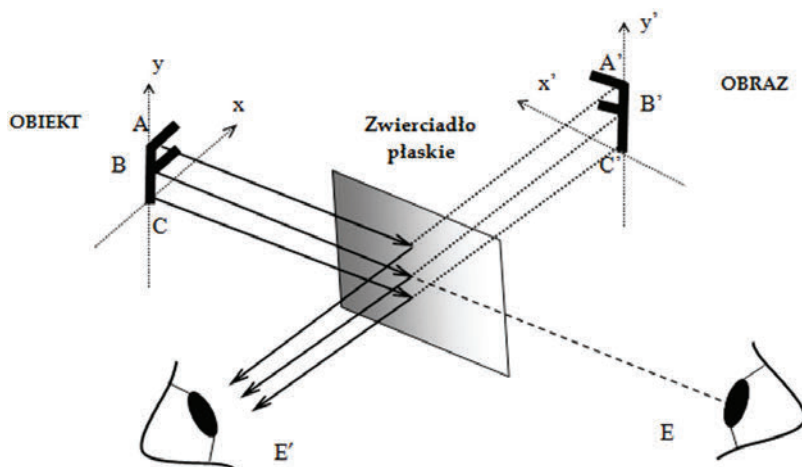
W soczewkach ujemnych, zarówno obiekt, jak i obraz, znajdują się po tej samej stronie soczewki. Powstały obraz jest prosty, a powiększenie wyznacza się w taki sam sposób, jak w przypadku soczewki dodatniej, ale jest w tym przypadku jest ono dodatnie:

$$M = \frac{l'}{l} \quad (15)$$

Jest to spowodowane tym, że obraz i obiekt są po tej samej stronie soczewki i odległości l i l' mają znak dodatni.

9.3.4.2. Zwierciadła

Jak zostało wspomniane wcześniej, soczewka dodatnia odwraca obraz zarówno góra–dół, jak i lewa–prawa. Natomiast w zwierciadłach inwersja ma miejsce tylko wokół jednej osi, prawa–lewa. Promienie padające na zwierciadło płaskie ulegają odbiciu zgodnie ze znanym z optyki geometrycznej prawem odbicia (patrz rys. 9.14). Obserwator widzi zatem obiekt w układzie współrzędnych (x', y', z') , który został przez zwierciadło przekształcony z układu prawoskrętnego (x, y, z) w układ lewoskrętny. Oznacza to, iż obserwator E patrzy bezpośrednio na obiekt, natomiast obserwator w punkcie E' patrzy na zwierciadło, na którym widzi odbicie przedmiotu. Obraz ten jest odbity wokół pionowej osi. Odbicie zwierciadła można skorygować tylko poprzez



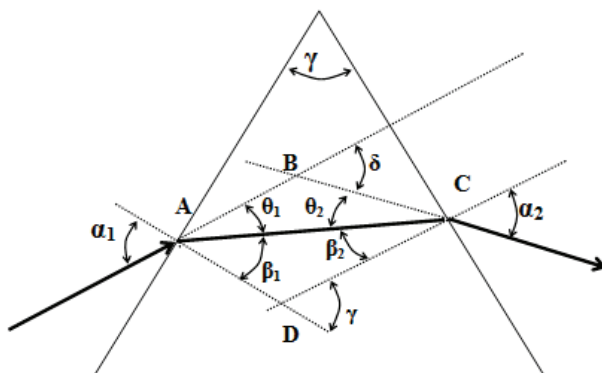
Rys. 9.14. Odzworowanie przez zwierciadło płaskie

wprowadzenie drugiego kompensacyjnego odbicia lustrzanego, a więc, aby obraz był prosty, konieczna jest parzysta liczba odbić (tak jak w przypadku soczewek).

W endoskopie musi być parzysta liczba inwersji, aby końcowy obraz odpowiadał obiektowi.

9.3.4.3. Pryzmaty

Pryzmat jest to bryła z przezroczystego materiału (szkło, kwarc), ograniczona przez dwie płaszczyzny [21]. Pryzmaty stosuje się w różnych przyrządach, gdzie służą do odwrócenia obrazu lub zmiany kierunku biegu światła. Na ograniczających bryłę pryzmatu płaszczyznach załamuje się światło, a kąt, który tworzą ze sobą te płaszczyzny, nazywamy kątem łamiącym pryzmatu (γ). Promień padający na pryzmat ulega podwójnemu załamaniu (patrz rys. 9.15).



Rys. 9.15. Bieg promieni w pryzmacie

Kąt, który tworzą ze sobą promień padający i załamany to kąt odchylenia δ . Jeżeli α_1 to kąt padania na pierwszą ścianę pryzmatu, β_1 – kąt załamania, natomiast kąt padania na drugą ścianę to β_2 , a kąt załamania α_2 , to można powiedzieć, że:

$$\delta = \theta_1 + \theta_2 \quad (\text{patrz trójkąt } ABC) \quad (16)$$

oraz

$$\gamma = \beta_1 + \beta_2 \quad (\text{patrz trójkąt } ADC). \quad (17)$$

Przekształcając wzór (16) otrzymujemy:

$$\delta = (\alpha_1 - \beta_1) + (\alpha_2 - \beta_2). \quad (18)$$

Ze wzorów (17) i (18) wynika natomiast:

$$\delta = \alpha_1 + \alpha_2 - \gamma. \quad (19)$$

Ze wzoru (19) widać, że δ zależy od kąta padania promieni na pryzmat – α_1 . W zależności od ustawienia pryzmatu w stosunku do wiązki promieni, odchylenie tej wiązki jest różne. Można jednak ustalić taki kąt padania wiązki na pryzmat, aby kąt odchylenia wiązki był najmniejszy. Odchylenie minimalne występuje, gdy bieg promieni w pryzmacie jest symetryczny, czyli:

$$\alpha_1 = \alpha_2 \quad i \quad \beta_1 = \beta_2 \quad (20)$$

Podstawiając to do wzorów (6) i (8) otrzymujemy:

$$\alpha = \frac{1}{2}(\gamma + \delta_{MIN}), \quad (21)$$

oraz

$$\beta = \frac{1}{2}\gamma, \quad (22)$$

gdzie δ_{MIN} oznacza kąt minimalnego odchylenia.

Zarówno γ , jak i δ_{MIN} można wyznaczyć doświadczalnie za pomocą spektrometru. Mając te dwie wartości można obliczyć współczynnik załamania środowiska, do którego promień wchodzi, względem środowiska, z którego wychodzi. Ponieważ współczynnik załamania jest równy stosunkowi sinusa kąta padania do sinusa kąta załamania:

$$n = \frac{\sin \alpha}{\sin \beta}, \quad (23)$$

zatem, podstawiając do wzoru (23) wzory (21) i (22), otrzymujemy ostatecznie:

$$n = \frac{\sin \frac{\gamma + \delta_{MIN}}{2}}{\sin \frac{\gamma}{2}}. \quad (24)$$

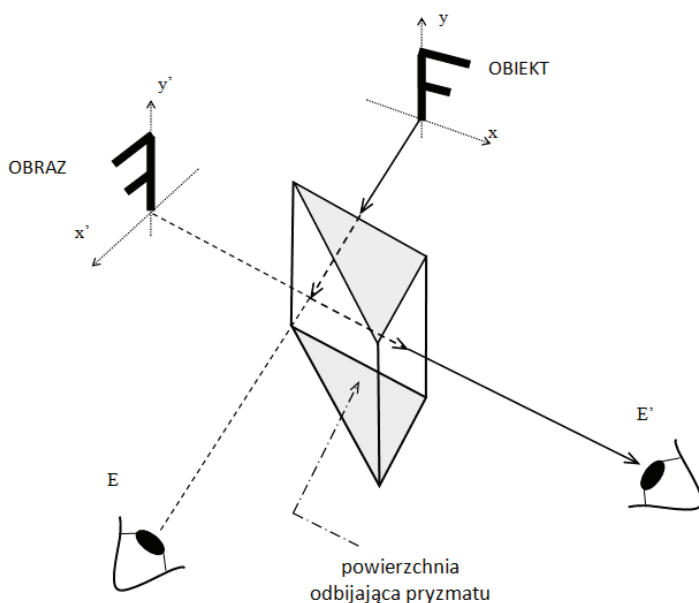
Ze względu na zastosowanie pryzmaty dzielimy na:

- *Pryzmaty spektralne (rozszerzające)* – w tym przypadku światło, które nie jest światłem monochromatycznym, zmienia swój kierunek i ulega rozszczepieniu. Zjawisko to wykorzystywane jest m.in. w spektroskopach, ale w instrumentach służących do obserwacji (jak endoskopy) jest niepożądane. Aby uzyskać załamanie promieni bez ich rozszczepienia, stosuje się *pryzmaty achromatyczne*.

- *Pryzmaty odbijające* – są to pryzmaty całkowicie odbijające światło. Pryzmaty te są najczęściej pryzmatami prostokątnymi, równoramiennymi. W zależności od ustawienia pryzmatu można otrzymać odbicie światła, np. o 90° lub odwrócenie wiązki promieni.

W celu uzyskania w endoskopie obrazu prostego lub skośnego, jego oś optyczna musi być odchylona w końcowej części instrumentu. Stosuje się do tego najczęściej pryzmaty odbiciowe. Pryzmaty są używane zamiast zwierciadeł, ponieważ są łatwe w montażu i zajmują mniej miejsca.

Obiektyw endoskopu daje obraz, który uległ pojedynczej inwersji. Przy użyciu obiektywu z pryzmatem odbijającym uzyskuje się inwersję lustrzaną (patrz rys. 9.16). Obraz ten jest przekazywany dalej i korygowany przez pryzmat (nazwijmy go – K). Stosuje się to przy nieparzystej liczbie faz przekazu.

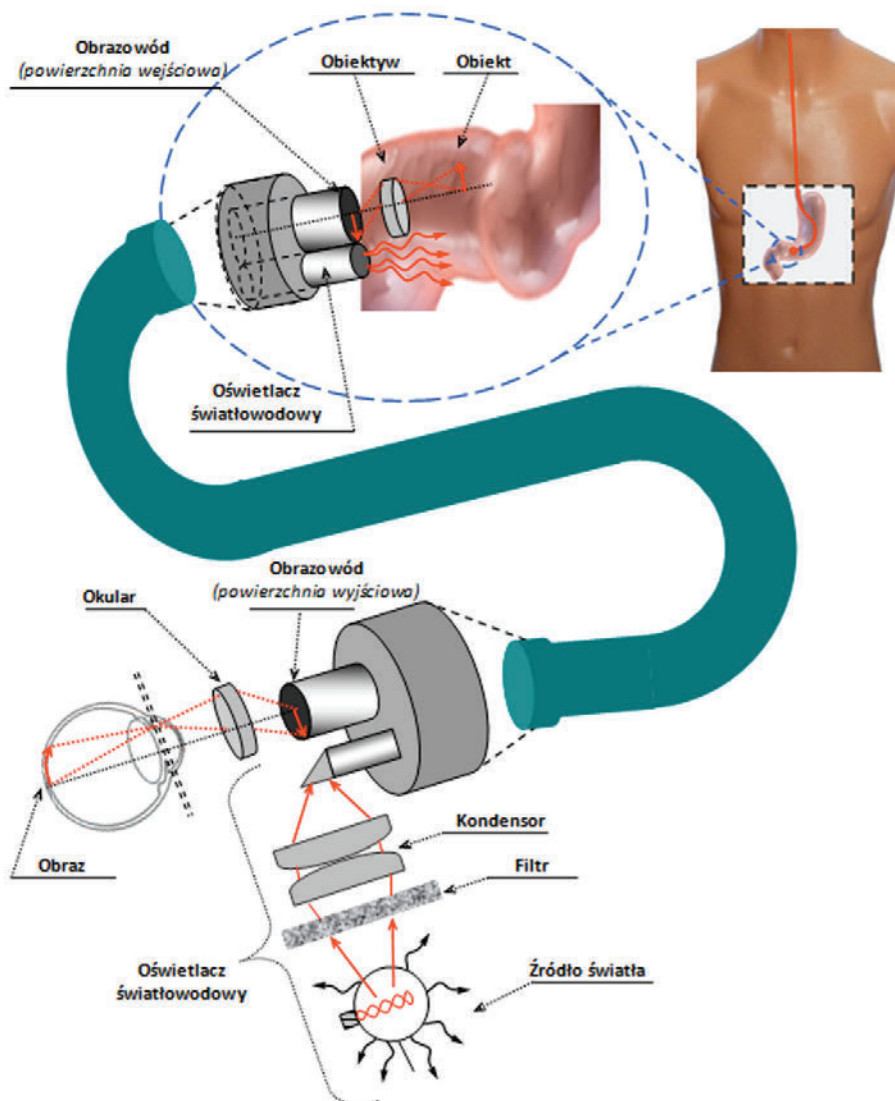


Rys. 9.16. Lustrzana inwersja uformowana przez pryzmat prosty

Gdy tych faz jest dużo, to pryzmat K zostaje obrócony wokół osi optycznej o 90° , w wyniku czego dwie inwersje lustrzane, wokół osi poziomej i pionowej, zostają zastąpione inwersją soczewkową. Czasami stosuje się tutaj tzw. pryzmat Amiciego. Zastępuje się nim odbijającą płaszczyznę przeciwprostokątną pryzmatu prostego. Ponieważ specyfika endoskopów wymaga stosowania pryzmatów o niewielkich rozmiarach (do 2 mm^2), a to utrudnia montaż, a więc zaleca się jednak używanie prostych pryzmatów.

9.3.5. Układy oświetlenia

Do lat 50. ubiegłego wieku niedostępne wnętrza jam, oglądane przez endoskopy, oświetlane były przez lampę z włókien wolframowych, która była umieszczana na końcu endoskopu, wprowadzanego do wnętrza jamy. Niestety technologia ta była niekorzystna z wielu powodów.

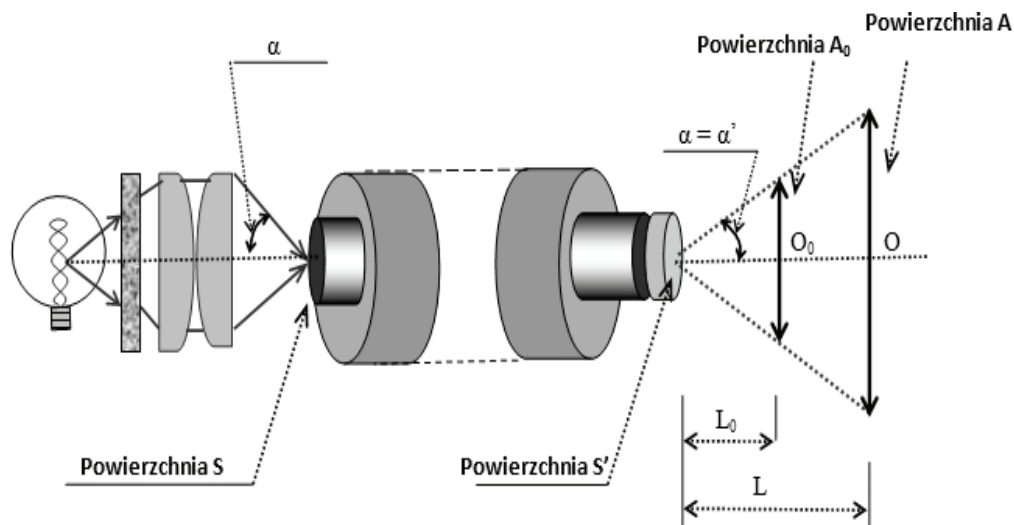


Rys. 9.17. Schemat endoskopu światłowodowego: układ oświetlający oraz obrazowód

Po pierwsze konieczne było wprowadzenie źródła światła do wnętrza ciała, co wiązało się z ryzykiem porażenia prądem. Poza tym w trakcie używania endoskopu wytwarzane było niepotrzebne ciepło. Sytuacja ta uległa radykalnej zmianie po wprowadzeniu włókien optycznych i źródeł światła o dużym natężeniu. Poprawiła się nie tylko jakość obrazu, ale także komfort badania i przeprowadzania zabiegów.

Kabel światłowodowy zbudowany jest z dużej ilości włókien szklanych, ułożonych w wiązki o średnicy 4–5 mm. Jeżeli wiązka ma służyć do oświetlania, to poszczególne włókna mogą być nieuporządkowane. Natomiast, jeśli wiązka światłowodowa ma służyć do przenoszenia obrazu optycznego, to włókna szklane muszą być uporządkowane w wiązce, ponieważ w innym przypadku transmitowany obraz byłby nierozpoznawalny. Uzyskujemy wówczas wspomniany powyżej obrazów. Włókna obrazowodu przenoszącego światło mają co najmniej 25 μm średnicy. Pojedyncze włókno składa się z rdzenia i płaszczka o grubości 1 μm . Schemat światłowodowego układu oświetlającego oraz obrazującego został przedstawionych na rys. 9.17.

Promienie świetlne wpadają do kabla światłowodowego pod kątem α i zostają wychwycone przez poszczególne włókna (patrz rys. 9.18). Wewnątrz włókna światło porusza się na skutek wewnętrznych odbić od powierzchni granicznych. W jednym metrze przewodu może wystąpić ponad 15 000 takich odbić. Jak już wspomniano, warunkiem całkowitego wewnętrznego odbicia, jest istnienie płaszczka włókna (przy czym współczynnik załamania płaszczka musi być mniejszy od współczynnika załamania rdzenia). Ewentualne nawet minimalne uszkodzenie płaszczka powoduje zmniejszenie ilości odbić promieni świetlnych, czego skutkiem jest mniejsza transmisja i spadek jakości oświetlenia.



Rys. 9.18. Oświetlacz światłowodowy: źródło światła i kabel światłowodowy

Źródło światła znajduje się na początku układu optycznego (patrz rys. 9.17 i 9.18). Bezpośrednio za nim umieszczony jest *filtr ciepła* oraz *kondensator*. Kondensator jest to układ optyczny skupiający światło, stosowany do bardzo silnego oświetlenia przedmiotu. Natomiast filtr służy do usuwania nadmiaru ciepła wytworzonego przez lampę. Ponieważ jego skuteczność nie jest 100%, więc stosuje się inne zabezpieczenia przed ciepłem. Włókna w wiązce są ze sobą połączone za pomocą żywic epoksydowych. Dodatkowo połączone są też końce wiązek, tworząc szklaną formę, powstałą na skutek stopienia części osłaniających włókna.

Na oświetlenie obrazu endoskopowego mają wpływ:

- Brak osłon na włóknach światłowodowych.
- Światło tracone przez odbicia na szklanych powierzchniach filtra ciepłego, kondensatora i końcowych powierzchniach włókien. Straty te wynoszą ok. 30%. Można je zredukować o ok. 10% poprzez częściowe zmatowienie powierzchni.
- Fakt, że tylko rdzeń włókna ma zdolność przewodzenia światła.
- Absorpcja światła w szklanych rdzeniach włókien. Całkowita transmisja dla światła białego, w dwumetrowym przewodzie, wynosi 40%. Większość strat absorpcyjnych dotyczy części widma w obszarze niebieskim. Poza tym, im dłuższy kabel światłowodowy, tym te straty są większe.
- Dopasowanie włókien z przewodu oświetlającego do włókien w endoskopie. Straty w tym przypadku związane są z tym, że poszczególne włókna przewodu oświetlającego i endoskopu nie leżą dokładnie naprzeciw siebie. Powoduje to wpadanie promieni świetlnych na osłony włókien i przestrzeń między nimi.
- Środowisko pracy endoskopu. Jeżeli włókna zostają umieszczone w powietrzu, to α' – kąt, pod jakim promienie wydostają się z endoskopu, jest równy kątowi α , pod którym promienie wpadają do endoskopu. Natomiast przy umieszczeniu włókien w środowisku wodnym, kąt α' ulega zmniejszeniu.

Poziom natężenia oświetlenia pola (A) zależy od luminancji źródła (B), od odległości obiektu od endoskopu (L), a także od wszystkich czynników wpływających na transmitancję poszczególnych elementów (patrz rys. 9.18) pomiędzy S_0 (powierzchnia źródła światła) i S' (powierzchnia końcowa endoskopu). Natężenie oświetlenia w obszarze A wynosi:

$$I = \frac{BTS'}{L^2}, \quad (25)$$

gdzie L – odległość obiektu do końcowej powierzchni endoskopu (S'), S' – końcowa powierzchnia endoskopu, B – luminancja źródła (inaczej jasność), T – całkowita transmitancja (cząstkowa transmitancja wszystkich elementów optycznych).

Z wzoru (16) wynika, że obszar A może być jasno oświetlony, gdy rośnie transmitancja, użyte zostanie źródło światła o lepszej luminancji lub też używane są wiązki światłowodowe o większym przekroju.

9.3.6. Czynniki wpływające na jasność obrazu w endoskopie

Poziom oświetlenia obrazu endoskopowego zależy od ilości doprowadzonego światła. Zgodnie ze wzorem (25), jest on odwrotnie proporcjonalny do kwadratu odległości L . Stożek promieni światła z włókna oświetla kolejno powierzchnie A_0 i A odpowiednio w odległości L_0 i L (patrz rys. 9.18).

$$\frac{I}{I_0} = \frac{A_0}{A} = \left(\frac{L_0}{L}\right)^2 \quad (26)$$

Światło wydostające się z oświetlacza endoskopu pada na obiekt (O). Ilość światła przyjmowanego przez stożek o kącie rozwarcia α ograniczona jest średnicą źrenicy wejściowej (h):

$$\sin \alpha = \frac{h}{L}. \quad (27)$$

Gdy kąt padania na powierzchnię A jest równy 2β (patrz rys. 9.18), to wymiar obiektu widzianego z odległości L wynosi:

$$\eta = L \operatorname{tg} \beta. \quad (28)$$

Całkowita ilość światła wchodzącego do endoskopu po odbiciu od jednolitej powierzchni wynosi:

$$E = IR(\pi\eta^2)(\pi \sin^2 \alpha), \quad (29)$$

gdzie: R – współczynnik odbicia badanej powierzchni, $\pi\eta^2$ – pole obiektu, $\pi \sin^2 \alpha$ – kąt stożka promieni z punktu O .

Korzystając z wzorów (26), (27) i (28), otrzymujemy:

$$E = \pi^2 \frac{R}{L^2} (h \operatorname{tg} \beta)^2. \quad (30)$$

Jak widać z powyższego wzoru, całkowita ilość światła wchodzącego do endoskopu po odbiciu od punktu O zależy od odległości od obiektu. Im dalej jest umieszczony endoskop, tym mniej światła do niego wchodzi.

Przez endoskop może być transmitowana duża ilość światła. Jest to jednak ograniczone przez wartość H^2 (H – niezmiennik optyczny w poszczególnych systemach), który wynosi:

$$H = n\eta \sin \alpha = n' \eta' \sin \alpha'. \quad (31)$$

Po podstawieniu powyższego wzoru do wzoru (29) okazuje się, że całkowita ilość światła wchodząca do endoskopu zależy właśnie od tego niezmiennika:

$$E = \left(\frac{\pi^2 IR}{n^2} \right) H^2. \quad (32)$$

9.4. Nowoczesne techniki endoskopowe

W obecnych czasach, zarówno w nowoczesnych technologiach, jak również diagnostyce medycznej, obserwuje się dwa główne trendy rozwoju, które obejmują miniaturyzację oraz wizualizację trójwymiarową (3D). Taki stan rzeczy dotyczy również techniki endoskopowej, gdzie wprowadzenie innowacyjnych rozwiązań niekiedy całkowicie zmienia podejście do zasad działania oraz budowy współczesnych wzierników medycznych. Poniżej przedstawione zostaną główne kierunki rozwoju technik wziernikowania.

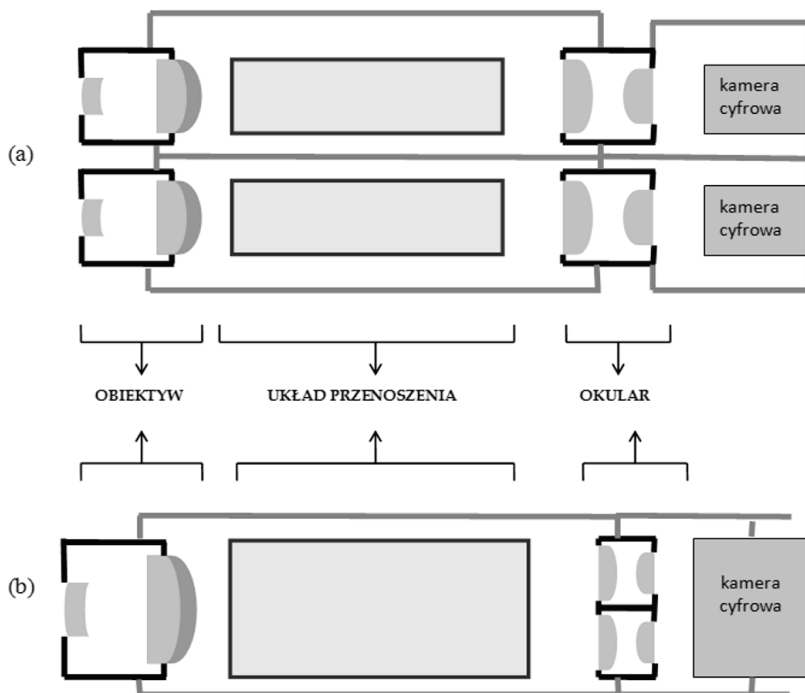
9.4.1. Endoskopia wirtualna i endoskopia 3D

Głównym zadaniem endoskopii medycznej jest wizualizacja i obrazowanie narządów, tkanek oraz innych obiektów anatomicznych, których lokalizacja uniemożliwia bezpośrednią obserwację. Powszechnie stosowane do tej pory wzierniki diagnostyczne oraz chirurgiczne, w przeciwieństwie np. do mikroskopów chirurgicznych, nie pozwalały obserwatorowi na widzenie stereoskopowe. Konwencjonalne techniki obrazowania optycznego umożliwiają jedynie dwuwymiarową rejestrację obiektów biologicznych.

Wyjątkiem są tu techniki holograficzne, które pozwalają na rekonstrukcję obrazów trójwymiarowych. W tym celu konieczne jest wprowadzenie dodatkowej wiązki odniesienia, która na drodze interferencji z wiązką przedmiotową utworzy obraz interferencyjny obiektu, który zostanie zapisany w materiale światłoczułym. Rekonstrukcja tego interferogramu poprzez wiązkę odniesienia lub wiązkę sprzężoną prowadzić będzie do obserwacji wizualnej obrazu trójwymiarowego. Rozwój technologii cyfrowej pozwolił na wyeliminowanie konieczności stosowania konwencjonalnych materiałów światłoczułych, które wykorzystywane były do odtworzenia pełnej trójwymiarowej struktury obiektu. Zastosowanie metod holografii cyfrowej sprowadza się do zautomatyzowanej, komputerowej rekonstrukcji trójwymiarowych obrazów obiektów na podstawie rejestracji obrazu interferencyjnego badanego obiektu z wykorzystaniem koherentnych źródeł światła oraz wiązki odniesienia.

Innym rozwiązaniem pozwalającym na trójwymiarową, komputerową wizualizację obrazów badanych obiektów jest wykorzystanie podstaw widzenia przestrzennego – stereoskopowego ludzkiego układu wzrokowego. Proces ten, z którym mamy do czynienia na co dzień w swoim życiu, polega na specyficznym procesie przetwarzania

informacji wzrokowej przez ośrodki wzrokowe naszego mózgu. Opiera się na rejestracji przez każde oko z osobna obrazu tego samego obiektu z dwóch różnych perspektyw. Następnie, w ośrodku wzroku w naszym mózgu mamy do czynienia z nałożeniem się, zlewaniem tych obrazów tzw. *fuzją obrazów*, co daje wrażenie przestrzenności.



Rys. 9.19. Schematy endoskopów 3D: (a) z dwoma okularami i kamerami oraz (b) z okularzem i pojedynczą kamerą

Cyfrowa endoskopia trójwymiarowa (3D) opera się na tej samej technice tzn. stosuje się dwie kamery, które rejestrują dwa różne obrazy tego samego obiektu z różnych perspektyw, które są następnie na siebie nakładane, dając wrażenie trójwymiarowości. Jednakże w tym przypadku proces nakładania się obrazów, analogiczny do procesu fuzji w ośrodku wzrokowym mózgu, jest realizowany za pomocą specjalnego oprogramowania komputerowego, które pozwala na trójwymiarową wizualizację wziernikowanych przestrzeni wewnętrznych naszego ciała bezpośrednio na ekranach monitorów. Problematiczna jest jednak konieczność stosowania monitorów 3D lub też okularów z filtrami polaryzacyjnymi noszonymi przez obserwatora – klinicystę. Schemat konstrukcji endoskopu 3D został przedstawiony na rys. 9.19.

Początkowo zaproponowano konstrukcję, która w gruncie rzeczy polegała na połączeniu ze sobą dwóch oddzielnych endoskopów z cyfrową rejestracją obrazów (patrz rys. 9.19a), jednakże takie podejście sprawiało, iż endoskopy te były dwukrotnie

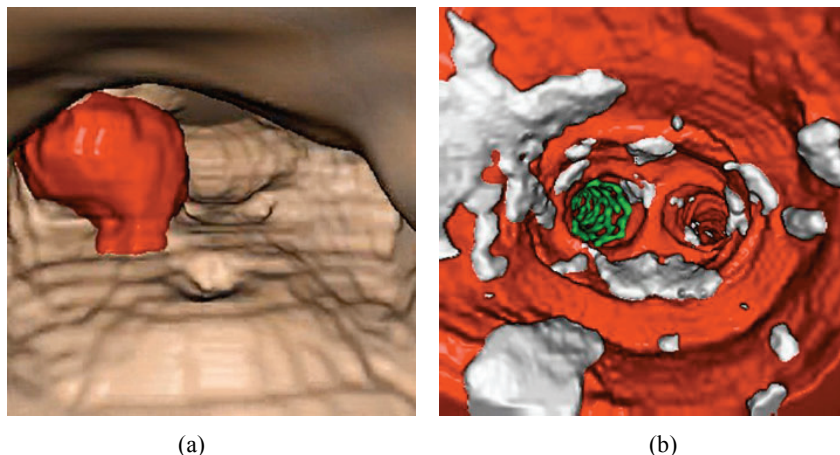
większe od konwencjonalnych wzierników, a tym samym częściowo ograniczało to możliwości ich stosowania [22]. Obecnie stosuje się nieco inne rozwiązanie, które polega na zastosowaniu dwóch oddzielnych układów okularowych połączonych z dwiema oddzielnymi kamerami cyfrowymi (patrz rys. 9.19b). Jednakże, również w tym przypadku, endoskopy te są znacznie większe od konwencjonalnych wzierników, dlatego też ich stosowalność jest również ograniczona.

Problemy endoskopii 3D takie, jak duże rozmiary wzierników, konieczność stosowania monitorów 3D lub też okularów 3D zostały wyeliminowane całkowicie w endoskopii wirtualnej. Rozwój technik komputerowych z jednej strony i metod diagnostyki obrazowej z drugiej, pozwala mieć nadzieję, że niedługo endoskopia faktycznie będzie trójwymiarowa, nieinwazyjna i pozwoli również na badania ilościowe, a nie tylko jakościowe.

Endoskopia wirtualna przeżywa rozkwit w ostatnich latach [23, 24]. Jest to metoda pozwalająca na trójwymiarową rekonstrukcję organów wewnętrznych na podstawie danych z tomografii komputerowej (CT), tomografii rezonansu magnetycznego (NMR). Obrazy endoskopowe otrzymuje się więc bez konieczności wziernikowania, co nawet przy obecnym stanie techniki nie jest dla pacjenta zbyt komfortowe.

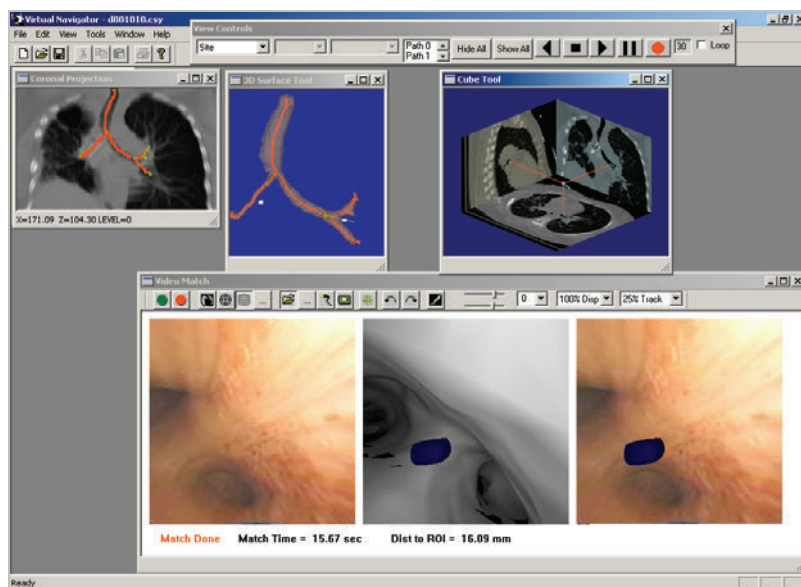
Zasada endoskopii wirtualnej polega na zastosowaniu komputerowych algorytmów przetwarzania informacji obrazowej w celu modelowaniu trójwymiarowego obrazu ze zdjęć przekrojowych CT, NMR. Ostatnio wykorzystuje się w tym celu również spiralną tomografię komputerową (SCT), tomografię wysokiej rozdzielczości (*Maximum Intensity Projection* – MIP), czy też technikę rekonstrukcji wielowarstwowej (*Multipplanar Reformating* – MPR). Im więcej zdjęć (skanów), tym lepsza jakość otrzymanych obrazów endoskopowych. Odpowiednie oprogramowanie umożliwia odpowiednią wizualizację badanych narządów oraz ich struktury wewnętrznej poprzez uzyskanie trójwymiarowych obrazów tych obiektów. Jednocześnie technika ta umożliwia także nawigację wewnątrz narządów rurowych. Klinicysta może więc obserwować wewnątrz przewodu pokarmowego czy układu oddechowego, tak jakby posługiwał się rzeczywistym endoskopem. Zastosowanie tej techniki do wizualizacji różnych narządów i struktur tkankowych przyczyniło się do stworzenia różnych gałęzi endoskopii wirtualnej odpowiadających standardowym technikom endoskopowym:

- wirtualnej bronchoskopii,
- wirtualnej gastrokopii,
- wirtualnej kolonoskopii,
- wirtualnej angioskopii,
- wirtualnej otoskopii,
- wirtualnej endoskopii zatok bocznych nosa,
- wirtualnej cysto-ureteroskopii,
- wirtualnej endoskopii kanału kręgowego,
- wirtualnej cholangioskopii.



Rys. 9.20. Przykładowe obrazy uzyskane dzięki: (a) wirtualnej cystoskopii: obraz guza pęcherza moczowego, (b) wirtualnej angioskopii: obraz stentu w lewej tętnicy biodrowej wspólnej [25]

Przykładem może tu być wykorzystanie wirtualnej endoskopii w oparciu o zdjęcia uzyskane za pomocą tomografu komputerowego w obrazowaniu raka płuc oraz drzewa oskrzelowego [26]. Odpowiednie oprogramowanie komputerowe pozwala na wygenerowanie trójwymiarowych komputerowych modeli drzewa oskrzelowego badanych pacjentów (patrz rys. 9.21).



Rys. 9.21. Trójwymiarowa wizualizacja fragmentów drzewa oskrzelowego pacjenta uzyskana za pomocą odpowiedniego oprogramowania komputerowego [26]

Zaletą endoskopii wirtualnej jest to, że można badać nie tylko przekroje poprzeczne, ale także i podłużne w każdej płaszczyźnie. Oprogramowanie do obróbki obrazów umożliwia dokładne wyznaczenie wszystkich rozmiarów, a tym samym niemalże doskonałą diagnostykę zmian chorobowych (patrz rys. 9.20–9.22).



Rys. 9.22. Wizualizacja pnia oskrzelowego oraz płuc za pomocą wirtualnej endoskopii [27]

9.4.2. Endoskopia kapsułkowa

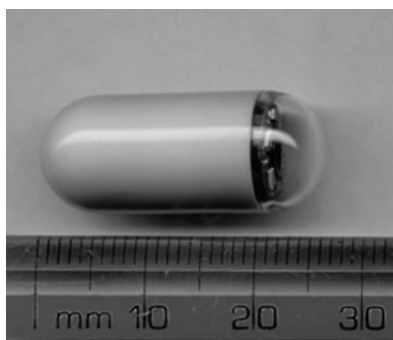
Zaprezentowane powyżej techniki wziernikowania za pomocą endoskopów soczewkowych (sztywnych), jak również światłowodowych (giętkich) znalazły szerokie zastosowanie w diagnostyce medycznej, dzięki możliwości bezpośredniej obserwacji wizualnej trudnodostępnych narządów wewnętrznych oraz jam ciała, które dotychczas nie mogły zostać poddane bezpośredniej diagnostyce przez lekarzy.

W ostatnich latach coraz większą rolę odgrywają endoskopy światłowodowe, gdyż ze względu na swoją elastyczność oraz dowolną długość włókien światłowodowych, umożliwiają bardziej komfortowe dla pacjenta badania, jak również dostęp do np. fragmentów przewodu pokarmowego znacznie odległych od naturalnych jam ciała (jamy ustnej, odbytu). Jednocześnie wyposażenie endoskopów w dodatkowe instrumentarium medyczne – chirurgiczne pozwala na ich wykorzystanie w zabiegach operacyjnych, gdzie wymagana jest duża precyzja i ciągła obserwacja najbliższego pola operacyjnego. Przykładem mogą tu być szeroko rozpowszechnione zabiegi laparoskopowe, które pozwalają na usunięcie np. kamieni z pęcherzyka żółciowego lub całego pęcherzyka. Są one istotną alternatywą dla konwencjonalnych operacji chirurgicznych, gdyż zmniejszają ryzyko powikłań oraz czas rekonwalescencji pacjenta. Pomimo istotnych zalet endoskopy światłowodowe są jednak nieskuteczne w diagnostyce, wziernikowaniu jelita cienkiego. W głównej mierze związane jest to ze znaczną dłu-

gością jelita cienkiego, która wynosi w przybliżeniu ok. 7 m, a także nieregularnym przebiegiem i obecnością licznych pętli jelit, co znacznie utrudnia wprowadzenie endoskopu. Endoskopowa diagnostyka jelita cienkiego polega na wprowadzeniu bardzo długiego wziernika światłowodowego, co jest procesem dość długotrwałym i dodatkowo mało komfortowym dla samego pacjenta. Jednocześnie możliwe jest przebadanie jedynie początkowych odcinków jelita cienkiego, gdyż odcinek jelita czczego oraz krętego jest dla endoskopu niedostępny.

Dlatego też w ostatnich latach zaproponowano całkiem nowe rozwiązanie, które polega na wprowadzeniu do organizmu poprzez układ pokarmowy samodzielnego urządzenia rejestrująco-nadajnikowego [28, 29, 30]. Ten rodzaj diagnostyki endoskopowej nosi nazwę endoskopii kapsułkowej (ang. *capsular endoscopy*, *wireless capsule endoscopy*). Rozwój tej techniki jest m.in. wynikiem obecnego we współczesnej technice trendu miniaturyzacji urządzeń diagnostyczno-pomiarowych.

Nazwa endoskopia kapsułkowa wywodzi się bezpośrednio od kształtu omawianego urządzenia, które ma kształt kapsułki o wymiarach 23×11 mm i masę około 3,7 g (patrz rys. 9.23). Po połknięciu przez pacjenta, urządzenie dzięki naturalnym ruchom perystaltycznym przechodzi przez cały układ pokarmowy: przełyk, żołądek, jelito cienkie (dwunastnicę, jelito czcze, jelito kręte), jelito grube (jelito ślepe, okrężnicę), a następnie jest wydalane z organizmu wraz z resztkami pokarmowymi.



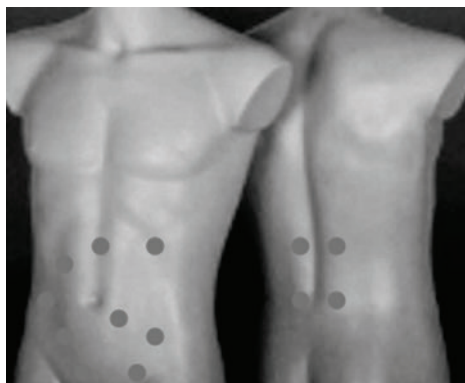
Rys. 9.23. Urządzenie do endoskopii kapsułkowej [31]

W trakcie badania pacjent może wykonywać wszystkie codzienne czynności. Schemat omawianego urządzenia został przedstawiony na rys. 9.24. Kapsułka zawiera miniaturowy aparat cyfrowy składający się z soczewki odwzorowującej oraz detektora CMOS, zestaw diod LED zapewniających odpowiednie oświetlenie obrazowanych fragmentów przewodu pokarmowego, baterię, nadajnik oraz antenę. Nowoczesne kapsułki zawierają dwa obiektywy, które zwiększają pole widzenia powyżej 170 stopni.



Rys. 9.24. Schemat urządzenia obrazującego wykorzystywanego w endoskopii kapsułkowej [32]

Kapsułka jest w stanie rejestrować obrazy wnętrza całego przewodu pokarmowego bezpośrednio w czasie przechodzenia przez jego kolejne fragmenty. W ciągu sekundy możliwe jest zrobienie dwóch zdjęć, co przy całkowitym czasie badania wynoszącym 8 godzin, pozwala na zarejestrowanie przeszło 57 000 zdjęć całego przewodu pokarmowego [33]. W razie konieczności zwiększenia liczby, zdjęć kapsułka może być wyposażona w dodatkową kamerę, która dwukrotnie zwiększa liczbę uzyskanych zdjęć. Następnie w trybie rzeczywistym zdjęcia te przesyłane są bezprzewodowo do odbiorników radiowych odpowiednio rozmieszczonych na skórze pokrywającej jamę brzuszną pacjenta. Jeden z przykładowych schematów rozmieszczenia odbiorników został przedstawiony na rys. 9.25.



Rys. 9.25. Przykładowy schemat rozmieszczenia odbiorników obrazów endoskopii kapsułkowej

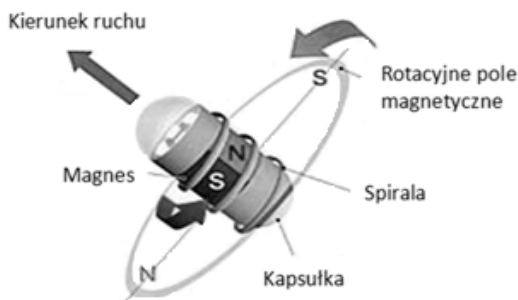
Zarejestrowane przez odbiorniki dane są następnie przekazywane do urządzenia magazynującego, które jest zazwyczaj umieszczone na pasie wokół bioder pacjenta. Przykładowy zestaw odbiorników oraz urządzenia magazynującego został przedstawiony na rys. 9.26.



Rys. 9.26. Przykładowy zestaw odbiorników oraz urządzenia magazynującego [34]

W nowoczesnych endoskopach kapsułkowych stosuje się tzw. transmisję dwukanałową tzn. możliwe jest nie tylko przekazywanie obrazu rejestrowanego przez kapsułkę znajdującą się wewnątrz organizmu pacjenta, ale również kontrola funkcji i trybu rejestracji przez urządzenie z zewnątrz.

Umożliwia to tym samym bardziej spersonalizowane badanie pacjenta z szczególnym uwzględnieniem jego potrzeb, gdyż możliwe jest ograniczenie pracy kamery znajdującej się w kapsułce jedynie do określonego fragmentu przewodu pokarmowego. Jednocześnie istnieje możliwość bezpośredniego podglądu wnętrza przewodu pokarmowego w czasie rzeczywistym. Po zakończonym badaniu dane z urządzenia magazynującego są przegrywane na komputer i podlegają dalszej obróbce oraz ocenie przez specjalistę.



Rys. 9.27. Koncepcja elektro-magnetycznej orientacji przestrzennej kapsułki endoskopowej [35]

W celu zapewnienia regulacji położenia kapsułki podczas przechodzenia przez układ pokarmowy stosuje się dodatkowe systemy nawigacji elektro-magnetycznej omawianego urządzenia poprzez umieszczenie w nim dodatkowego magnesu (patrz rys. 9.27). Umożliwia to między innymi możliwość dokładniejszego zobrazowania wybranych fragmentów przewodu pokarmowego. Do głównych wskazań badania za pomocą endoskopii kapsułkowej zaliczyć należy [36]:

- przewlekłe krwawienia z przewodu pokarmowego (po wykluczeniu innych źródeł krwawienia na podstawie kolonoskopii i gastroskopii),
- przewlekła niedokrwistość z powodu niedoboru żelaza,
- podejrzenie choroby jelita cienkiego Leśniowskiego-Cohna,
- wieloletnia choroba trzewna,
- zespoły polipowatości przewodu pokarmowego,
- guzy jelita cienkiego,
- uszkodzenia błony jelita cienkiego.

Z kolei do głównych przeciwwskazań należą m.in.: ciąża, zwężenie i niedrożność przełyku, zaburzenia motoryki przewodu pokarmowego (ruchów perystaltycznych), wszczepiony stymulator serca, zaburzenia przełykania, przetoka, liczne i duże uchyłki.

9.5. Podsumowanie

Światło jest źródłem informacji o wszystkich obiektach materialnych, na których uległo transformacji, dlatego też obserwuje się ciągły rozwój optycznych technik pomiarowych, które są wykorzystywane w różnych dziedzinach naszego życia. Również w diagnostyce medycznej techniki optyczne odgrywają znaczną rolę ze względu na ich nieniszczący i nieinwazyjny charakter. Wynalezienie wzierników endoskopowych umożliwiło bezpośrednią obserwację dotychczas niedostępnych przestrzeni wewnątrz naszego organizmu, co w znaczny sposób przyczyniło się do zwiększenia efektywności terapii medycznych, jak również lepszej diagnostyki. Pomimo, że początkowe konstrukcje endoskopów sztywnych pozwalały na ograniczone wziernikowanie niezbyt odległych obszarów naszego organizmu (jamy nosowej, ustnej, przełyku itp.), to jednak rozwój techniki i pojawienie się włókien światłowodowych znacznie zwiększyło możliwości diagnostyczne endoskopii. W ostatnich latach obserwuje się nowe trendy rozwoju tych technik mające na celu ich miniaturyzację, jak również trójwymiarową wizualizację. Fascynujący rozwój technik wirtualnej rzeczywistości będzie miał na pewno wpływ na zakres stosowania diagnostyki endoskopowej. Badanie takie na pewno jest mniej obciążające dla pacjenta. Po wykonaniu badania tomograficznego, klinicysta może diagnozować wewnętrzne organy bez potrzeby kontaktu z pacjentem. Może dokładnie mierzyć wielkości zaobserwowanych zmian i zaproponować najbardziej adekwatny rodzaj terapii.

Endoskopia wirtualna nie oznacza, że tradycyjna endoskopia straci na znaczeniu. O ile w pewnych zmianach chorobowych możliwości diagnostyczne tej pierwszej są bardzo duże, to już zabiegi terapeutyczne możliwe są tylko za pomocą endoskopów rzeczywistych. W związku z promocją technik minimalnie inwazyjnej medycyny, zabiegi endoskopowe będą częściej stosowane. Dzięki endoskopii wirtualnej, lekarz będzie mógł operować w dobrze poznanym wcześniej polu operacyjnym.

Podobnie jest w przypadku endoskopii kapsułkowej, która chociaż ma niewątpliwie przewagę na klasyczną endoskopią w diagnostyce jelita cienkiego, to jednak jeszcze nie może być wykorzystana w zabiegach operacyjnych. Rozwój automatyki i postępujący proces miniaturyzacji mogą przyczynić się w przyszłości do zastosowania endoskopii kapsułkowej również w zabiegach chirurgicznych.

Literatura

- [1] PLUTA M., *Mikroskopia Optyczna*, PWN, Warszawa 1982.
- [2] BERCI G. (ed.) *Endoscopy*, Appleton Century Crofts, New York 1976.
- [3] BUSS G.F. (ed.), *Endoskopie*, Deutsche Ärzte Verlag, 1990.
- [4] GIBIŃSKI K., NOWAK A., *Endoskopia układu trawiennego*, PZWL, Warszawa 1992.
- [5] CLASSEN M., TYTGAT G., LIGHTDALE CH. (eds.) *Gastroenterological endoscopy*, Thieme Verlag, 2002.
- [6] BUTHIAU D., KHAYAT D., *Virtual Endoscopy*, Springer-Verlag, New York 2003.
- [7] AMMAN F., *Technische Endoskopie*, Technischer Verlag Resch KG, 1984.
- [8] ROELLING J., *Industrielle Endoskopie*, Verlag Moderne Industrie, 1988.
- [9] <http://www.vhjoer.org/index.php/vhjoer/index>
- [10] <http://www.thieme.de/endoscopy>
- [11] PODBIELSKA H., *Fiberscopic optical systems and their application*, Proc. SPIE, 1991, Vol. 1553, 516–521.
- [12] PENTAX, strona internetowa: <http://pentaxmedical.com>
- [13] KATZIR A., *Lasers and Optical Fibers in Medicine*, Academic Press, 1995.
- [14] HOPKINS H.H., *Optical Principles of the Endoscope*, [w:] *Endoscopy*, red. G. Berci, M.R. Ewing, Appleton Century Crofts, New York 1976.
- [15] *Słownik fizyczny*, Wiedza Powszechna, Warszawa 1984.
- [16] PODBIELSKA H., *Metody optyczne w fizyce środowiska*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1996.
- [17] NOWAK J., ZAJĄC M., *Optyka – kurs elementarny*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1998.
- [18] JAGOSZEWSKI E., *Wstęp do optyki inżynierskiej*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2008.
- [19] HECHT E., *Optics*, 4 ed., Addison Wesley, New York 2002.
- [20] RATAJCZYK F., *Optyka instrumentalna*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2005.
- [21] SZCZENIOWSKI Sz., *Optyka geometryczna*, [w:] *Fizyka doświadczalna*, cz. IV, PWN, Warszawa 1967.
- [22] KÖCKERLING F et al., *Video-endoskopische Chirurgie*, Verlag, 1998.
- [23] JOLESZ F.A., LORESEN W.E., SHINMOTO H., ATSUMI H., NAKAJIMA S, KAVANAUGH P., SAIVIROONPORN P., SELTZER S.E., SILVERMAN S.G., PHILLIPS M., KIKINIS R., *Interactive virtual endoscopy*, Amer. Journal of Radiology, 1997, Vol. 169, 1229–1237.
- [24] <http://www.lems.brown.edu/vision/people/leymarie/Refs/MedicalIma/Endoscopy.html>
- [25] <http://www.su.krakow.pl/html/kliniki/radiologia/ciekawe/endoskopia.htm>
- [26] <http://www.mipl.ee.psu.edu/presentations/n0111RSNA2.ppt#303,8,A>. Image-Guided Bronchoscopy System - Hardware
- [27] <http://www.4wsk.pl/pl/radiologia/obrazybadan.html>

- [28] IDDAN G., MERON G., GLUKHOVSKY A, SWAIN P., *Wireless capsule endoscopy*, Nature, 2000, Vol. 405, 417.
- [29] DAVIS B.R., HARRIS H., VITALE G.C., *The evolution of endoscopy: wireless capsule cameras for the diagnosis of occult gastrointestinal bleeding and inflammatory bowel disease.*, Surg. Innov., 2005, Vol. 12, 129–133.
- [30] NAKAMURA T., TERANO A., *Capsule endoscopy: past, present, and future*, J. Gastroenterol., 2008, Vol. 43, 93–99.
- [31] <http://pl.wikipedia.org/w/index.php?title=Plik:CapsuleEndoscope.jpg&filetimestamp=20060528204722>
- [32] <http://hdmedix.com/>
- [33] MUÑOZ-NAVAS M., *Capsule endoscopy*, World J. Gastroenterol., 2009, Vol. 15, No.13, 1584–1586.
- [34] <http://www.capsule-endoscopy.info/>
- [35] <http://www.futurefeeder.com/2005/05/capsule-endoscope-by-olympus/>
- [36] <http://www.nil.org.pl/xml/oil/oil56/gazeta/numery/n2010/n201003/n20100308>

ROZDZIAŁ 10

PODSTAWY TRANSILUMINACJI

Halina Podbielska, Ewa Boerner, Joanna Bauer

Spis treści	
10.1. Wstęp	285
10.2. Badania transiluminacyjne	286
10.2.1. Rys historyczny	286
10.2.2. Transiluminacja w ocenie stawów międzypaliczkowych	287
10.2.3. Inne zastosowania transiluminacji	290

10.1. Wstęp

Metoda zwana transiluminacją lub diafanoskopią, znana jest od ponad dwóch wieków. Dzisiejsze możliwości techniczne, w tym rozwój optoelektroniki, któremu zawdzięczamy zarówno nowe źródła światła, jak i układy rejestrujące, powodują, że znowu zwrócono uwagę na nieinwazyjne i niejonizujące metody diagnostyczne, wykorzystujące światło widzialne lub podczerwone. Transiluminacja oznacza „prześwietlenie na wskroś”, czyli przejście światła od źródła światła przez tkankę i analizę wiązki świetlnej, która przez tkankę przeszła. Najczęściej stosowanymi długościami fal jest promieniowanie widzialne i podczerwone. Często też na określenie tego badania używana jest nazwa: diafanoskopia. Słowo to pochodzi od greckiego słowa *diaphanēs*, co oznacza przezroczysty. Badanie np. gruczołu piersiowego za pomocą prześwietlenia światłem podczerwonym nosi nazwę diafanografii. Natomiast diafanometr to urządzenie do badania np. moczu lub innych płynów w świetle przechodzącym.

Transiluminacja polega na prześwietlaniu tkanek, części ciała lub narządu promieniowaniem podczerwonym z zakresu 780–1400 nm (bliska podczerwień) lub czerwonym o długości fali 630–770 nm. Przeważnie badanie przeprowadza się w zaciemnionym pomieszczeniu. Przetransmitowana przez badaną tkankę fala elektromagnetyczna

jest rejestrowana przez aparat, kamerę lub obserwowana bezpośrednio przez osobę wykonującą badanie. Metoda pozwala na wizualizację wnętrza badanego organu i stwierdzenie, czy istnieją zmiany patologiczne. Tkanka zdrowa ma bowiem inne właściwości absorpcji i transmisji światła w porównaniu z chora [1]. Najczęściej diagnozowanymi organami jest głowa noworodków (podejrzenie wodogłowia), jądra (podejrzenie wodniaka), gruczoł piersiowy (podejrzenie zmian patologicznych).

Próbowano również wykorzystać transiluminację do badania pęcherza moczowego za pomocą źródła światła doprowadzonego do pęcherza i analizy światła przetransmitowanego przez powłoki w okolicy miednicy. Badanie to nazwano cystodiafanoskopią [2].

10.2. Badania transiluminacyjne

10.2.1. Rys historyczny

Pierwszy raz transiluminacja została zastosowana w 1831 roku w londyńskim szpitalu do badania wodogłowia [3]. Jako źródło światła zastosowano świecę umieszczoną za głową pacjenta, co umożliwiło obserwację komór mózgu. Kilka lat później w 1843 roku Curling wykorzystał tę metodę do badania wodniaka jądra [4]. Źródłem światła także była świeca. Przezroczystość zależała od koloru, konsystencji i ilości nagromadzonego płynu.

W 1929 roku Cutler wykorzystał transiluminację do badania guzów piersi, bazując na różnych współczynnikach pochłaniania światła przez tkanki guza i tkanki zdrowe [5]. Ocenie poddano 174 przypadki schorzeń piersi. Pacjentki badane były w całkowicie ciemnym pomieszczeniu. Lampa umieszczona była pod piersią i przesuwana przez osobę wykonującą badanie po całej dolnej powierzchni. Obie piersi były badane rutynowo, przy czym zdrowa była transiluminowana jako pierwsza, aby służyć jako wzorzec do porównania. Ocena ewentualnych zmian w strukturze piersi była dokonywana w trakcie badania. Obserwując z drugiej strony prześwietlaną pierś, Cutler mógł odróżnić tkanki patologiczne od zdrowych ze względu na ich różne zdolności absorpcyjne. Cutler stwierdził, że transiluminacja jest wartościową pomocą w diagnostyce różnicowej i monitorowaniu leczenia. Zalety transiluminacji w podczerwieni opisano w 1930 roku [6].

W latach pięćdziesiątych ponownie zainteresowano się transiluminacją jako metodą diagnostyczną guzów piersi [7]. Badano różnice pomiędzy guzami łagodnymi i złośliwymi, wykorzystując różną transmisję światła w tkankach zdrowych i chorych. Zmiany patologiczne w porównaniu do tkanek otaczających były ciemniejsze (np. guz zwarty, krwiak) lub jaśniejsze (niektóre rodzaje cyst). Metodę tę nazwano diafanografią.

W celu poprawienia jakości obrazu transiluminacyjnego w 1980 roku Ohlsson zaproponował użycie promieniowania podczerwonego do prześwietlenia tkanek i rejestrację przetransmitowanych fal elektromagnetycznych na materiale światłoczułym na podczerwień [8]. Chociaż obrazy transiluminacyjne raka sutka były niewyraźne (z powodu rozproszonego światła), jednak można było zdiagnozować guzy w 95% przypadków.

Kaneko i współpracownicy skonstruowali prototyp fotoskanera do badania transmisji światła lasera He-Ne [9, 10]. Rejestracja obrazu transiluminacyjnego piersi, umieszczonej pomiędzy szklanymi płytami, trwała około 2 minut. Otrzymane obrazy przedstawiono w tzw. pseudokolorach. Powierzchnia piersi i okolice podskórne zostały zobrazowane w kolorze białym i różowym, granica między tkankami – w brązowym lub pomarańczowym, a same tkanki piersi – w zielonym lub niebieskim. Obrazy transmisji światła laserowego w przypadku zdrowych piersi były symetryczne, ale często niejednolite z powodu specyfiki tkanki piersi. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że prototyp fotoskanera transmisji laserowej powinien być ulepszony. W następnych badaniach badacze stwierdzili jednak, że badanie nie pozwala określić, czy oceniana zmiana jest guzem łagodnym, czy złośliwym [11].

Inni badacze natomiast stwierdzili, że diagnozowanie zmian piersi metodą transiluminacji jest zbliżone do mammografii i ma prawie taką samą wykrywalność guzów o średnicy większej niż 20 mm [12]. W badaniach transiluminacyjnych próbowano również stosować światło białe (lampę halogenową) i metody optycznej tomografii komputerowej [13].

Interesujące jest to, że w XIX wieku ukazało się również wiele prac polskich badaczy na temat zastosowania transiluminacji w diagnostyce. Do ważnych należą prace Talko, Herynga (opisywał tzw. prześwietlenie elektryczne), Kierzka (stosował diafanskopię do prześwietlania zatok), a także innych badaczy [14, 15, 16, 17, 18].

10.2.2. Transiluminacja w ocenie stawów międzypaliczkowych

Transiluminacja wzbudza również zainteresowanie specjalistów, zajmujących się schorzeniami narządów ruchu, w szczególności diagnostyką zmian w stawach międzypaliczkowych. Okazuje się, że można tę metodę wykorzystać do diagnostyki zmian zapalnych w chorobach reumatoidalnych. Prapavat badał zdolność pochłaniania i rozpraszania kości, chrząstki i mazi stawowej, stosując laser emitujący światło o długości fali 675 nm do pozycjonowania i o długości 905 nm do prześwietlenia [19, 20]. Odkrył on, że patologiczna tkanka łączna ma inne właściwości optyczne niż zdrowa i właściwości te zależą od stopnia zaawansowania choroby. Doświadczenie to zapoczątkowało wykorzystanie transiluminacji do badania chorób stawów m.in. w przypadku reumatoidalnego zapalenia stawów. Reumatoidalne zapalenie stawów jest częstą zapalną chorobą stawów międzypaliczkowych. Użycie konwencjonalnego systemu ob-

razowania (np. prześwietlenia promieniowaniem rentgenowskim) do diagnozy we wczesnym stadium jest trudne, ponieważ zmiany wywołane patologią nie pojawiają się w twardej tkance na tym etapie. Dlatego też transiluminacja stała się przedmiotem zainteresowania różnych grup badawczych [21, 22].

Badając właściwości optyczne tkanek w świetle podczerwonym, wykazano, że parametry optyczne (współczynnik absorpcji, rozpraszania, fazowa funkcja rozpraszania) są różne w stawach zdrowych i stawach objętych procesem zapalnym [23]. Zastosowanie metody optycznej detekcji heterodynowej w interferometrze Macha–Zehndera z laserem 1064 nm pozwoliło na wczesną diagnostykę zapalenia reumatoidalnego stawów międzypaliczkowych bliższych [21].

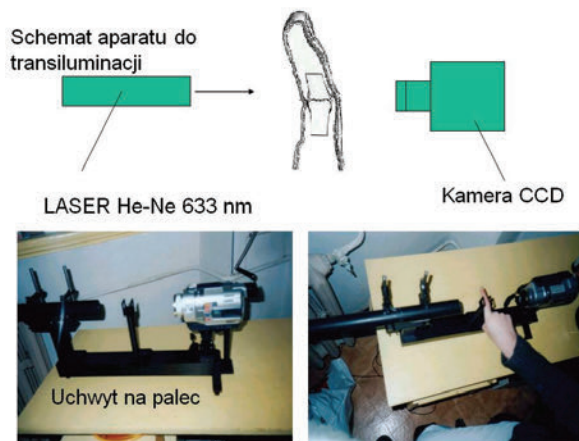
Badania kliniczne prowadził Scheel i współpracownicy [24]. Celem pracy była ocena nowej laserowej techniki obrazowania w badaniu procesów zapalnych stawów międzypaliczkowych bliższych u pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Zastosowano specjalny układ z statywem do umieszczenia prześwietlanego palca. Obrazy transiluminacji stawów rejestrowano przy użyciu światła laserowego o długości fali 675 nm i mocy wyjściowej 2 mW. W pierwszym klinicznym badaniu zbadano 72 stawy międzypaliczkowe bliższe 22 pacjentów i 64 stawy 8 zdrowych ludzi. Po 6 tygodniach leczenia badania powtórzono. Wykazano, że metoda charakteryzuje się 80% czułością, 89% specyficznością i 83% dokładnością w rozpoznawaniu stanów zapalnych w reumatoidalnym zapaleniu stawów.

W innych badaniach Scheel i współpracownicy zajęli się określeniem klasyfikatorów obrazów otrzymanych metodą sagittalnej optycznej tomografii laserowej, celem odróżnienia zdrowych stawów międzypaliczkowych bliższych i stawów z zapaleniem błony maziowej [25]. Porównano 78 obrazów stawów 2, 3 i 4 palca u 13 pacjentów z obrazami otrzymanymi w badaniu USG. Otrzymane obrazy (do prześwietlenia zastosowano laser półprzewodnikowy 675 nm) ilustrowały rozkład przestrzenny współczynników rozpraszania i absorpcji w jamie stawowej. Wykazano statystycznie znaczące różnice między rozkładami tych współczynników w stawach zdrowych i stawach wykazujących zapalenie.

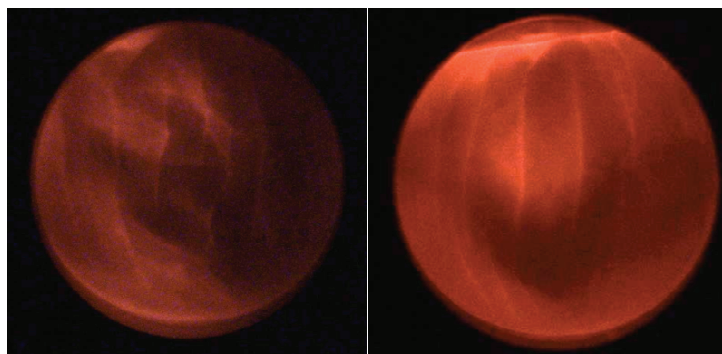
Metodę transiluminacji zastosował także Hielscher i współpracownicy. [26]. Ocenie poddano stawy międzypaliczkowe bliższe 54-letniej i 43-letniej pacjentki z zapaleniem reumatoidalnym. Obrazy optyczne porównano z obrazami USG i objawami klinicznymi. Stwierdzono, że nie zawsze obrazowanie USG koresponduje z ogólnym obrazem klinicznym. Natomiast zmiany w przestrzennym rozkładzie współczynnika rozpraszania i absorpcji w jamie stawowej są charakterystyczne i odpowiadają stanowi klinicznemu. Uwagę na ten fakt zwracają również inni badacze, zajmujący się m.in. obrazowaniem stawów i kości za pomocą dyfuzyjnej tomografii optycznej z laserem o promieniowaniu ciągłym [27, 28].

Badania takie prowadzi się również w Polsce, m.in. na Politechnice Poznańskiej [29]. W Grupie Bio-Optyki na Politechnice Wrocławskiej we współpracy z Wydziałem Fizjoterapii Akademii Wychowania Fizycznego we Wrocławiu zastosowano transilu-

minację do oceny zmian w stawach międzypaliczkowych bliższych u osób zdrowych i chorych (patrz rys. 10.1 i 10.2).

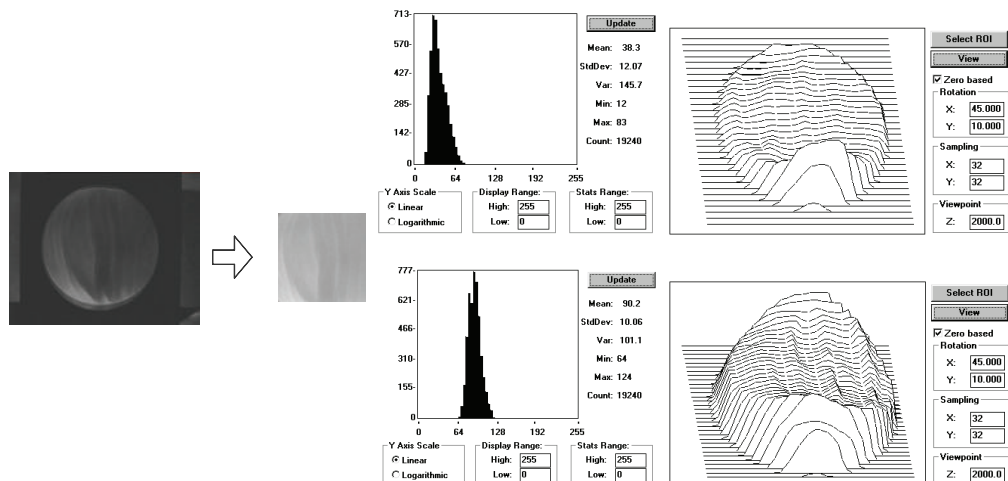


Rys. 10.1. Prototyp urządzenia do transiluminacji stawów międzypaliczkowych bliższych skonstruowanego w Grupie Bio-Optyki



Rys. 10.2. Przykładowy obraz transiluminacyjny chorej (po lewej) i zdrowej osoby (po prawej)

W tym celu skontrowano specjalne urządzenie do prześwietleń, wykorzystując laser He-Ne (633 nm) i kamerę CCD do rejestracji natężenia przetransmitowanego przez tkanki światła. Zarejestrowane obrazy są następnie konwertowane i jako bitmapy w odcieniach szarości analizowane komputerowo (patrz rys. 10.3). Wstępne badania wykazały, że rozkład natężenia (luminancji) w obrazie zależy od stanu chorego, wieku, a także płci. Jednakże odpowiednia analiza, realizowana w oparciu o statystyczne metody rozpoznawania obrazów, pozwala na diagnostykę z dokładnością nawet ponad 90% (w zależności od dobranej metody) [30, 31, 32].



Rys. 10.3. Analiza obrazów transiluminacyjnych. Po lewej – ekstrakcja części obrazu ROI (*Region of Interest*) i obróbka: wyznaczenie histogramu i luminancji (po prawej u góry – osoba chora, po prawej na dole – osoba zdrowa)

10.2.3. Inne zastosowania transiluminacji

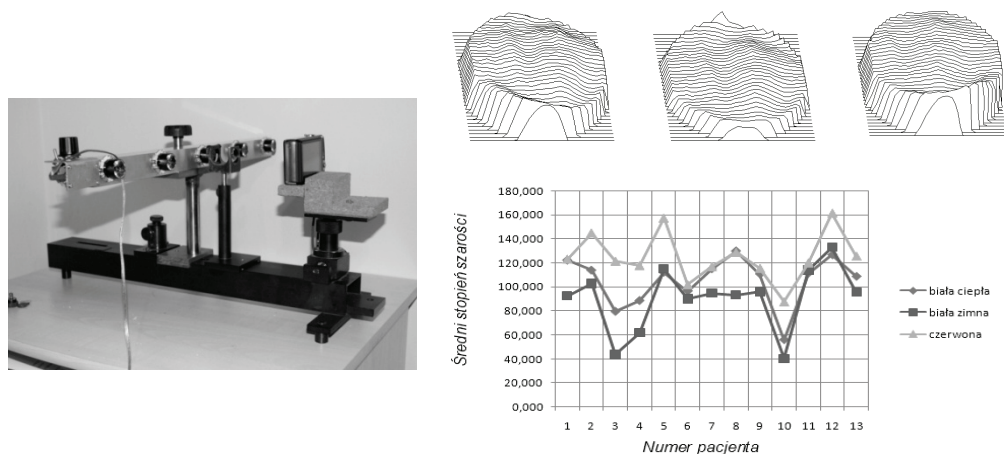
Obraz transiluminacyjny stawów międzypalczkowych zależy od stanu zdrowia danej osoby. Zdjęcia osób cierpiących na zmiany zwyrodnieniowe lub zapalne są na ogół ciemniejsze. Wszelkie zmiany w jamie stawowej lub też zwężenie szpary stawowej powoduje, że więcej światła jest pochłaniane niż przepuszczone przez tkankę. Obrazowanie multispektralne czyli analiza obrazów przy różnych długościach fal może przyczynić się do poprawienia jakości obrazowania [33].

Transiluminacja multispektralna znajduje też zastosowanie w oftalmologii np. do badania oka w przypadku podejrzenia jaskry. Wykazano, że kontrast zależy od długości fali. Najlepszy kontrast uzyskano przy prześwietleniu w zakresie 700 do 800 nm, przy czym u osób białych było to 700 nm, a u czarnoskórych 810 nm [34].

Urządzenie do transiluminacyjnych badań multispektralnych skonstruowano również w Grupie Bio-Optyki (patrz rys. 10.4) [35]. Źródłem światła były diody LED wyposażone w odpowiednie soczewki, umieszczone na przesuwnej ławie. Układ zaprojektowano tak, że prześwietlenie odbywa się wiązką skolimowaną. Porównując obrazy zarejestrowane przy różnych długościach fal, można wyodrębnić więcej szczegółów.

Różnice w pochłanianiu światła przez różne tkanki mogą być z powodzeniem wykorzystane do badań anomalii naczyń krwionośnych [36]. Ponieważ badanie jest absolutnie nieinwazyjne, więc bardzo dobrze nadaje się do diagnostyki pediatrycznej. Może być nawet wykorzystane do monitorowania inwazyjnych zabiegów medycznych [37].

Dzięki prześwietleniu światłem białym i podczerwonym można też wizualizować zmiany naczyniowe na kończynach, które są niewidoczne gołym okiem i są trudne do zdiagnozowania [38]. W dermatologii transiluminacja może uwidocznić zmiany w tkance podskórnej [39]. Można to również wykorzystać w medycynie sądowej [40].



Rys. 10.4. Prototyp układu do transiluminacji multispektralnej. Obrazy luminancji zdjęcia transiluminacyjnego palca środkowego prawej ręki, zarejestrowane przy użyciu diody białej ciepłej, diody białej zimnej, diody czerwonej. Pokazano też średni stopień szarości w obrazach transiluminacyjnych zarejestrowanych przy różnych długościach fal u 13 różnych osób [35]

Inne zastosowania transiluminacji dotyczą diagnostyki zapalenia zatok przynosowych [41]. Można je uwidocznić doprowadzając światło do zatoki i rejestrując rozkład światła na skórze twarzy. Transiluminacja za pomocą światła prowadzonego aplikatorem światłowodowym została też zastosowana do oceny ubytków w szkliwie i monitorowania próchnicy [42].

Literatura

- [1] NIEMZ M.H., *Laser-Tissue Interactions, Fundamentals and Applications*, Springer Verlag, 1996.
- [2] KLAFTEN E., *Cystodiaphanoscopy: a new and simple method of examination*, An International Journal of Obstetrics and Gynaecology, 1934, Vol. 41, No. 5, 739–748.
- [3] BRIGHT R., *Reports of medical cases. Disease of the brain and nervous system. Case CCV. Chronic hydrocephalus from childhood in an adult, ossification complete, intellect moderate*, Ch. IV, London 1831.
- [4] CURLING T.B., *A practical treatise on the disease of the testis and of the spermatic cord and scrotum*, London 1849.
- [5] CUTLER M., *Transillumination as an aid in the diagnosis of breast lesions*, Surgery, Gynaecology and Obstetrics, 1929, Vol. 48, No. 6, 712–719.
- [6] CARTWRIGHT C.H., *Infra-red transmission of the flesh*, JOSA, 1930, Vol. 20, No. 2, 81–84.
- [7] GROS C.M., SIGRIST R., *La radiographie et la transillumination de la mamelle*, Strasbourg Med., 1951, Vol. 2, 451–465.

- [8] OHLSSON B., GUNDERSEN J., NILSSON D.M., *Diaphanography: a method for evaluation of the female breast*, World J. Surg., 1980, Vol. 4, 701–705.
- [9] KANEKO M., GOTO S., FUKAYA T., NAITO M., ISODA H., KUBOTOA G., KITANAKA H., TAKAI M., HAYASHI T., HAYAKAWA T., YAMASHITA Y., OHTA K., *Fundamental studies of breast tumor detection with narrow beam Laser scanning (Raport 1)*, Radiation Medicine, 1988, Vol. 6, No. 2, 61–65.
- [10] KANEKO M., HATAKEYAMA M., HE P., NAKAJIMA Y., ISODA H., TAKAI M., OKADAWA T., ASUMI M., KATO T., GOTO S., SUGIE Y., HAYASHI T., HAYAKAWA T., YAMASHITA Y., OHTA K., *Construction of a laser transmission photo-scanner: pre-clinical investigation (Raport 2)*, Radiation Medicine 1989, Vol.7, No. 3, 129–134.
- [11] KANEKO M., PING H., NISHIMURA T., SUGIYAMA A., SHIMIZU T., ICHINOHE K., KISAMORI M., TESHIMA T., MIYAZAKI Y., KAGEYAMA T., TAKAHASHI M., BABA K., MIYAHURA T., HARADA Y., *Laser Transmission Photo-Scanner: Clinical application in Breast Tumor Detection (Raport 3)*, Radiation Medicine, 1989, Vol.7, No. 4, 173–175.
- [12] BARTRUM R.J., CROW H.C., *Transillumination light scanning to diagnose breast cancer: a feasibility study*, American J. of Roentgenology, 1984, Vol. 142, 409–414.
- [13] JACKSON P.C., STEVENS P.H., SMITH J.H., KEAR D., KEY H., WELLS N.T., ENG F., *The development of a system for transillumination computed tomography*, British Journal of Radiology, 1987, Vol. 60, 375–380.
- [14] TALKO J., *Jeszcze słówko o diopro-organoskopji*, Klinika VII, 1870, Vol. 18, 286.
- [15] HERYNG T., *O badaniu jam organizmu za pomocą polyskopu*. Pam. Tow. Lek., 1881, Vol. LXXVII(1), 206.
- [16] HERYNG T., *O zastosowaniu prześwietlenia elektrycznego*, Gazeta lekarska, 1892, Vol. 9, 171–175.
- [17] HERYNG T., *O zastosowaniu prześwietlenia elektrycznego, o prześwietleniu żołądka i kiszek*, Gazeta lekarska, 1892, Vol. 9, 199–205.
- [18] KIERZEK A., *Diafanoskopia zatok szczękowych – Metoda przedwcześnie zapomniana?*, Prace Poglądowe Otolaryng. Pol., 1895, Vol. 49, 371–379.
- [19] BEUTHAN J., PRAPAVAT V., NABER R.D., MINET O., MULLER G., *Diagnostic of inflammatory rheumatic diseases with Photon Density Waves*, Proc. SPIE, 1996, Vol. 2676, 43–53.
- [20] PRAPAVAT V., *Anwendung der experimentellen Systemanalyse zur Informationsgewinnung aus Streulicht im Frühstadium entzündlich-rheumatischer Veränderungen*, ECOMED, Berlin 1997.
- [21] YUASA T., TANOSAKI S., TAKAGI M., SASAKI Y., TANIGUCHI H., DEVARAJ B., AKATSUKA T., *Transillumination Optical Sensing for Biomedicine and Diagnostics: Feasibility of Early Diagnosis for Rheumatoid Arthritis*, Analytical Science, 2001, Vol. 17, 515–518.
- [22] BEUTHAN J., CAPPUS H.-J., HIELSCHER A., HOPF M., KLOSE A., NETZ U., *Erste Untersuchungen zur Anwendung der linearen Signalübertragungstheorie in der Auswertung diaphanoskopischer Untersuchungen am Beispiel der Rheumadiagnostik*, Biomedizinische Technik, 2001, Vol. 46, No. 11, 298–303.
- [23] BEUTHAN J., NETZ U., MINET O. et al., *Light scattering study of rheumatoid arthritis*, Quantum Electronics, 2002, Vol. 32, No. 11, 945–952.
- [24] SCHEEL A.K., KRAUSE A., MESECKE-VON RHEINBABEN I., METZGER G., ROST H., TRESP V., MAYER P., REUSS-BORST M., MULLER G.A., *Assessment of proximal finger joint inflammation in Patients with rheumatoid arthritis, using a novel laser-based imaging technique*, Arthritis & Rheumatism, 2002, Vol. 46, No. 5, 1177–1184.
- [25] SCHELL A.K., BACKHAUS M., KLOSE A.D., MOA-ANDERSON B., NETZ U.J., HERMANN K.-G.A., BEUTAN J., MULLER G.A., BURMESTER G.R., HIELSCHER A.H., *First clinical evaluation of sagittal laser optical tomography for detection of synovitis in arthritic finger joints*, *Annals of the Rheumatic Diseases*, Published Online First, 2004.

- [26] HIELSCHER A.H., KLOSE A.D., SCHEEL A.K., MOA-ANDERSEON B., BACHAUS M., NEZT U., BEUTHAN J., *Sagittal laser optical tomography for imaging of rheumatoid finger joint*, Phys. Med. Biol., 2004, Vol. 49, 1147–1163.
- [27] XU Y., IFTIMIA N., JIANG H.B., KEY L.L., BOLSTER M.B., *Imaging of in vitro and in vivo bones and joints with continuous-wave diffuse optical tomography*, Opt. Express, 2001, Vol. 8, 447–51.
- [28] XU Y., IFTIMIA N., JIANG H.B., KEY L.L., BOLSTER M.B., *Three-dimensional diffuse optical tomography of bones and joints*, J. Biomed. Opt., 2002, Vol. 7, 88–92.
- [29] CYSEWSKA-SOBUSIAK A., WICZYŃSKI G., *Examples of transillumination techniques used in medical measurements and imaging*, Book Series: Lecture Notes in Control and Information Sciences, Springer, Berlin/Heidelberg 2006, Vol. 335, 351–364.
- [30] BAUER J., BOERNER E., PODBIELSKA H., SUCHWALKO A., *Pattern recognition of transillumination images for diagnosis of rheumatoid arthritis*, Kowalczyk A., [Eds.] Fercher A.F., Tuchin V.V., Proceedings of SPIE: Medical Imaging, 2005, Vol. 5959, 15–20.
- [31] BAUER J., BOERNER E., PODBIELSKA H., *Transiluminacja jako metoda diagnostyczna w reumatoidalnym zapaleniu stawów*, Biocybernetyka i Inżynieria Biomedyczna, XIV Konferencja Naukowa, Materiały IBIB PAN, 2005, 687–690.
- [32] BOERNER E., BAUER J., SZEWCZYK A., PODBIELSKA H., *Laser transillumination of interphalangeal joints of women suffering from rheumatoid diseases*, Opt. Appl., 2007, Vol. XXXVII, No. 1–2, 153–160.
- [33] MINET O., SCHEIBE P., ZABARYLO U.J., *Diagnosis of rheumatoid arthritis using light: correction of motion artefacts and color visualization of multispectral images*, J Biophotonics., 2010, Vol. 3, No. 3, 130–137.
- [34] ROBERTS D.K., LUKIC A., YANG Y., WILENSKY J.T., WERNICK M.N., *Multispectral Diagnostic Imaging of the Iris in Pigment Dispersion Syndrome*, J. Glaucoma., Mar. 16. 2011.
- [35] DEMARCZYK D., *Transiluminacja z dwiema długościami fal w diagnostyce zmian w stawach międzypaliczkowych*, Praca inżynierska pod kier. prof. H. Podbielskiej, WPPT, Politechnika Wroclawska, Wrocław 2010.
- [36] MOHLER E.R. 3RD, DORAISWAMY V., SIBLEY A., BERNHARDT B.A., PYERITZ R.E., *Transillumination of the fingers for vascular anomalies: a novel method for evaluating hereditary hemorrhagic telangiectasia*, Genet. Med., 2009, Vol. 11, No. 5, 356–358.
- [37] HOSOKAWA K., KATO H., KISHI C., KATO Y., SHIME N., *Transillumination by light-emitting diode facilitates peripheral venous cannulations in infants and small children*, Acta Anaesthesiol. Scand., 2010, Vol. 54, No. 8, 957–961.
- [38] BUSTOS L.L., FRONEK A., LOPEZ-KAPKE L., HENRIQUEZ J.A., *Nonvisible insufficient subcutaneous reticular venous plexus can be observed through the skin using a new illumination method*, Dermatol. Surg., 2010, Vol. 36, No. 2, 1046–1049.
- [39] DHAWAN A., WANG S., *Trans-illuminated image restoration of Nevoscope*, Conf. Proc. IEEE Eng. Med. Biol. Soc., 2005, Vol. 1, 270–273.
- [40] NOLTE K.B., *Transillumination enhances photographs of retinal hemorrhages*, J. Forensic Sci., 1997, Vol. 42, No. 5, 935–936.
- [41] BEUTHAN J., MINET O., MUELLER G., PRAPAVAT V., *IR-diaphanoscopy in Medicine*, Proc. SPIE, 1993, Vol. IS11, 263–282.
- [42] DAVIES G.M., WORTHINGTON H.V., CLARKSON J.E., THOMAS P., DAVIES R.M., *The use of fibre-optic transillumination in general dental practice*, British Dental Journal, 2001, Vol. 191, No. 3, 145–147.

ROZDZIAŁ 11

OPTYCZNE CZUJNIKI CHEMICZNE

**Agnieszka Ulatowska-Jarża, Marta Kopaczyńska,
Halina Podbielska**

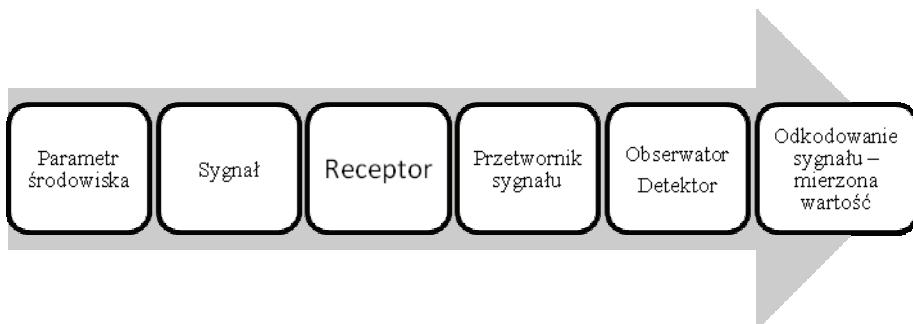
Spis treści	
11.1. Wstęp	295
11.2. Podstawowe definicje	298
11.2.1. Czujnik chemiczny	298
11.2.2. Biosensor	298
11.2.3. Aktuator	299
11.3. Klasyfikacja czujników	300
11.3.1. Podział czujników według typu przetwornika	300
11.3.2. Podział czujników według mechanizmu czujnikowego	300
11.3.3. Inne sposoby klasyfikacji czujników	301
11.4. Parametry czujników	301
11.5. Optody czujników światłowodowych	303
11.5.1. Optoda	304
11.5.2. Światłowody	307
11.6. Metody unieruchamiania cząsteczek detekcyjnych	310
11.7. Wady i zalety detekcji optyczno-chemicznej	312
11.8. Wybrane zastosowania czujników w medycynie	313

11.1. Wstęp

W codziennym życiu spotykamy się z różnymi czujnikami (sensorami). Najogólniej rzecz ujmując, czujnik jest to urządzenie, które mierzy jakąś wielkość i zamienia ją na sygnał, który może być odczytany przez obserwatora lub jakiś detektor, a następnie analizowany. Schematycznie można to przedstawić, jak na poniższym rysunku (patrz rys. 11.1).

Optyczne metody detekcji, szczególnie w połączeniu z techniką światłowodową, należą do jednych z ważniejszych osiągnięć poprzedniego stulecia. Podobnie, jak idea przesyłania informacji światłowodami wpłynęła na rozwój telekomunikacji, tak opto-

elektroniczne techniki pomiarowe mają znaczny wpływ na rozwój nauki, przemysłu i medycyny 20. i 21. wieku [1, 2, 3].



Rys. 11.1. Podstawowy schemat działania czujnika

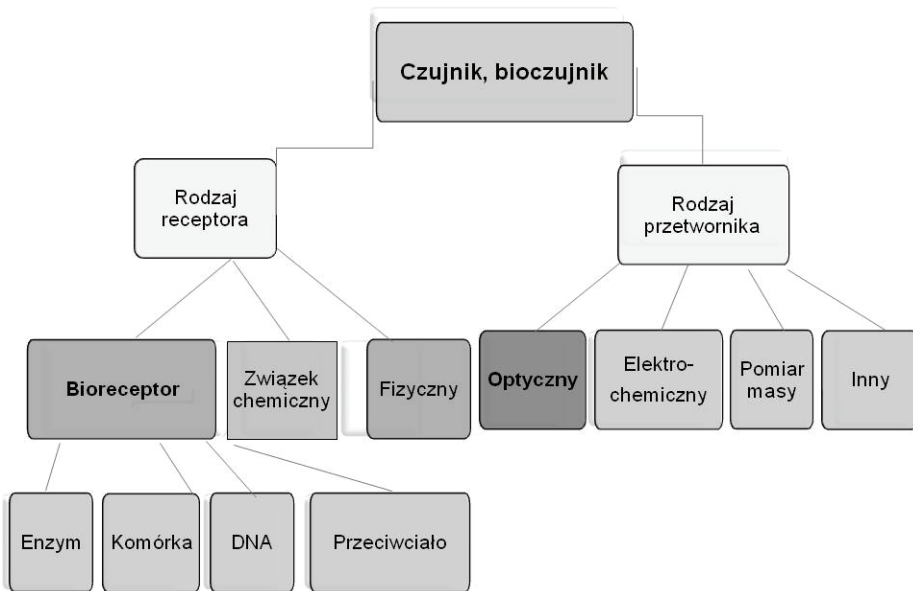
Osiągnięcia techniki (m.in. zwiększenie gęstości zapisu danych dzięki zastosowaniu odczytu przy krótszej długości fali, zwiększenie mocy jednostek obliczeniowych przy jednoczesnej ich miniaturyzacji, zastosowanie procesorów czterordzeniowych) zaowocowały rozwojem znanych już metod pomiarowych oraz wprowadzeniem nowych metod w dziedzinach związanych z naukami medycznymi i biologicznymi powiązanych z techniką, np. w inżynierii biomedycznej i biotechnologii. Również inżynieria materiałowa przeżywa ostatnio intensywny rozwój [4, 5]. Powstają nowe materiały, które znajdują coraz to nowsze zastosowania, od kosmonautyki poczynając, a na biotechnologii kończąc [6, 7].

Bezpośrednio związana z rozwojem tych dziedzin ewolucja terminologii jest monitorowana przez Międzynarodową Federację Chemii Klinicznej i Medycyny Laboratoryjnej (*International Federation of Clinical Chemistry IFCC*) [8]. Firmy produkujące analityczne urządzenia medyczne konstruują i kalibrują swoje urządzenia w oparciu o rekomendacje IFCC [9, 10].

Optyczne metody detekcji ze względu na nieinwazyjność i małą wrażliwość na zakłócenia zewnętrzne znajdują coraz szersze zastosowanie w medycynie, również w konstrukcji bioczujników [11]. Podstawową rolą każdego czujnika, w tym biosensora, jest detekcja ważnych substancji lub zmian w środowisku. Każdy czujnik składa się z dwóch podstawowych układów: układ receptora, który jest układem rozpoznawania i układ przetwornika (ang. *transducer*), który ma zadanie przetransferować informację na jakiś inny sygnał, który jest łatwo analizować. Receptor może być związkiem chemicznym, cząstką biologiczną lub układem fizycznym. Często czujniki, których receptorami są związki biologicznie czynne nazywamy bioczujnikami. Bioczujnikami nazywane są też czujniki substancji biologicznie czynnych, niezależnie od rodzaju receptora. Terminem biosensor określa się więc dwa pojęcia: urządzenie stosowane do monitorowania zjawisk biologicznych lub urządzenie zawierające elementy biologiczne. W tym drugim znacze-

niu jest bardzo często używane przez projektantów i konstruktorów czujników. Jednakże najczęściej biosensorem jest urządzenie, zawierające elementy biologiczne i służy do monitorowania parametrów obiektów żywych i procesów biologicznych [12, 13].

Metody detekcji mogą być np. optyczne lub elektrochemiczne. Czujniki, które pracują w oparciu o optyczne metody detekcji, nazywamy czujnikami optycznymi. Podstawy klasyfikacji czujników przedstawiono na rys. 11.2.



Rys. 11.2. Schemat klasyfikacji czujników

Część receptorowa czujników może być zbudowana z różnych materiałów. Najczęściej stosowane są polimery, materiały ceramiczne i szklane materiały porowate. Materiały te odgrywają ważną rolę w różnych gałęziach przemysłu, w chemii, w technice i elektronice, ale należy podkreślić ich znaczenie także w medycynie i biotechnologii. Polimery to materiały, które powstają podczas łączenia się związków chemicznych zwanych monomerami z identycznymi (tzw. proces polimeryzacji) lub z innymi cząsteczkami (tzw. proces kopolimeryzacji) [14].

Materiały ceramiczne i szklane materiały porowate to ciała stałe, w których niekryształicznej sieci występują wolne przestrzenie zwane porami. Pory są różnej wielkości i tworzą różne układy przestrzenne. Z materiałów porowatych mogą być wytwarzane wszystkie elementy optycznych czujników chemicznych, czyli na przykład wysokiej jakości filtry, membrany, części składowe bioreaktorów, a także pokrycia izolacyjne [15, 16]. W materiałach takich można zamknąć różne wskaźniki, które mogą mieć kontakt z otoczeniem poprzez porowatą strukturę materiału bazowego.

Wskaźnik (indykator) – substancja pozwalająca na stwierdzenie danej cechy. Najbardziej znane wskaźniki to związki chemiczne zmieniające barwę w pobliżu punktu równoważnikowego miareczkowania, tzw. wskaźniki pH, zmieniające barwę w zależności od stężenia jonów wodorowych H^+ .

11.2. Podstawowe definicje

11.2.1. Czujnik chemiczny

W 1991 roku w czasopiśmie *Pure and Applied Chemistry* ukazał się artykuł pod tytułem *Chemical sensors: definitions and classification*, w którym autorzy dokonali podsumowania dotyczącego terminologii rekomendowanej przez Międzynarodową Unię Chemii Czystej i Stosowanej (*International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC* [17], dostępny także w internecie [18]). Zawarte w artykule słownictwo dotyczy opisu terminologii czujnikowej w bardzo szerokim zakresie, nie tylko czujników optycznych i biosensorów.

Zgodnie z definicją *IUPAC* czujnik chemiczny to urządzenie, które przetwarza informację chemiczną (począwszy od stężenia określonego składnika próbki, tzw. analitu, aż po ogólny skład matrycy detektora) na sygnał analitycznie użyteczny. Źródłem informacji chemicznej może być reakcja chemiczna z udziałem oznaczanego składnika zwanego analizem lub fizyczna właściwość badanego materiału.

Analit – określony składnik badanej próbki, poszukiwany w procesie rozpoznania chemicznego. Może być składnikiem płynów ustrojowych, tkanek, roztworów czy mieszanin gazów.

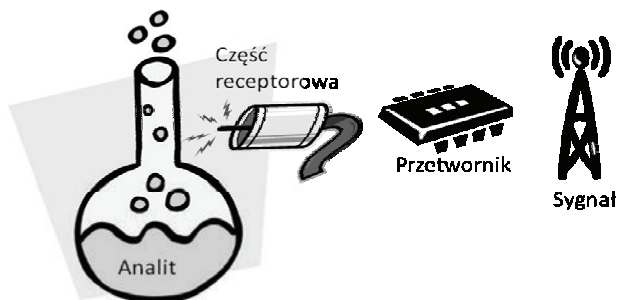
Czujnik chemiczny (patrz rys. 11.3), podobnie, jak i inne czujniki, składa się z dwóch podstawowych części:

- receptorowej (zamiana informacji chemicznej na inny rodzaj informacji),
- przetwornikowej (zamiana mierzonego sygnału na sygnał elektryczny, optyczny, akustyczny).

Poza wymienionymi elementami niektóre czujniki mogą zawierać ponadto tzw. separator, np. membranę lub też film [19]. Część receptorowa, w której następuje zamiana informacji chemicznej na inny typ sygnału, który może być zmierzony, może funkcjonować na zasadzie:

- fizycznej – np. czujniki bazujące na pomiarze absorpcji lub współczynnika załamania,

- chemicznej – reakcja chemiczna z udziałem analitu powoduje zmianę sygnału,
- biochemicznej – źródłem sygnału jest proces biochemiczny.



Rys. 11.3. Schemat działania czujnika chemicznego

Innym rodzajem są immunoczuJNIKI. Czasem są rozpatrywane jako osobna podgrupa czujników chemicznych/biologicznych. Biosensor powinien być wyraźnie odróżniany od kompleksowych systemów bioanalitycznych, które wymagają dodatkowych kroków w procesie przetwarzania, np. dodawania odczynników chemicznych [20].

W niektórych przypadkach nie jest możliwe jednoznaczne rozróżnienie czy czujnik pracuje na zasadzie fizycznej czy chemicznej. Dotyczy to na przykład przypadku, kiedy mamy do czynienia z sygnałem wywołanym procesem chemisorpcji¹.

11.2.2. Biosensor

Według IUPAC biosensor to specjalny rodzaj czujnika bazujący na procesie rozpoznawania biochemicznego/biologicznego. Receptor czujnika zawiera składnik biologicznie czynny, np. enzym, antygen lub przeciwciało, liposomy, fragmenty tkanek roślinnych lub zwierzęcych [21].

Jednym z pierwszych czujników, który odpowiadał definicji biosensora była skonstruowana w 1962 roku elektroda enzymatyczna do pomiarów stężenia glukozy [22]. Innym równie wcześnie skonstruowanym biosensorem był detektor mocznika, produktu końcowego przemiany aminokwasów i białek, a zarazem głównego składnika moczu [23, 24].

¹ Chemisorpcja – adsorpcja chemiczna, polegająca na tworzeniu się silnych wiązań chemicznych między adsorbentem i adsorbentem. Aby usunąć chemisorbowaną cząsteczkę, nie wystarczy obniżyć ciśnienie lub stężenie adsorbentu, wystarczające w przypadku adsorpcji fizycznej, należy np. podnieść temperaturę. W niektórych przypadkach usunięcie adsorbentu może być niemożliwe bez destrukcji adsorbentu. Przykładem jest tlen chemisorbowany na węglu aktywnym; po ogrzaniu wydzielą się, ale w postaci tlenków węgla.

11.2.3. Aktuator

Oprócz receptora i przetwornika, niektóre czujniki mogą zwierać dodatkowy tzw. aktuator. Aktuator to urządzenia wykorzystujące sygnał z czujnika do realizacji określonego działania [25]. Najprostsze przykłady aktuatorów to detektor dymu i alarm połączony ze spryskiwaczami czy też czujnik pH i zawór hydrauliczny do odcięcia dopływu cieczy. Każdemu człowiekowi znany jest bioaktuator składający się z czujnika temperatury, wbudowanego w skórę jego własnej dłoni, i efektora, który realizuje/wykonuje polecenie cofnięcia tej dłoni (poprzez zadziałanie jego własnych mięśni) po przekroczeniu pewnego progu temperatury. Takimi czujnikami są też inne ciała receptorowe w naszej skórze. W inżynierii biomedycznej akтуatory w połączeniu z czujnikiem dotyku są stosowane w projektowaniu sztucznych mięśni, kończyn czy części kończyn, w robotyce np. w robotach chirurgicznych. Innym przykładem są akтуatory czujników temperatury stosowanych w operacjach laserowych, które mają za zadanie wyłączyć laser, gdy temperatura w tkance przekroczy ustaloną w danym typie zabiegu.

11.3. Klasyfikacja czujników

11.3.1. Podział czujników według typu przetwornika

Według typu zastosowanego przetwornika czujniki można przykładowo podzielić na:

- optyczne,
- elektrochemiczne,
- masowe,
- termiczne.

Czujniki optyczne śledzą zmiany optyczne, które są wynikiem oddziaływania analitu z częścią receptorową. Przy czym wykorzystuje się różne oddziaływania światła z materią:

- absorbcja – mierzona w przezroczystym medium; jej zmiany są powodowane przez sam analit lub przez wskaźnik (indykator); wykorzystywane jest tu światło widzialne i podczerwień,
- refleksja – mierzona w nieprzezroczystym medium, zwykle przy użyciu wskaźnika,
- luminescencja – pomiar natężenia promieniowania emitowanego przez układ receptora w wyniku reakcji chemicznej,
- fluorescencja, a częściej pomiary jej wygaszania,

- pomiar współczynnika załamania, którego zmiana jest wynikiem zmiany składu roztworu lub efektem zjawiska rezonansu plazmonów powierzchniowego²,
- rozpraszanie spowodowane obecnością w badanej próbce cząstek o zdefiniowanym rozmiarze [26].

11.3.2. Podział czujników według mechanizmu czujnikowego

Optyczne systemy czujnikowe bazują na detekcji jednego parametru lub na wykrywaniu kombinacji kilku parametrów poprzez wymienione poniżej efekty optyczne (patrz tab. 1). Przetworniki optyczne oferują największą liczbę możliwych rozwiązań konstrukcyjnych.

Tabela 1. Przykłady efektów optycznych wywołanych przez zmiany wybranych parametrów

Parametr, którego zmiana wywołuje określony efekt optyczny	Efekt modulacji optycznej
Siła mechaniczna	Dwójłomność wiązki
Ciśnienie	Zjawisko piezooptyczne, elastooptyczne
Zmiany gęstości	Triboluminescencja
Pole elektryczne	Efekt elektrooptyczny
Polaryzacja dielektryczna	Efekt elektrochromatyczny
Prąd elektryczny	Elektroluminescencja
Pole magnetyczne	Efekt magnetoptyczny
Polaryzacja magnetyczna	Zjawisko Faradaya
	Magnetoabsorpcja
Temperatura	Efekty termiczne
Zmiany składu chemicznego (reakcje)	Zmiany absorpcji
	Zmiany współczynnika załamania
	Fluorescencja

11.3.3. Inne sposoby klasyfikacji czujników

Czujniki klasyfikuje się również ze względu na konkretny sposób zastosowania, czego przykładem może być klasyfikacja ze względu na rodzaj wykrywanego składnika badanej próbki (analitu). Czujniki takie można podzielić na stosowane do wykrywania i określania poziomu:

- pH,
- jonów,

² Plazmon powierzchniowy – elektromagnetyczna fala powierzchniowa, o polaryzacji typu p, propagująca się wzdłuż powierzchni styku dwóch materiałów, których stałe dielektryczne mają przeciwne znaki.

- gazów,
- par substancji.

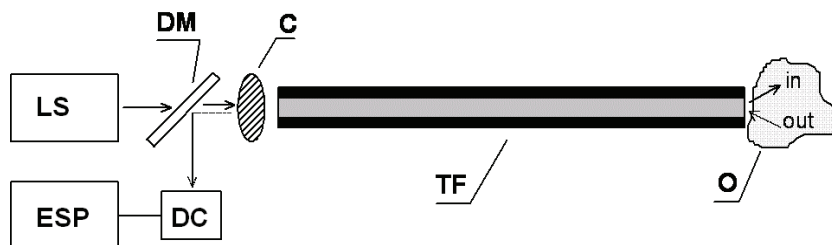
Czujniki klasyfikuje się ponadto według trybu pracy (I sposób):

- *in vivo*,
- *in vitro*,
- *in situ*,
- do monitorowania procesów w trybie ciągłym,

oraz (II sposób):

- bezpośrednie,
- pośrednie.

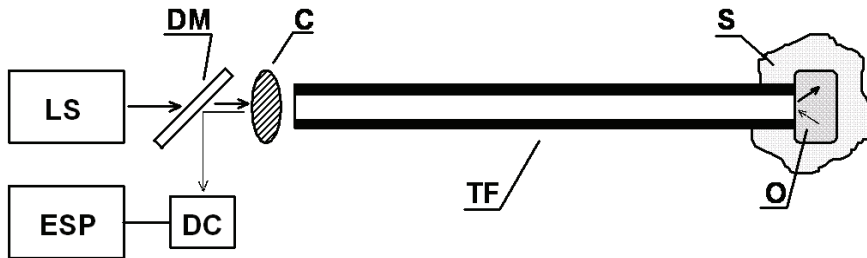
Ponadto możemy wyróżnić czujniki jednorazowe i czujniki wielokrotnego użytku. Podział czujników na bezpośrednie i pośrednie jest podziałem konstrukcyjno-funkcyjnym. W czujniku bezpośrednim przetwornik optyczny oraz część receptorowa są częściami tej samej cząsteczki, np. chromoforu [27]. Cząsteczki te mogą być bezpośrednio na światłowodzie związane kowalencyjnie z powierzchnią, unieruchomione na membranie lub w cienkiej warstwie materiału o zbliżonym do rdzenia włókna współczynnika załamania. Czujniki takie są realizowane najczęściej w oparciu o włókna optyczne, jak przedstawiono schematycznie na rys. 11.4. Funkcją przetwornika jest pomiar np. zmian natężenia barwy lub fluorescencji. Przykłady detekcji to wykrywanie zmian pH, stężenia O_2 , CO_2 oraz obecności jonów.



Rys. 11.4. Schemat czujnika światłowodowego typu bezpośredniego: C – sprzągacz optyczny, DC – detektor, DM – zwierciadło dichroiczne, ESP – układ elektronicznej obróbki sygnału, LS – źródło światła, O – badany ośrodek, TF – światłowód

W czujnikach pośrednich proces rozpoznania i proces przetwarzania są odseparowane. Również geometria układu czujnikowego jest nieco inna niż w przypadku czujnika bezpośredniego. Często stosowana w tych rozwiązaniach optoda czujnika (omówiona dokładniej w następnym rozdziale) zawiera najczęściej i część receptorową w postaci cząsteczek rozpoznających i – stanowiące część przetwornikową – cząsteczki wykrywające zmianę optyczną. Oba składniki są unieruchomione w materiale optody, którą umieszcza się na końcówce światłowodu, na powierzchni falowodu lub wykorzystuje tzw. falowody kapilarne (ang. *hollow fibers*) [28] (patrz rys. 11.5). Najczęstsze zastosowania to wykrywanie jonów i konstrukcja biosensorów enzymatycznych.

Optoda – część czujnika optycznego odpowiedzialna za detekcję danej substancji i przesłanie sygnału do dalszej analizy.



Rys. 11.5. Schemat czujnika światłowodowego typu pośredniego z optodą: C – sprzęgacz optyczny, DC – detektor, DM – zwierciadło dichroiczne, ESP – układ elektronicznej obróbki sygnału, LS – źródło światła, O – optoda, S – badany ośrodek, TF – światłowód

11.4. Parametry czujników

Czujniki są projektowane do pracy ze specyficznymi analitami występującymi w pewnych rodzajach próbek w dobrze zdefiniowanych warunkach. Podstawowe parametry czujników to dokładność i powtarzalność pomiarów. Bardzo często czujniki są transportowane, a potem pracują w różnych warunkach, zatem liczy się również ich odporność i trwałość. Odporność to zdolność urządzenia do utrzymania swoich parametrów nawet w skrajnych warunkach działania. Trwałość to mechaniczna odporność na wstrząsy lub wibracje oraz chemiczna oporność (inertność), czyli niezależność pracy czujnika od zmian otoczenia (chemicznych) [29]. Jak już wspomniano, czujniki optyczne wykazują dużą odporność na zakłócenia wywoływane przez pole magnetyczne i elektryczne.

Najważniejsze parametry pomiarowe, to między innymi [30, 31]:

- granica oznaczalności (ang. *detection limit*) – stężenie lub zawartość, dla których średnia wartość mierzonego sygnału jest równa wartości dwóch odchyłek standardowych,
- czułość (ang. *sensitivity*) – nachylenie krzywej odpowiedzi czujnika, wyrażone jako wartość sygnału na jednostkę np. stężenia danej substancji,
- zakres dynamiczny (ang. *dynamic range*) – zakres stężeń, w których czułość jest większa od zera,
- selektywność (ang. *selectivity*) – zdolność czujnika do pomiaru stężenia jednego chemicznego składnika w obecności innych, bez wpływu tych innych substancji,

- czas odpowiedzi (ang. *response time*) – czas, w którym wyjściowy sygnał czujnika osiąga 63% ($1/e$) wartości końcowej w odpowiedzi na skokową zmianę stężenia oznaczanej substancji; w praktyce częściej używa się wartości $t_{95\%}$, tj. czasu odpowiedzi, w którym sygnał osiągnie 95% wartości końcowej,
- czas życia (ang. *life time*) – okres poprawnego działania czujnika z zaznaczeniem trybu stosowania (w użyciu, przechowywanie).

Biorąc pod uwagę parametry czujników, należy uwzględnić tzw. czucie chemiczne. Czuciem chemicznym nazywa się etap zbierania informacji (akwizycja danych), w którym otrzymuje się fragmentaryczny obraz składu chemicznego badanego układu w czasie rzeczywistym. Elementem informacji jest wzmocniony sygnał, zależny od stężenia określonych substancji chemicznych. Proces zbierania informacji (akwizycja danych) składa się z dwóch etapów: rozpoznania i wzmocnienia.

Akwizycja danych przebiega dwuetapowo, ponieważ pierwotny sygnał wymaga wzmocnienia w celu otrzymania informacji w użytecznej i niezaburzonej formie. Projektując czujniki, należy wziąć pod uwagę typy oddziaływań substancji analizowanej z czujnikiem. Mogą się tu pojawić:

- powierzchniowe oddziaływanie analizowanej substancji zaadsorbowanej na powierzchni czujnika,
- wewnątrzfazowe oddziaływanie analizowanej substancji zaadsorbowanej na optodzie wykonanej z materiałów porowatych.

Mając w pamięci omawiane wcześniej rozwiązania stosowane w konstrukcji czujników (pośrednie, bezpośrednie) należy wziąć pod uwagę rodzaje oddziaływań występujących w przyrodzie (rzędy energii oddziaływań podane w $\text{kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$):

- wiązanie kowalencyjne 10–50,
- jon–jon 2,5–25,
- siły Londona 0,2–2,5,
- wiązanie wodorowe 0,2–2,5,
- jonowo indukowany dipol 0,02–0,2,
- dipol–dipol 0,02,
- wiązanie hydrofobowe 0,07–0,1.

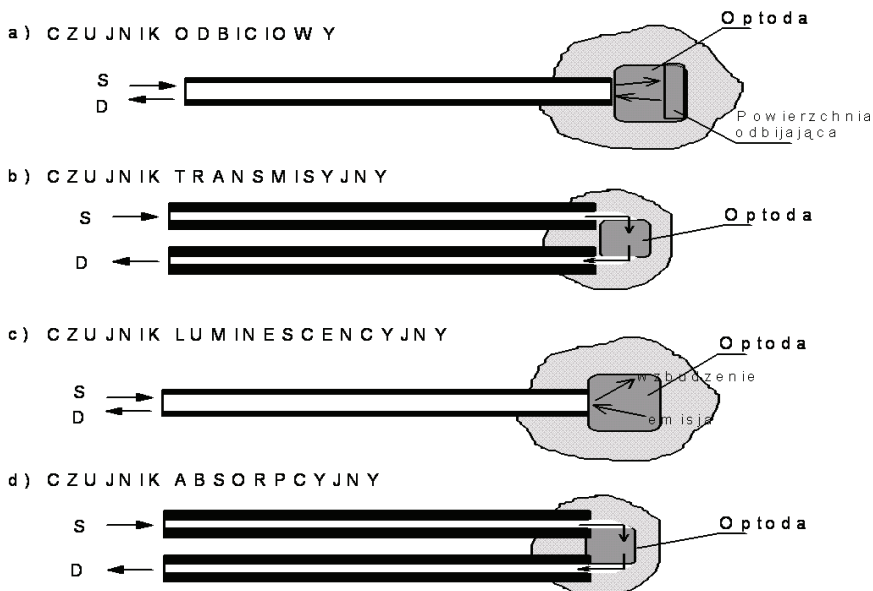
Jak wynika z przedstawionego zestawienia najsilniejszym wiązaniem chemicznym jest wiązanie kowalencyjne (atomowe).

11.5. Optody czujników światłowodowych

11.5.1. Optoda

Omawiając pojęcie czujnika pośredniego, wspomniano o ważnym elemencie układu detekcyjnego zwanym optodą. Czujnik pośredni charakteryzuje się tym, że do koń-

cowego odcinka światłowodu dołączany jest miniaturowy przetwornik. W roku 1983 roku Opitz i Lubers zaproponowali, aby ten przetwornik optyczny nazywać optodą, podobnie, jak termin elektroda używany w elektronice [32]. Optoda jest elementem, który wszelkie zmiany środowiskowe zarówno fizyczne, jak i chemiczne, zamienia na zależne od nich zmiany absorpcji, emisji, czasów życia, zmiany barwne czy polaryzacji ośrodka przetwarzającego. Po pobudzeniu promieniowaniem doprowadzanym do optody światłowodem, jej reakcja, czyli odpowiedź optyczna, jest transmitowana do detektora i układów analizujących tym samym lub opcjonalnie drugim światłowodem, podobnie, jak w przypadku sensora bezpośredniego. Ważnym aspektem przy produkcji optod czujników światłowodowych jest przekroczenie bariery technologicznej miniaturyzacji tych elementów oraz rozwiązanie problemu ich przyłączenia do końcówki światłowodu. Światłowodowe czujniki optyczne pracują w jednym z trybów przedstawionych przykładowo na rys. 11.6.



Rys. 11.6. Sposoby realizacji pomiarów pośrednich przy użyciu włókien optycznych i optod:
S – sygnał wejściowy (od źródła światła do optody), D – sygnał wyjściowy (do detektora)

O ile miniaturyzacja jest problemem, który nie ma jednego, generalnego rozwiązania i każdy konstruktor musi ten problem rozwiązać według własnej inwencji, to na przyłączenie optod jest kilka poznanych i opracowanych sposobów. Niektóre z nich przedstawiono na rys. 11.7. Opłaszczanie końcówki światłowodu i optody realizuje się poprzez nasunięcie przezroczystej (lub nie) rurki, np. kapilary (patrz rys. 11.7d), albo pokrycie półprzepuszczalnym płaszczem (patrz rys. 11.7a). Optodę można również przykleić do końcówki włókna klejem o odpowiednio dobranym współczynniku za-

łamania (patrz rys. 11.7b). Innym rozwiązaniem jest naniesienie optody, np. napylanie, powleczenie w postaci cienkiej warstwy (filmu) (patrz rys. 11.7c).

a) Opłaszczanie



b) Klejenie



c) Napylenie filmu



d) Opłaszczanie kapilarą



Rys. 11.7. Sposoby łączenia optod ze światłowodami

Optodę może stanowić ciało stałe, lub też optoda może być roztworem, umieszczonym w specjalnym zbiorniku. Optoda może też mieć formę cienkiej warstwy (filmu) napyłonej na końcówkę włókna. Wszystkie te rozwiązania różnią się przede wszystkim komplikacją procesu technologicznego, który determinuje koszt produkcji danej optody, a także fizycznymi i chemicznymi właściwościami matryc lub filmów do szybkiej wymiany substancji, wchodzących w reakcję z unieruchomionymi reagentami.

W najnowszych rozwiązaniach najczęściej stosuje się napylenie (tylko w procesach przemysłowych i przy masowej produkcji) oraz szkła o kontrolowanej wielkości porów (ang. *controlled pore glasses* CPG).

Każda matryca, płaszcz oraz substancje aktywne użyte do konstrukcji optody powinny charakteryzować się odpowiednią niewrażliwością na warunki środowiska, w szczególności wynik pomiarów nie powinien być zakłócony przez inne parametry fizyczne czy chemiczne. Szczególnie ważne jest to w zastosowaniach medycznych.

Należy także pamiętać, że przy przejściu światła do i z optody następują duże straty energetyczne. W dobrze dopracowanym układzie optycznym, przy odpowiednim doborze klejów oraz symetrii i profili optod, tłumienie sygnału może wynieść całkiem sporo, bo ok. 0,5 dB na samych tylko przejściach międzyfazowych.

Optoda – element czujnikowy, który wszelkie zmiany środowiskowe, zarówno fizyczne, jak i chemiczne, zamienia na zależne od nich zmiany absorpcji, emisji, czasów życia, zmiany barwne czy polaryzacji ośrodka przetwarzającego.

11.5.2. Światłowody

Pod względem szybkości i jakości przepływu informacji światłowody mają wiele zalet, gdyż ten sposób transmisji sygnałów jest niewrażliwy na zakłócające pola elektromagnetyczne, co jest szczególnie istotne w środowisku biomedycznym. Za osiągnięcia dotyczące transmisji światła we włóknach optycznych w 2009 roku nagrodę Nobla otrzymał prof. Charles Kuen Kao [33].

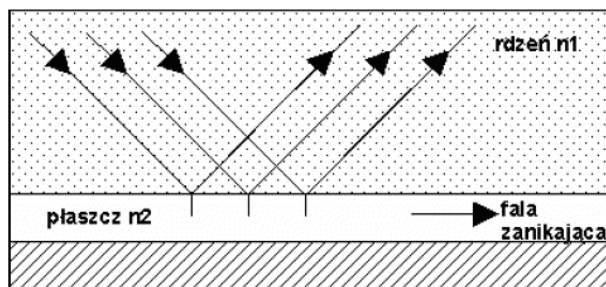
Do najważniejszych zalet światłowodów należą:

- ogromna pojemność informacyjna pojedynczego włókna,
- małe straty i związana z tym zdolność przesyłania sygnałów na znaczne odległości,
- całkowita niewrażliwość na zakłócenia elektromagnetyczne,
- mała masa,
- niewielkie wymiary,
- bezpieczeństwo pracy (brak iskrzenia),
- utrudniony lub prawie niemożliwy podsłuch przesyłanych danych,
- względnie niski koszt (włókna specjalne i medyczne są nieco droższe niż telekomunikacyjne),
- duża niezawodność (poprawnie zainstalowanych łączy światłowodowych),
- prostota obsługi.

Biomedyczne zastosowania światłowodów to przede wszystkim tory wizyjne, prowadnice mocy optycznej i wzierniki, jak również czujniki, np. typu laboratorium na chipie (ang. *lab-on-a-chip*), oraz inne układy połączeń optycznych i optyczne szyny transmisji danych (ang. *optical backplane*) do zastosowań w medycynie.

W optycznym czujniku chemicznym wiązka światła przenoszona między elementami czujnika za pomocą włókien światłowodowych, oddziałuje przez całą drogę z granicą między ośrodkami o różnej gęstości optycznej, które to oddziaływanie zachodzi bez strat dzięki zjawisku całkowitego wewnętrznego odbicia. Światło, które dochodzi do granicy faz rdzeń–płaszcz światłowodu pod kątem większym od kąta krytycznego, ulega całkowitemu odbiciu wewnętrznemu. Mimo to niewielka część

promieniowania penetruje na małą głębokość w głąb płaszcz, tworząc falę zanikającą (ang. *evanescent wave*), jak przedstawiono schematycznie na rys. 11.8. Fala zanikająca rozprzestrzenia się równoległe do granicy faz rdzeń–płaszcz i może oddziaływać z cząsteczkami znajdującymi się w płaszczu blisko tej granicy.



Rys. 11.8. Kierunek propagacji fali zanikającej we włóknie światłowodowym

Powstawanie fali zanikającej jest zjawiskiem często wykorzystywanym w konstrukcji światłowodowych czujników optycznych. W takim przypadku płaszcz zostaje zastąpiony fazą zawierającą czynnik, którego właściwości optyczne zmieniają się przy oddziaływaniu z próbką, np. odpowiednio zaprojektowaną optodą. Zaletą tego rozwiązania jest to, że oddziaływania mają miejsce w warstwie optody. Możliwe jest więc opracowanie czujnika, w którym optoda jest na tyle cienka, że pozwala na szybkie ustalenie stanu równowagi z próbką, co skraca czas odpowiedzi czujnika. Warstwa ta musi być jednocześnie wystarczająco gruba, by zapobiegała oddziaływaniom między falą zanikającą a badaną próbką, co doprowadziłoby do powstania błędów.

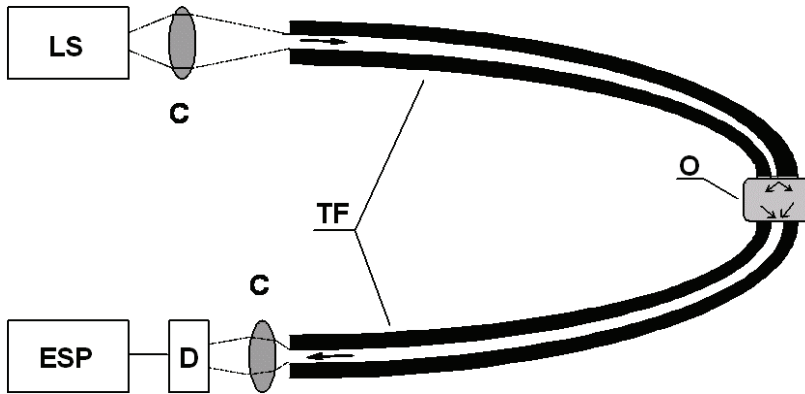
Do konstrukcji czujników wykorzystuje się praktycznie wszystkie rodzaje falo-
wodów. Są to zarówno układy włókniste, jak i planarne, szklane i polimerowe, jedno-
modowe i wielomodowe, planarne i paskowe, skokowe i gradientowe, standardowe
i specjalne.

Konstrukcje czujników optycznych można podzielić:

1. według sposobu wykorzystania światłowodów:
 - sensory jednoświatłowodowe,
 - sensory dwu- lub wieloświatłowodowe,
2. według sposobu oddziaływania ze światłowodem:
 - sensory z modyfikowaną strukturą światłowodu,
 - sensory z niemodyfikowanym włóknem światłowodowym.

Do konstrukcji jednoświatłowodowego czujnika może być użyty pojedynczy świa-
tłowód jako włókno jednocześnie doprowadzające i transmitujące światło do układu
detekcyjnego. Układ pomiarowy znacznie upraszcza się, jeżeli mamy do czynienia
z transmisyjnym czujnikiem jednoświatłowodowym (również wykorzystującym zja-
wisko fali zanikającej) (patrz rys. 11.9). Źródło światła można umieścić na jednym

końcu włókna, natomiast fotodetektor na drugim. Taki układ nie wymaga dodatkowych elementów optycznych, jak np. zwierciadło dichroiczne.



Rys. 11.9. Schemat blokowy prostego układu czujnika światłowodowego. C – sprzączacz optyczny, D – detektor, ESP – układ elektronicznej obróbki sygnału, LS – źródło światła, O – badany osrodek, TF – światłowody

Grupę czujników jednoświatłowodowych można podzielić na:

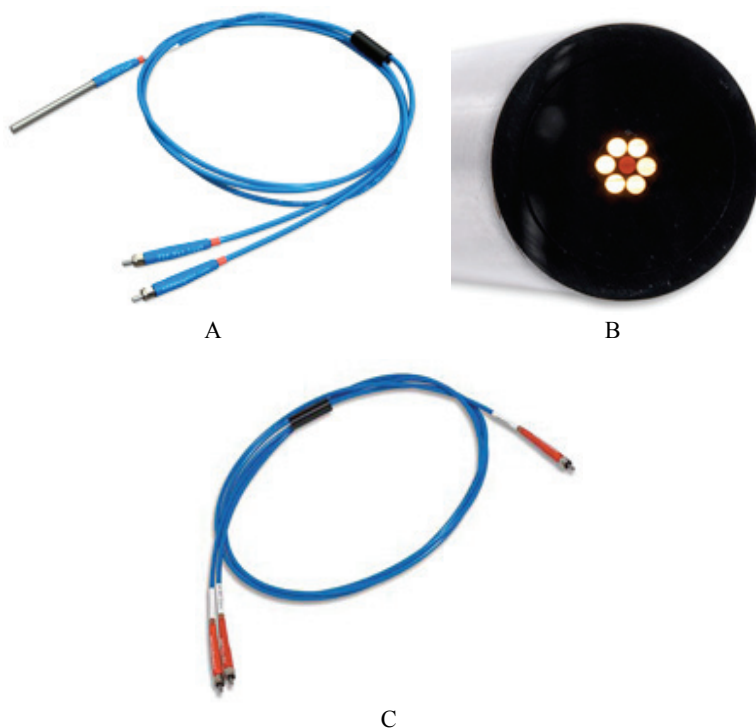
- układy transmisyjne zbudowane ze światłowodu z usuniętym płaszczem i zamiast niego naniesioną warstwą czułą na badany parametr. Zmiana absorpcji lub współczynnika załamania nowego płaszcza, spowodowana zmianą stężenia badanej substancji, wpływa na właściwości transmisyjne światłowodu. Wykorzystuje się tu zjawisko częściowego wnikania pola elektromagnetycznego do obszaru płaszcza światłowodu, tzw. fali zanikającej,
- układy reflektancyjne (odbiciowe), w których promieniowanie ze źródła światła dociera do optody i powraca do układu detekcyjnego tym samym światłowodem.

W konstrukcjach sensorów dwuświatłowodowych lub wykorzystujących wiązkę światłowodów promieniowanie dociera do optody jednym światłowodem, ulega modyfikacji w stopniu zależnym od stężenia badanej substancji i jest transmitowane do detektora drugim włóknom. Wykorzystanie wiązki światłowodów, zamiast pojedynczego włókna, prowadzi do uzyskania większej mocy docierającej do optody oraz do uzyskania wyższego natężenia sygnału detekcyjnego kosztem większych wymiarów geometrycznych sensora.

W zależności od konstrukcji czujnika, można stosować różne układy pomiarowe. Rozwiązaniem układu pomiarowego w przypadku niemodyfikowanego jednoświatłowodowego (lub wiązki światłowodów) czujnika jest stosowanie zwierciadła dichroicznego (por. rys. 11.4 oraz 11.5). Zwierciadło takie charakteryzuje się wysokim współczynnikiem odbicia dla wzbudzającej wiązki pierwotnej i wysoką przepuszczalnością dla wiązki wtórnej. Pomaga to w oddzieleniu wiązki wtórnej od powracającej w niezmięnionej formie wiązki pierwotnej do detektora. W takich układach można

stosować bardzo proste i tanie źródła i detektory, np. źródłem promieniowania może być dioda półprzewodnikowa, a detektorem fototranzystor lub fotodioda.

Jeszcze innym rozwiązaniem układu pomiarowego może być użycie oddzielnych włókien lub wiązek światłowodów w formie rozwidlonego układu włókien (ang. *bifurcated*) do doprowadzenia promieniowania do optody i odprowadzenia sygnału z optody (patrz rys. 11.10).



Rys. 11.10. Komercyjnie dostępne rozwiązania: A – wiązka światłowodów w sondzie odbiciowej, B – układ włókien odprowadzających i doprowadzających sygnał, C – rozwidlony układ włókien ze sprzęgaczem typu Y [34]

11.6. Metody unieruchamiania cząsteczek detekcyjnych

Jedną z podstawowych części czujnika jest część receptorowa. Jej działanie polega na detekcji chemicznej za pomocą unieruchomionego w matrycy wskaźnika (indykatora). Wspomniany wskaźnik jest unieruchomiony, jeżeli jego mobilność jest ograniczona w sposób chemiczny lub fizyczny. Metody unieruchamiania cząsteczek detek-

cyjnych można podzielić na fizyczne (adsorpcja, pułapkowanie) i chemiczne (wiązanie, sieciowanie).

Adsorpcja to najstarsza i najłatwiejsza metoda unieruchamiania. Siły adsorbujące to oddziaływania van der Waalsa, wiązania jonowe i wodorowe. Adsorbent powinien mieć dużą pojemność i silne powinowactwo do wykrywanej cząsteczki. Ponadto nie powinien adsorbować ani produktów reakcji ani też katalizatorów. Materiały stosowane do unieruchamiania receptorów poprzez adsorpcję, to m.in.:

- wymiennicze jonowe (anionowe, kationowe),
- aktywowany węgiel drzewny,
- żel krzemionkowy (często spotykany w wyrobach galanteryjnych),
- materiały ceramiczne,
- materiały szkliste o kontrolowanych rozmiarach porów (ang. *controlled pore glasses*, CPG) [35],
- tlenek glinu.

Pułapkowanie to proces, w którym cząsteczki receptora wprowadza się do roztworu monomeru, który następnie jest polimeryzowany. Cząsteczki receptora są pułapkowane w oczkach sieci polimeru podczas procesu sieciowania [36, 37, 38]. Po zakończeniu procesu pułapkowania cząsteczki receptora nie dyfundują poza sieć polimeru, a małe cząsteczki substratów i produktów reakcji mogą się przemieszczać przez i wewnątrz materiału-pułapki. Materiały stosowane do przygotowania pułapek, to na przykład:

- poliakrylamid,
- guma silikonowa,
- alkohol poliwinylowy,
- poliuretan,
- materiały zol-żelowe,
- skrobia (krochmal).

Obszar działania cząsteczki receptora można ograniczyć również dzięki zastosowaniu separatorów w postaci błon półprzepuszczalnych (membran), jak również zamknąć w liposomach lub w małych okrągłych strukturach zbudowanych z pojedynczej membrany. Substraty i produkty mogą zarówno swobodnie dyfundować przez te ograniczone przestrzenie struktury podczas procesu rozpoznawania, jak i tymczasowo pozostawać wewnątrz nich.

Sieciowanie to tworzenie wiązań kowalencyjnych pomiędzy związkami o małej masie cząsteczkowej oraz cząsteczkami receptora w celu uzyskania związku sieciowego [39, 40]. Cząsteczki receptora mogą być sieciowane albo same ze sobą albo kosiociowane, np. z nieaktywnym białkiem, takim jak albumina. Czynniki, które wpływają na stopień usieciowienia, są [41, 42]:

- stężenie receptora i czynnika sieciującego,
- pH środowiska,
- siła jonowa,
- temperatura i czas reakcji.

Przykłady związków homo-dwufunkcyjnych:

- estry kwasu jabłkowego,
- estry imidów,
- bisaldehydy (aldehyd glutarowy),
- fotoreaktywne aryloazydy.

Przykłady związków hetero-dwufunkcyjnych:

- związki sieciujące reaktywne w kierunku grupy aminowej i tiolowej, np. N-succinimidyl-3(pyridyldithio)propionate (SPDP),
- związki sieciujące reaktywne w kierunku grupy karbonylowej i tiolowej,
- grupy fotoczułe: azydki arylu, benzofenon, związki diazo-, pochodne diazyryny.

Wiązanie kowalencyjne receptora z matrycą polimerową jest najlepszą możliwą metodą unieruchomienia [43, 44]. Można wymienić wiele barwnych wskaźników z grupami funkcyjnymi w reaktywnej formie:

- grupy izotiocyjanowe,
- grupy sulfonylowo-chlorkowe,
- grupy winylowo-sulfonylowe,
- grupy aminowe,
- grupy karboksylowe,
- grupy hydroksylowe.

Koncepcja domieszkowania chemicznego jest techniką pośrednią pomiędzy impregnacją a wiązaniem kowalencyjnym. Ogólnie rzecz biorąc, domieszkowanie chemiczne stanowi niedrogą metodę unieruchamiania reagentów. Wadą tego rozwiązania jest pewien określony stopień wyciekania (uciekania) organicznego modyfikatora.

Unieruchamianie wskaźników w/na polimerach ma kilka poważnych zalet. Polimery często używane w optodach czujników mogą pełnić jedną (lub kilka) z wymienionych funkcji:

- służą jako sztywna matryca, w/na której indykator jest unieruchomiony,
- mogą działać jako rozpuszczalnik lub klatka (pułapka) do unieruchamiania materiałów receptorowych,
- mogą stanowić izolację optyczną stosowaną celem ograniczenia promieniowania wprowadzanego z otoczenia do układu optycznego optody,
- są w stanie zapewnić selektywność, a w niektórych zastosowaniach poprawić sprawności selektywności,
- powłoki polimerowe są używane często jako powłoki ochronne.

11.7. Wady i zalety detekcji optyczno-chemicznej

Podstawowe problemy związane z czujnikami światłowodowymi to:

- konstrukcja optod – zastosowanie determinuje projekt optody i całego czujnika,
- kalibracja,

- niski poziom sygnału – często pomiary dotyczą sygnałów biologicznych, np. monitorowania stanu gruntu, badania osadów z dna jezior,
- starzenie się optod, spowodowane wpływem czasu i niekorzystnym oddziaływaniem środowiska,
- czas odpowiedzi – możliwość czucia bezkontaktowego, np. przez porowate szkło,
- mały zakres dynamiczny – badania przeprowadzane na żywych organizmach, roślinach, organach.

Do wad detekcji optyczno-chemicznej zalicza się między innymi takie czynniki, jak:

- wpływ zewnętrznego oświetlenia, np. w przypadku pomiarów bazujących na zjawisku fluorescencji sensor musi być izolowany od innych optycznych sygnałów lub wręcz pracować w warunkach zaciemnienia,
- ograniczona stabilność długoczasowa – niektóre barwniki (np. indykatory w optodach) wykazują zjawisko fotowysbielenia (ang. *photobleaching*) przy dużych natężeniach światła (np. laserowego),
- duży koszt, np. praca w ultrafiolecie wymaga drogich kwarcowych światłowodów.

Detekcja optyczno-chemiczna ma również kilka niezaprzeczalnych zalet:

- niezależność elektryczna – sygnały optyczne nie są podatne na oddziaływanie elektryczne (brak interferencji),
- zdalna detekcja – transmisja sygnałów optycznych na duże odległości 10–1000 m jest możliwa w niskostratnych światłowodach optycznych stworzonych na potrzeby komunikacji optycznej,
- duża gęstość informacji – sygnały optyczne różnią się długością fali, fazą, profilem zaniku, polaryzacją lub natężeniem,
- analiza w czasie rzeczywistym – próbkowanie nie jest konieczne.

11.8. Wybrane zastosowania czujników w medycynie

Optyczne czujniki chemiczne znajdują zastosowanie w technologii żywności, w ochronie zabytków, w wykrywaniu zagrożeń terrorystycznych. W inżynierii biomedycznej zastosowanie znajdują przede wszystkim w ochronie środowiska, biotechnologii i analityce medycznej, np. do oznaczania substancji będących substratami, aktywatorami lub inhibitorami enzymów. Użycie odpowiednich enzymów pozwala na selektywne i czułe oznaczanie we krwi, moczu, a także bezpośrednio w tkankach, fizjologicznie ważnych związków, jak mocznik, kwas moczowy, glukoza i inne cukry, lipidy, fosfolipidy, cholesterol i antybiotyki. Niektóre z tych czujników oraz podstawowe problemy związane z ich zastosowaniem zostaną omówione w poniższym rozdziale.

Historycznie rzecz ujmując, pierwsze optyczne czujniki chemiczne były stosowane do pomiaru pH oraz stężenia tlenu. Najprostsze rozwiązania to jednorazowe celulozowe paski nasączone wskaźnikiem pH, które po użyciu po prostu się wyrzucało. Potem pojawiły się paski, do których wskaźnik pH był związany kowalencyjnie. Pomiar odbywał się przez porównanie ze skalą odniesienia, a w przypadku zautomatyzowanym – reflektancję. Optyczna detekcja tlenu to dopiero lata trzydzieste 20. wieku, gdy zauważono wygaszanie fluorescencji niektórych związków chemicznych przy obecności tlenu [45]. Wraz z rozwojem technologii światłowodowej pojawiły się pierwsze światłowodowe czujniki tlenu [46]. Zaczęto wykrywać inne związki. Kamieniem milowym było skonstruowanie światłowodowego czujnika bazującego na powinowactwie konkanawaliny A do glukozy [47].

Ze względu na dynamiczny rozwój technologii światłowodowych i inżynierii materiałowej oraz odkrycia nowo syntezowanych związków chemicznych ostatnie dwadzieścia lat 20. wieku stało pod znakiem rozkwitu tej dziedziny, czego dowodem są liczne książki i prace przeglądowe poświęcone optycznym czujnikom chemicznym i ich zastosowaniom [48, 49, 50, 51, 52].

Duży postęp dokonał się też w dziedzinie czujników do zastosowań *in vivo*. Projektowanie czujników do zastosowań *in vivo* wymaga rozważenia kilku ważnych aspektów związanych z brakiem możliwości preparowania próbki, np. wirowania krwi celem separowania elementów morfotycznych. Ponadto należy minimalizować wpływ obecności czujnika w organizmie pacjenta. Spośród innych ważnych czynników determinujących konstrukcję czujnika należy wymienić biogodność (biokompatybilność), dobór materiałów, jego selektywność i czułość, układ kompensacji optycznej i odpowiednią kalibrację [53].

Literatura

- [1] BROVKO L., *Bioluminescence and fluorescence: for in vivo imaging*, SPIE Press, Bellingham 2010.
- [2] BIGGINS P., *Bio-inspired materials and sensing systems*, RSC Publishing, Cambridge 2011.
- [3] DUNN P.F., *Fundamentals of sensors for engineering and science*, CRC/Taylor & Francis, Boca Raton 2011.
- [4] LINDROOS V. et al. (red.), *Handbook of silicon based MEMS materials and technologies*, Elsevier, Amsterdam 2010.
- [5] SONGJUN L. (pod red.), *Biosensor nanomaterials*, Wiley-WCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim 2011.
- [6] GŁUSZEK. J., *Tlenkowe powłoki ochronne otrzymywane metodą sol-gel*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1998, 5–17.
- [7] SUN Y., ROGERS J.A. (pod red.), *Semiconductor nanomaterials for flexible technologies: from photovoltaics and electronics to sensors and energy storage/harvesting devices*, Elsevier, Amsterdam 2010.
- [8] IUPAC Compendium on Analytical Nomenclature, Chapter 19 Applications
http://old.iupac.org/publications/analytical_compendium/
- [9] <http://www.siemens.pl/diagnostyka/Default.aspx?idn=17&id=2>

- [10] ENTERS-WESTRA E., SLINGERLAND R.J., *Six of eight hemoglobin A_{1c} point-of-care instruments do not meet the general accepted analytical performance criteria*, Clinical Chemistry, 2010, Vol. 56, No. 1, 44–52.
- [11] VO-DINH T., ALLAIN L., *Biosensors for Medical Application*, 2-1–20-40, [w:] Biomedical Photonics Handbook, Vo-Dinh T. (Ed.), CRC Press, 2003.
- [12] TURNER A.P.F., *Biosensors: past, present and future*, Cranfield University, Cranfield, UK, 1996, dokument elektroniczny.
- [13] TURNER A.P.F., KARUBE I., WILSON G.S., *Biosensors: Fundamentals and Applications*, Oxford University Press, Oxford 1987, 770.
- [14] JONES R.G., JENKINS A., KRATOCHVIL P., *Compendium of polymer terminology and nomenclature: International Union of Pure and Applied Chemistry IUPAC recommendations 2008*, RSC Publishing, Cambridge 2009.
- [15] ISHIZAKI K., KOMARNENI S., NANKO M., *Porous materials: process technology and applications*, Kluwer Academic Publishers, Boston 1998.
- [16] LOWELL S. (red.), *Characterization of porous solids and powders: surface area, pore size and density*, Springer Verlag, Dordrecht 2010.
- [17] HULANICKI A., GŁĄB S., INGMAN F., *Chemical sensors: definitions and classification*, Pure and Applied Chemistry, 1991, Vol. 63, No. 9, 1247–1250.
- [18] http://old.iupac.org/dhtml_home.html
- [19] DYBKO A., WRÓBLEWSKI W., CHUDY M., WOJCIECHOWSKI K., BRZÓZKA Z., *Element czujnikowy*, opis patentowy PL 199238, 2008.
- [20] ANDREESCU S., SADIK O.A., *Trends and challenges in biochemical sensors for clinical and environmental monitoring*, Pure Appl. Chem., 2004, Vol. 76, No. 4, 861–878.
- [21] IUPAC Compendium on Analytical Nomenclature, Chapter 8 Electrochemical
http://old.iupac.org/publications/analytical_compendium/
- [22] CLARK L.C., LYONS C., *Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery*, Ann. N.Y. Acad. Sci., 1962, Vol. 102, 29–35.
- [23] GUILBAULT G.G., MONTALVO J., *A urea-specific enzyme electrode*, Journal of the American Chemical Society, 1969, Vol. 91, 2164–2165.
- [24] GUILBAULT G.G., MONTALVO J., *An enzyme electrode for the substrate urea*, Journal of the American Chemical Society, 1970, Vol. 92, 2533–2538.
- [25] http://www.iupac.org/publications/analytical_compendium/Cha07sec3.pdf
- [26] QUINTEN M., *Optical properties of nanoparticle systems: Mie and beyond*, Wiley-VCH Verlag & Co. KGaA, Weinheim 2011.
- [27] SCHULZ-EKLOFF G., WÖHRLE D., VAN DUFFEL B., SCHOONHEYDT R.A., *Chromophores in porous silicas and minerals: preparation and optical properties*, Microporous and Mesoporous Materials, 2002, Vol. 51, 91–138.
- [28] ROMANIUK R., *Światłowody kapilarne*. Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2010.
- [29] HULANICKI A., *Współczesna chemia analityczna. Wybrane zagadnienia*. Rozdział 15. Czujniki chemiczne, PWN, Warszawa 2001.
- [30] WRÓBLEWSKI W., BRZÓZKA Z., *Sensory chemiczne*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 1999.
- [31] VETELINO J., *Introduction to sensors*, CRC Press, Boca Raton 2011.
- [32] OPITZ N., LÜBBERS D.W., *New fluorescence photometrical techniques for simultaneous and continuous measurements of ionic strength and hydrogen ion activities*, Sensors and Actuators, 1983, Vol. 4, 473–479.
- [33] http://nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/2009/index.html
- [34] <http://www.oceanoptics.com>

- [35] BALDINI F., *In vivo monitoring of the gastroesophageal system using optical fibre sensors*, Anal. Bioanal. Chem., 2003, Vol. 375, 732–743.
- [36] GRANT S.A., BETTENCOURT K., KRULEVITCH P., HAMILTON J., GLASS R., *In vitro and in vivo measurements of fiber optic and electrochemical sensors to monitor brain tissue pH*, Sensors and Actuators B: Chemical, 2001, Vol. 72, No. 2, 174–179.
- [37] *Polymer physics: from suspensions to nanocomposites and beyond*. Eds. Utracki L.A., Jamieson A.M., John Wiley & Sons, Hoboken 2010.
- [38] POLSKA K., FIEDUREK J., RADZKI S., *Bioenkapsulacja związków aktywnych biologicznie w matrycach otrzymanych metodą zol-żel*, Biotechnologia 2007, Vol. 1, No. 76, 77–95.
- [39] MIERNIK E., PAŚŚ L., LUBIŃSKI O., MALINOWSKA M., MARCINIAK-RUSEK A., WINTEROT B., *Sposób wytwarzania preparatu zawierającego immobilizowany enzym amidazę penicylinową*, opis patentowy PL 143017, 1998.
- [40] GROSBERG A., KHOKHLOV A., *Giant molecules: here, there, and everywhere*. World Scientific, Singapore 2011.
- [41] DZIEWOŃSKA M., *Związki wielkocząsteczkowe – polimery*, Wyd. Akademia Ekonomiczna w Krakowie, Kraków 1995.
- [42] HALARY J-L., *Polymer materials: macroscopic properties and molecular interpretations*, John Wiley & Sons, Hoboken 2011.
- [43] GEHRICH J.L., LÜBBERS, D.W., OPITZ N., HANSMANN, D.R., MILLER W.W., TUSA J.K., MASAO Y., *Optical fluorescence and its application to an intravascular blood gas monitoring system*, IEEE Trans. Biomed. Eng., 1986, Vol. 33, No. 2, 117–132.
- [44] MILLER W.W., MASAO Y., YAN C.F., HUL H.K., ARICK S., *Performance of an in-vivo, continuous blood-gas monitor with disposable probe*, Clin. Chem., 1987, Vol. 33, No. 9, 1538–1542.
- [45] KAUTSKY H., *Quenching of luminescence by oxygen*, Trans. Faraday Soc. 1939, Vol. 35, 216–219.
- [46] HESSE, H.-C. 1974. *Measuring Probe*. NRD Patent 106, 086.
- [47] SCHULTZ JS, SIMS G., *Affinity sensors for individual metabolites*, Biotechnol Bioeng Symp. 1979, Vol. 9, 65–71.
- [48] CAMARA C., MORENO M., ORELLANA G., *Chemical Sensing with Fiberoptic Devices*, [w:] *Biosensors with Fiberoptics*, pod red. D.L. Wise, L.B. Wingard, Humana Press, New Jersey 1991, 29–84.
- [49] WOLFBEIS O.S., Weidgans B.M., *Fiber optic chemical sensors and biosensors*, [w:] *Optical Chemical Sensors*, pod red. F. Baldini, A.N. Chester, J. Homola, S. Martellucci, Springer, Dordrecht 2004, 17–27.
- [50] JANATA J., *Principles of Chemical Sensors*, Springer, Dordrecht 2009.
- [51] ZOUROB M., LAKHTAKIA A. (red.), *Optical guided-wave chemical and biosensors*, Springer, Dordrecht 2010.
- [52] HAUS J., *Optical sensors: basics and applications*, Wiley, Weinheim 2010.
- [53] BALDINI F., *Invasive sensors in medicine*, [w:] *Optical Chemical Sensors*, red. F. Baldini, A.N. Chester, J. Homola, S. Martellucci, Springer, Dordrecht 2004, 417–437.

ROZDZIAŁ 12
SPEKTROSKOPIA LASEROWO INDUKOWANEGO
ROZPADU (LIBS).
PODSTAWY I ZASTOSOWANIA

Wojciech Jopek, Marek Kaczyński,
Paulina Misiewicz, Magdalena Przybyło

Spis treści

12.1. LIBS – Laser Induced Breakdown Spectroscopy	317
12.2. Atomowe podstawy techniki LIBS	318
12.3. Zasada pomiaru techniką LIBS	320
12.4. Techniczne aspekty konstrukcji spektrometrów LIBS	324
12.4.1. Ogólna budowa spektrometrów	324
12.4.2. Charakterystyka emisyjna plazmy oraz źródeł światła	325
12.4.3. Spektrometry	327
12.4.4. Detektory	328
12.5. Przykładowe zastosowania	329
12.6. Podsumowanie	331

12.1. LIBS – Laser Induced Breakdown Spectroscopy

LIBS jest techniką analityczną laserowo indukowanej spektroskopii atomowej, znajdującą coraz to nowsze zastosowania [1, 2, 3, 4]. Technika ta umożliwia detekcję prawie wszystkich pierwiastków w ciałach stałych. Dodatkowo analizę próbek wieloskładnikowych można przeprowadzać w bardzo złożonych matrycach organicznych, takich jak np. tkanki. Urządzenie pozwala na pomiary w bardzo szerokim zakresie stężeń, już od pojedynczych ppm do miligramów substancji [5]. Metoda jest szczególnie przydatna w analizie zanieczyszczeń tworzyw sztucznych, farmaceutyków, substancji organicznych czy materiałów biologicznych. Ze względu na możliwości analizy próbek w kilku punktach pomiarowych można określić przestrzenny rozkład

pierwiastków w wybranej matrycy, zarówno z punktu widzenia ich rozkładu powierzchniowego, jak i trójwymiarowego. Z uwagi na brak konieczności używania dodatkowych odczynników chemicznych do wykonania analizy metoda ta jest szczególnie przyjazna dla środowiska. Ponadto nie wymaga dodatkowych, wymiennych elementów eksploatacyjnych, co wyraźnie minimalizuje koszty eksploatacji urządzenia. Funkcjonalność ekonomiczna jest szczególnie istotna w farmaceutycznej analizie chemicznej, ponieważ ceny odczynników chemicznych są wysokie i rosną w szybkim tempie (np. acetonitryl jakości HPLC¹).

12.2. Atomowe podstawy techniki LIBS

Technika spektroskopii laserowo indukowanego rozpadu (LIBS) jest rodzajem atomowej spektroskopii emisyjnej, która jako źródło wzbudzenia próbki wykorzystuje lasery dużej mocy. Dostarczona energia jest na tyle wysoka, że prowadzi do ablacji, czyli odparowania niewielkiej części próbki (rzędu nano- lub nawet pikogramów) i powstania plazmy. Po ustaniu oddziaływania światła lasera zaczyna się stygnięcie rozgrzanej próbki i w efekcie m.in. emisja promieniowania elektromagnetycznego, którego widmo może posłużyć do analizy składników atomowych badanej próbki.

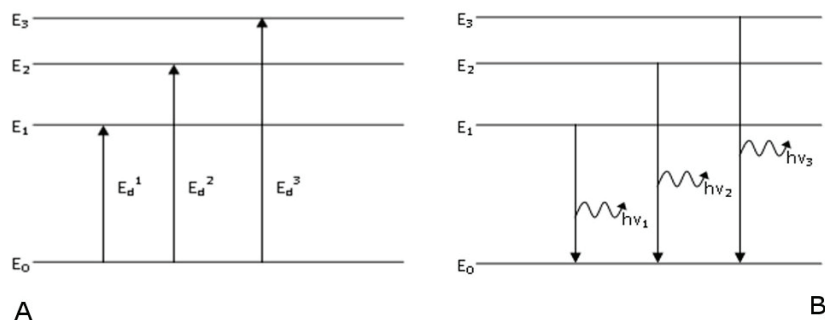
Po skupieniu wiązki lasera o wystarczającej mocy na próbce, niemal momentalnie dochodzi do wzrostu temperatury, która niezależnie od rodzaju materiału, przekracza temperaturę wrzenia substancji. Prędkość, z jaką energia dociera do powierzchni znacznie przekracza prędkość, z jaką może ona tę energię rozproszyć przez odparowanie, co skutkuje gwałtowną eksplozją części próbki. Proces ten nazywamy ablacją. Rozproszona część próbki rozszerza się z prędkością dźwięku, tworząc falę uderzeniową, absorbując jednocześnie promieniowanie laserowe. Energia cieplna dostarczona do układu powoduje jego wzbudzenie, czyli przejście do stanów o wyższej energii. Wzrost temperatury powoduje także wzrost energii kinetycznej cząsteczek i jeśli dostarczona energia jest wystarczająco wysoka, może spowodować jonizację próbki, czyli odseparowanie elektronu lub elektronów od atomu na skutek zderzeń cząsteczek. W przypadku techniki LIBS dostarczone promieniowanie ma gęstość mocy rzędu 10^9 W/cm², co umożliwi utworzenie plazmy. Ma ona temperaturę sięgającą nawet 100 000 K i jest mieszaniną naładowanych i neutralnych cząstek elementarnych oraz jąder atomowych. Plazma tworzy się bezpośrednio nad powierzchnią próbki (niezależnie od kąta, pod jakim pada promień lasera). Istnieje zasadnicza różnica w zachowaniu się próbki w przypadku stosowania długich (milisekundowych) i krótkich (nano-, femtosekundowych) impulsów laserowych. Długie impulsy powodują dodatkowe ogrzanie i zwiększenie objętości utworzonej już plazmy i duże ubytki analizowanego

¹ HPLC High Pressure Liquid Chromatography – Wysokociśnieniowa Chromatografia Cieczowa.

materiału. Impulsy krótkie w mniejszym stopniu niszczą próbkę, jednak mniejsze są też objętości analizowanej substancji.

Po ustaniu impulsu plazma schładza się, emitując przy tym promieniowanie elektromagnetyczne, a rejestrowane widmo ma postać ciągłą. Wraz z upływem czasu i postępującym ochładzaniem próbki rozpoczyna się proces rekombinacji jonów, zmniejsza się gęstość elektronowa i w widmie zaczynają pojawiać się linie emisyjne charakterystyczne dla poszczególnych pierwiastków – początkowo od form zjonizowanych, a ostatecznie od wzbudzonych atomów.

Rozróżnianie substancji chemicznych na podstawie ich widma emisyjnego jest możliwe z kilku powodów. Po pierwsze energia potrzebna do wzbudzenia atomu lub cząsteczki oraz energia emitowana podczas przechodzenia ze stanu wzbudzonego do podstawowego podlega zasadzie kwantyzacji. Różnice energii pomiędzy poszczególnymi stanami (wzbudzonymi i podstawowym) są ściśle określone i wynikają z atomowej budowy materii (patrz rys. 12.1 (A)).



Rys. 12.1. Schemat poziomów energetycznych cząsteczki; E_n ($n = 0, 1 \dots n$) n -ty poziom energetyczny (A). Schemat emisji z poszczególnych stanów wzbudzonych (B)

Aby doszło do wzbudzenia, muszą być spełnione dwa warunki. Podstawowy jest tzw. warunek rezonansu – energia E_d dostarczona do cząsteczki w formie kwantu musi doprowadzić do wzbudzenia na dany poziom energetyczny, czyli:

$$E_d^1 = E_1 - E_0. \quad (1)$$

Energia potrzebna do przejścia ze stanu podstawowego E_0 do stanu wzbudzonego E_n musi być dokładnie taka, jaka jest różnica energii pomiędzy tymi poziomami.

Drugim warunkiem niezbędnym do wzbudzenia próbki jest tzw. niezerowy moment przejścia. Wiąże się to z faktem, iż niektóre przejścia ze stanów podstawowych do wzbudzonych są zabronione i nie mogą mieć miejsca, nawet, jeśli dostarczona zostanie odpowiednia energia. Wynika to z budowy atomu i jest charakterystyczną cechą każdego chemicznego indywiduum (atomów lub cząsteczek).

Emisyjne widmo spektroskopowe, czyli zależność natężenia emitowanego przez próbkę promieniowania od długości fali, również powstaje dzięki kwantyzacji energii.

Emisja promieniowania jest skutkiem emisji przez próbkę fotonów o określonej częstotliwości. Związek energii fotonu E_f z jego częstotliwością opisuje równanie:

$$E_f = h\nu. \quad (2)$$

gdzie h – stała Plancka, ν – częstotliwość.

Ponieważ różnice energii pomiędzy poszczególnymi poziomami są ściśle określone, określona jest także energia emitowanego fotonu. Z tego wynika, że częstotliwość emitowanego fotonu jest funkcją różnicy energii pomiędzy poziomem wzbudzonym a podstawowym:

$$\nu_i = \frac{E_i - E_0}{h}. \quad (3)$$

Rysunek 12.1 (B) schematycznie ilustruje emisję fotonów o częstotliwości ν_i towarzyszącą przejściu wzbudzonych elektronów z wyższych poziomów energetycznych E_i do stanu podstawowego E_0 (tzw. relaksacja). Dzięki temu, że atomy mogą zostać wzbudzone tylko w określony, unikalny sposób, emitowane przez nie widmo również jest charakterystyczne i pozwala na identyfikację poszczególnych atomów/związków chemicznych. Obserwowane widmo ciągłe, które rejestrowane jest w trakcie trwania wczesnej plazmy składa się z linii charakterystycznych dla poszczególnych pierwiastków i jest ono zniekształcone z powodu występowania efektu Starka. Efekt ten polega na rozszczepieniu i poszerzeniu linii spektralnych na skutek oddziaływania atomów z polem elektrycznym. Ponieważ we wczesnej plazmie gęstość elektronowa jest bardzo duża (powyżej 10^{19} elektronów/cm³) efekt ten jest bardzo silny, a zanika wraz ze schładzaniem się plazmy.

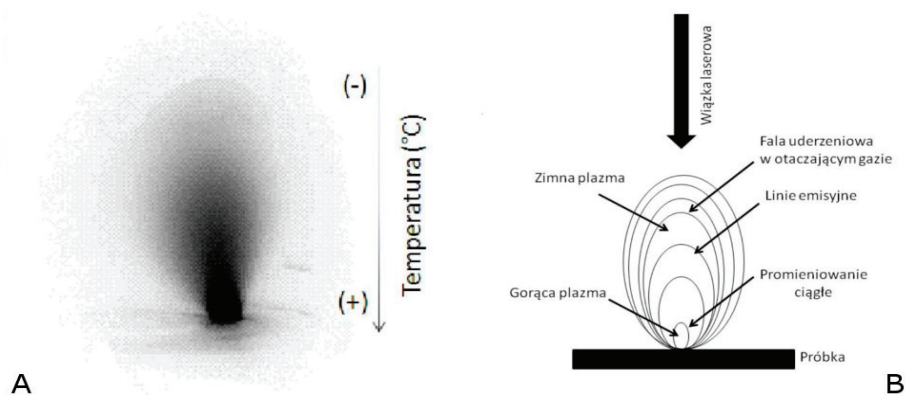
Występowanie poszczególnych linii emisyjnych na rejestrowanym podczas eksperymentu widmie świadczy o obecności wybranych związków w próbce. Natężenie emisji promieniowania informuje natomiast o ilości danej substancji w analizowanym materiale.

12.3. Zasada pomiaru techniką LIBS

Zogniskowana na niewielkiej powierzchni badanego materiału wiązka laserowa o dużym natężeniu, padając na próbkę (stałą, ciekłą lub gazową) powoduje szybki, lokalny wzrost temperatury i parowanie. Na skutek tego dochodzi do wytworzenia się plazmy. Powstała plazma jest źródłem promieniowania, którego widma zawierają linie spektralne odpowiadające pierwiastkom wchodzącym w skład próbki (patrz rys. 12.2). Oddziaływanie pomiędzy wiązką lasera a próbką jest procesem skomplikowanym i zależy od charakterystycznych cech zarówno promieniowania lasera, jak i właściwości badanego materiału. Powstawanie plazmy zależy m.in. od

częstotliwości impulsów laserowych, jak również od przestrzennych i czasowych fluktuacji promieniowania. Właściwości chemiczne, fizyczne i mechaniczne próbki również mają wpływ na proces ablacji i powstawania plazmy. Rozwój plazmy zależy od mocy lasera, długości fali, rozmiaru zogniskowanej wiązki, składu odparowanej próbki, obecności innych gazów w otoczeniu, jak również ciśnienia. Laser Nd:YAG często używany w badaniach techniką LIBS emituje promieniowanie o długości fali 1064 nm i energii ok. 200 mJ w pojedynczym impulsie (ze względów bezpieczeństwa należy do grupy laserów czwartej klasy) [6].

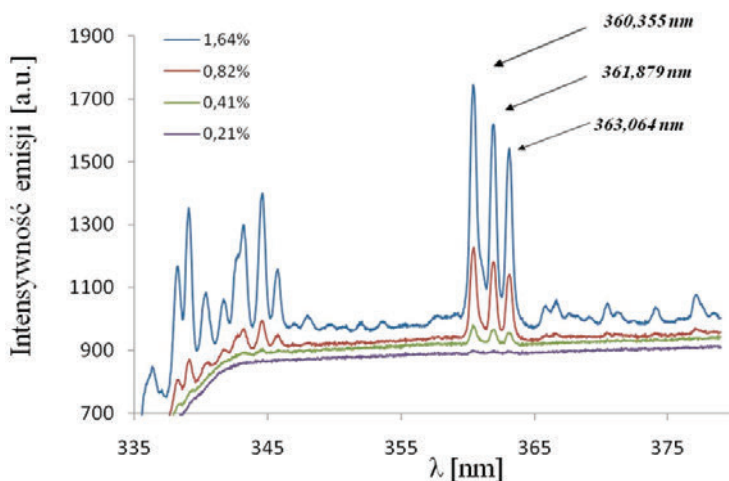
Technika laserowo indukowanej spektroskopii atomowej jest bardzo wszechstronną techniką analizy elementarnej. W wyniku działania lasera i wzbudzenia fragmentu próbki powstaje kilka rodzajów promieniowania. Pierwszym rodzajem jest promieniowanie ciągłe, pojawiające się w wyniku powielania się wolnych elektronów i powstawania jonów; proces ten trwa przez cały okres trwania impulsu lasera (zwykle ok. 10 ns). Promieniowanie ciągłe składa się z promieniowania hamowania oraz promieniowania wynikającego z oddziaływań elektron–jon, jednakże nie jest ono wykorzystywane jako miara w badaniach prowadzonych tą techniką. W tle promieniowania ciągłego występują również wąskie linie pochodzenia jonowego. Widmo rejestrowane po upływie mikrosekund od impulsu lasera zawiera głównie widmo dyskretne, powstające z ochładzającej się plazmy pochodzenia atomowego i molekularnego [7]. Spektralny skład widma emisji plazmy jest liniowy i odzwierciedla skład badanej próbki. Identyfikacja charakterystycznych linii emisyjnych plazmy może dać informację o składzie atomowym badanego obiektu.



Rys. 12.2. Schematyczny rysunek plazmy powstałej na skutek działania impulsu laserowego na powierzchnię próbki. Obraz (A) przedstawia fotografię powstającej plazmy z zaznaczonym gradientem temperatury. Pióropusz plazmy jest podzielony na kilka stref, począwszy od tej o najwyższej temperaturze, a kończąc na najrzadszej strefie o najniższej temperaturze (B)

Technika LIBS ma niewątpliwie tę zaletę, że pozwala na jednoczesną identyfikację wszystkich pierwiastków, wchodzących w skład badanej próbki podczas jednego po-

miaru, przy czym nie jest konieczne wstępne przygotowanie próbki. Metoda pozwala na oznaczanie pierwiastków w bardzo małych stężeniach, rzędu ppm. Badany materiał jest poddawany promieniowaniu lasera i tylko niewielki jego fragment podlega analizie. Jest to metoda stosunkowo małoinwazyjna, ponieważ odparowywana próbka materiału jest rzędu nanogramów lub pikogramów, natomiast wielkość mikrokrateru, jaki powstanie po ablacji zależy od stanu skupienia materii, z którego powstaje plazma oraz dostarczonej energii. W przypadku, gdy ablacja zachodzi w materiale o większej gęstości, powstający krater jest mniejszy niż ten powstający w przypadku ablacji w np. żeluz. Jest to spowodowane tym, że powstająca po ekspozycji fala akustyczna odrywa fragment otaczającej materii. Próbki, które są bardziej zbite ulegają mniejszemu uszkodzeniu niż materiały o mniejszej gęstości.



Rys. 12.3. Przykład widm uzyskanych dla trzech próbek różniących się stężeniem atomów chromu (od 0,21% do 1,64%)

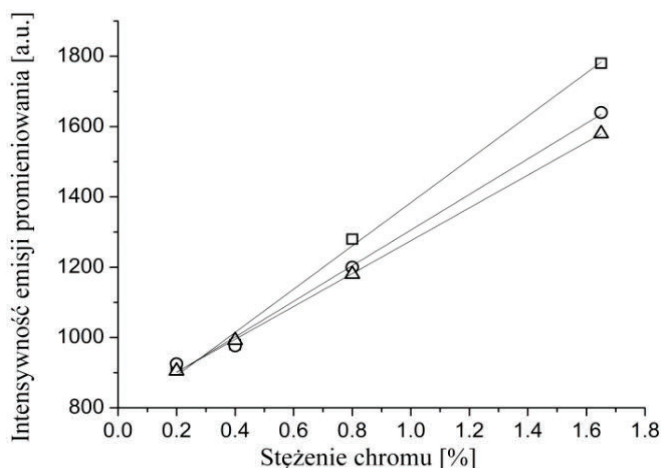
Pierwiastki chemiczne, w zależności od stopnia utlenienia, emitują promieniowanie elektromagnetyczne o charakterystycznej dla siebie długości fali. Podczas wykonywania pomiaru widmo promieniowania jest zbierane każdorazowo po każdej ekspozycji na działanie wiązki laserowej. Szerokość okna spektralnego możliwego do jednoczesnej analizy wynosi ok. 40 nm dlatego nierzadko konieczne jest przebadanie substancji w kilku zakresach spektralnych. Na podstawie danych o liniach spektralnych charakterystycznych dla pierwiastków chemicznych można określić jakościowy i ilościowy skład próbki, tak jak to przedstawiono na przykładzie analizy zawartości chromu w próbce (patrz rys. 12.3). Analizując jakościowo materiał na podstawie uzyskanego widma emisyjnego, oraz znając długości fal, dla których występują maksima charakteryzujące dany pierwiastek, można ocenić skład próbki. Analiza ilościowa

wymaga sporządzenia krzywej kalibracyjnej (patrz rys. 12.4) dla danego atomu. Do analizy jakościowej wykorzystuje się bazę danych NIST (National Institute of Standards and Technology) [8, 9], zawierającą informacje dotyczące jonizacji pierwiastków chemicznych na wszystkich możliwych stopniach utlenienia oraz typy przejść energetycznych, które są odpowiedzialne za emisję. Są tam też podane wartości relatywnego natężenia pików w widmie i prawdopodobieństwo wystąpienia tego pików przy danej długości fali.

Tabela 1. Przykład wybranych długości fali, przy których występuje charakterystyczna emisja. Dane dla chromu na +1 stopniu utlenienia pochodzą z bazy danych NIST [8]

Jon	Obserwowana długość fali [nm]	Relatywne natężenie	Prawdopodobieństwo pojawienia się pików
Cr I	357,869	19000	B
Cr I	359,349	17000	B
Cr I	360,533	13000	B

Przeszukując bazę NIST, należy zwrócić uwagę, przy jakiej długości fali relatywne natężenie pików jest najwyższe oraz jakie jest prawdopodobieństwo, że pik ten się pojawi przy danej długości fali. Takie prawdopodobieństwo jest oznaczane dużymi literami alfabetu. Oznaczenie AA, od którego zaczyna się skala, oznacza 1% błędu, a oznaczenie E, na którym kończy się skala, oznacza 50% prawdopodobieństwo przesunięcia pików. Przedstawione w tab. 1 oznaczenie B oznacza 10% prawdopodobieństwo błędów [8, 9].

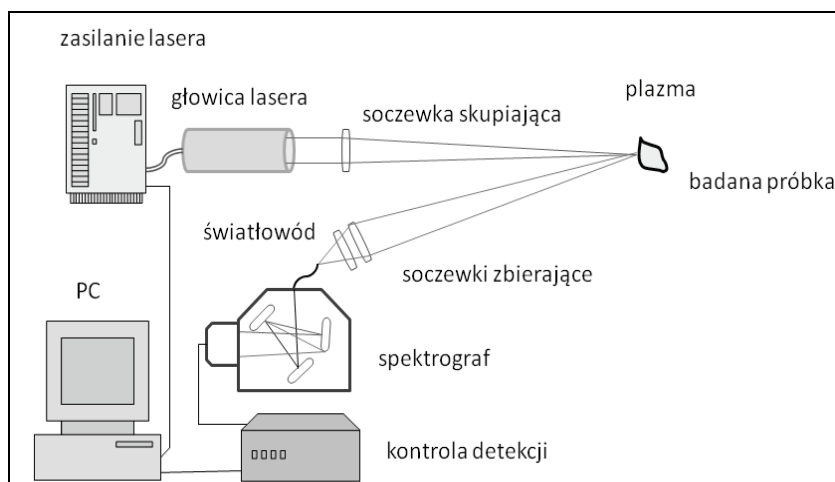


Rys. 12.4. Krzywa kalibracyjna do oznaczeń ilościowych pierwiastków na przykładzie chromu (dotyczy wyników przedstawionych na rys. 12.3). Zależność pomiędzy natężeniem emisji promieniowania a stężeniem substancji dla trzech wybranych długości fali:
 □ – 360,355 nm, ○ – 361,879 nm, △ – 263,064 nm

12.4. Techniczne aspekty konstrukcji spektrometrów LIBS

12.4.1. Ogólna budowa spektrometrów

Typowa konstrukcja spektrometru laserowo indukowanego rozpadu została schematycznie przedstawiona na rys. 12.5. Najczęściej stosowanym źródłem światła jest laser Nd:YAG. Układ detekcji stanowi natomiast spektrometr o szerokim zakresie spektralnym i wysokiej czułości, sprzężony z bramkowanym czasowo detektorem o szybkim czasie odpowiedzi. Całość jest podłączona do komputera, który posiada możliwość szybkiej interpretacji oraz analizy zebranych danych. W sensie konstrukcyjnym jest to jedna z najprostszych eksperymentalnie, analitycznych technik spektroskopowych.



Rys. 12.5. Schemat budowy spektrometru stosowanego w technice laserowo indukowanego rozpadu (opracowano w oparciu [10])

Laser Nd:YAG generuje energię w obszarze bliskiej podczerwieni – długość fali 1064 nm. Czas trwania impulsu wynosi około 10 ns. Wiązka w ognisku osiąga gęstość mocy ok. 1 GW/cm^2 . Inne lasery wykorzystywane w technice LIBS to głównie lasery ekscymerowe (*excited dimer*), generujące wiązki w obszarze światła widzialnego oraz ultrafioletu.

Spektrometr zbudowany jest bądź to z monochromatora (skaningowego), bądź z polichromatora (nieskaningowego), a także z fotopowielacza lub kamery CCD jako detektora. Najbardziej popularnym monochromatorem jest monochromator typu Czerny'ego–Turnera; jako polichromator najczęściej stosowany jest typ Echelle. Monochromator typu Czerny'ego–Turnera może być także wykorzystany do rozszczepienia wiązki padającej na kamerę CCD, działając jako polichromator. Spektrometr poli-

chromatyczny jest najczęściej stosowanym spektrometrem w technice LIBS, gdyż umożliwia równoczesną akwizycję w całości wybranego zakresu widma.

Spektrometr rejestruje promieniowanie elektromagnetyczne w możliwie jak najszerszym zakresie, maksymalizując ilość linii emisyjnych zebranych dla każdego pierwiastka. Odpowiedź spektrometru jest w zakresie od 1100 nm do 170 nm i odpowiada możliwościom detekcyjnym kamery CCD. Zakres ten jest wystarczający do analizy, gdyż wszystkie pierwiastki posiadają linie emisyjne w tym zakresie. Rozdzielczość energetyczna spektrometru może także mieć wpływ na jakość pomiarów techniką LIBS, gdyż układy o wysokiej rozdzielczości mogą oddzielić linie emisyjne w bardzo bliskim sąsiedztwie, redukując stopień nałożenia pików i zwiększając selektywność. Cecha ta jest szczególnie ważna przy pomiarach próbek o złożonym składzie.

12.4.2. Charakterystyka emisyjna plazmy oraz źródeł światła

Istnieją dwa mechanizmy generacji elektronów oraz wzrostu ich liczby przed utworzeniem plazmy. Pierwszy mechanizm polega na absorpcji promieniowania laserowego przez wolne elektrony obecne w odparowanej części próbki w momencie kolizji z atomami niezjonizowanymi. Jeśli elektrony osiągną wystarczającą energię, mogą jonizować atomy bądź molekuly obecne w odparowanej próbce. W każdym takim procesie jonizacji, wysokoenergetyczny elektron, wybija jeden elektron, w wyniku czego powstają dwa elektrony o niższej energii. Elektrony te, po zaabsorbowaniu fotonu, będą inicjować kolejne procesy jonizacji. Stężenie elektronów będzie wzrastało wykładniczo z czasem ze względu na kaskadowy charakter jonizacji. Drugi mechanizm to jonizacja wielofotonowa, polegająca na równoczesnej absorpcji energii przez atom bądź molekulę wystarczającej do jej jonizacji. Ten mechanizm ma znaczenie tylko w przypadku laserów o długościach fali mniejszych niż 1 μm , gwarantujących minimalną energię wzbudzenia niezbędną do zajścia zjawiska. Mechanizm kaskadowy oraz jonizacja wielofotonowa wymagają laserów wysokiej mocy, z reguły gęstości mocy $\geq 10^8 \text{ W/cm}^2$. Ostatecznie plazma tworzona jest w momencie, gdy natężenie promieniowania lasera osiągnie tę wartość odcinającą ($\geq 10^8 \text{ W/cm}^2$), co uzyskuje się z reguły poprzez ogniskowanie wiązki. Ze względu na ograniczenie dyfrakcyjne, średnica w_2 wiązki laserowej w ognisku jest określana za pomocą wzoru:

$$w_2 \approx 2,44\lambda \frac{f}{w_1}, \quad (4)$$

gdzie w_1 jest średnicą wiązki lasera przed ogniskiem, f ogniskową soczewki skupiającej, a λ długością fali.

Rozwój techniki LIBS związany jest z dostępnymi komercyjnie i technologicznie laserami. W 1962 roku po raz pierwszy został wykorzystany przez Brech'a i Cross'a laser rubinowy emitujący światło o długości fali 694 nm [11], jednak stabilność pracy

impulsowej w tym rozwiązaniu była niewystarczająca i LIBS nie został uznany jako wiarygodna technologia w analizie spektralnej. Rozwój nastąpił wraz z pojawieniem się laserów impulsowych w latach 80-tych i powstaniem lasera Nd:YAG, emitującego promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni, światła widzialnego, a także UV. Pompowanie lasera zależy od profilu absorpcyjnego kryształu, który go tworzy. Początkowo do pompowania laserów Nd:YAG były wykorzystywane lampy halogenowe ze względu na szerokie pasmo emisyjne. O wiele wydajniejsze są jednak lampy wyładowcze, zbudowane na gazach pierwiastków ziem rzadkich. Najczęściej używa się lamp kryptonowych i ksenonowych. Obie posiadają linie emisyjne w bliskiej podczerwieni, przy czym zakres kryptonowy lepiej pokrywa się z widmem absorpcyjnym Nd:YAG. Stosowane są głównie w laserach o pracy ciągłej. W tabeli 2 zaprezentowano zestawienie laserów stosowanych w różnych konstrukcjach LIBS.

Tabela 2. Charakterystyka właściwości wybranych laserów stosowanych w technice LIBS [7, 12]

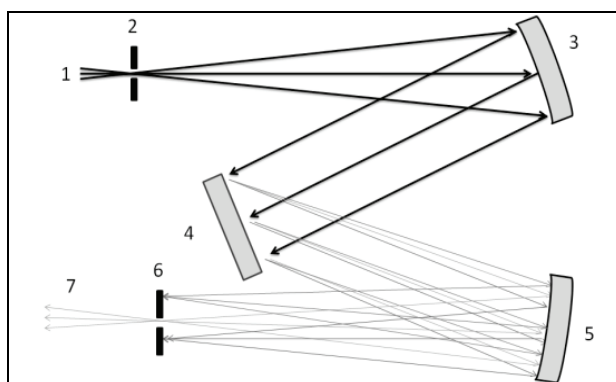
Typ lasera	Długość fali	Czas trwania impulsu	Energia impulsu
CO2 Repetitive	10,6 μm	10–100 μs	0,1–5 J
CO2 Q-switched	10,6 μm	200 ns	0,1 J
Er:YAG Q-switched	2,94 μm	170 ns	25 mJ
Nd:YAG	1,06 μm	5–10 ns	1–3 J
Ruby Normal Pulse	694,3 nm	0,2–10 ms	1–500 J
Ruby Q-switched	694,3 nm	5–30 ns	1–50 J
RubyPicosecond Pulse	694,3 nm	10 ps	0,01–0,5 J
Nd:YAGSecond Harmonic	532,0 nm	4–8 ns	0,5–2 J
Nd:YAG Third Harmonic	354,7 nm	4–8 ns	0,2–0,7 J
N2 Laser	337,1 nm	3–6 ns	0,1–0,6 mJ
XeCl Excimer	308 nm	20–30 ns	0,5–1 J
Nd:YAGFourth Harmonic	266 nm	3–5 ns	0,1–0,3 J
KrF Excimer	248 nm	25–35 ns	0,5–1 J
ArF Excimer	193 nm	8–15 ns	8–15 mJ

Podsumowując, typowe zakresy energii laserów stosowanych w technice LIBS wynoszą od dziesięciu do kilkuset mJ w impulsie, przy całkowitej mocy rzędu MW. Wiązki laserowe o takiej charakterystyce są następnie skupiane przez układ optyczny do plamki o średnicy kilkudziesięciu mikrometrów, dostarczając promieniowanie o gęstości mocy 10^{10} – 10^{12} W/cm². Właściwości promieniowania laserowego: energia, stabilność energii, długość fali, czas trwania impulsu, jakość ogniskowania wiązki, jakość modów w połączeniu z właściwościami materiałowymi badanej próbki determinują charakter powstającej plazmy. Z reguły wiązka lasera o energii 100 mJ/impuls jest wystarczająca, aby wygenerować plazmę do analizy większości materiałów. Dłu-

gość fali i energia promieniowania lasera są głównymi czynnikami wpływającymi na otrzymywane wyniki. Lasery pracujące w zakresie UV mają przewagę wynikającą z niskiego odbicia na powierzchni metalu, co skutkuje znacznie wydajniejszym procesem sprzężenia energii oraz wysoką rozdzielczością optyczną.

12.4.3. Spektrometry

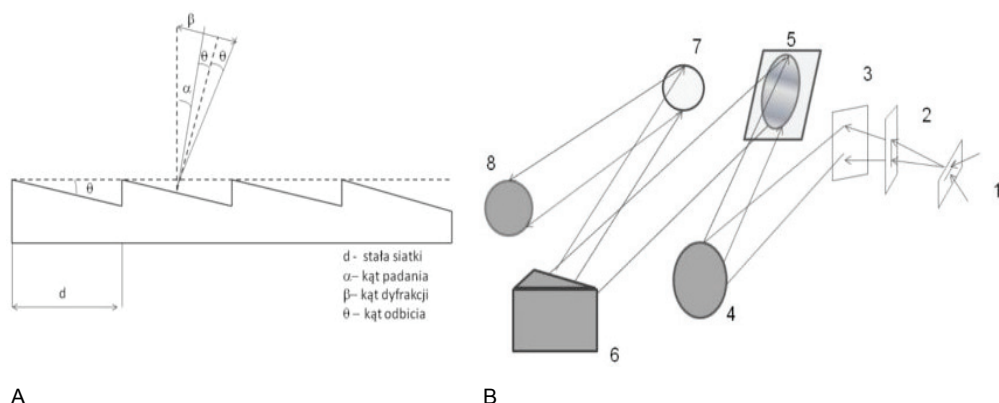
Układy detekcji zawierają ogniskujące elementy optyczne (z reguły układy soczewek bądź układy światłowodowe), elementy rozszczepiające światło, detektory, układy elektroniczne do obróbki sygnału oraz komputer do przechowywania i analizy danych. W konstrukcjach LIBS powszechnie stosowanym spektrometrem jest spektrometr oparty na monochromatorze Czerny'ego–Turnera. Urządzenie to ma za zadanie rozszczepić wiązkę promieniowania na poszczególne długości fali. Konstrukcja, przedstawiona na rys. 12.6, posiada siatkę dyfrakcyjną, która jest elementem rozszczepiającym światło. Padająca wiązka światła polichromatycznego (emisyjne promieniowanie elektromagnetyczne) (1) skupiana jest na szczeliny wejściowej monochromatora (2). Szczelina ta jest umiejscowiona dokładnie w ognisku zwierciadła (3), spełniającego funkcję kolimatora. Wskutek tego światło padające na zwierciadło odbijane jest jako wiązka równoległa. Wiązka ta ulega następnie dyfrakcji na siatce dyfrakcyjnej (4), a poszczególne długości fali są ogniskowane poprzez zwierciadło (5) w płaszczyźnie szczeliny wyjściowej (6). Światło wychodzące ze szczeliny wyjściowej (7) niesie informację o obrazie szczeliny wejściowej dla wybranej barwy. Możliwość obrotu elementu dyfrakcyjnego pozwala na zmianę położenia dowolnej wiązki o wybranej długości fali względem położenia szczeliny wyjściowej.



Rys. 12.6. Schemat budowy monochromatora Czerny'ego–Turnera;

- 1 – wiązka padająca – polichromatyczna, 2 – szczelina wejściowa, 3 – zwierciadło kolimacyjne,
4 – siatka dyfrakcyjna, 5 – zwierciadło ogniskujące, 6 – szczelina wyjściowa, 7 – wiązka wychodząca
– monochromatyczna (opracowano w oparciu o [13])

Ze względu na bardzo wąski zakres widmowy przy wysokiej rozdzielczości spektrografu Czerny’ego–Turnera (20–50 nm), korzysta się z rozwiązania stosowanego w spektrografach Echelle (patrz rys. 12.7). Rozwiązanie to umożliwia wysoką rozdzielczość ($\lambda/\Delta\lambda \geq 10\,000$) w połączeniu z szerokim zakresem spektralnym (kilkaset nm). Spektrometr ten posiada ogniskową ok. 25 cm przy aperturze numerycznej 1:10 oraz kwarcowy pryzmat umieszczony przed siatką dyfrakcyjną. Układ pozwala uzyskać maksymalną rozdzielczość w zakresie długości fali 200–780 nm. Dyspersja liniowa na piksel jest w zakresie od 0,005 nm (przy 200 nm) do 0,019 nm (przy 780 nm), przy rozdzielczości widmowej $\lambda/\Delta\lambda = 40\,000$.



Rys. 12.7. Schemat zasady działania siatki dyfrakcyjnej Echelle (A). Schemat budowy spektrometru Echelle wykorzystującego siatkę dyfrakcyjną Echelle (B): 1 – padające promieniowanie, 2 – szczeliny wejściowe, 3 – zwierciadło kierujące, 4 – zwierciadło kolimujące, 5 – siatka Echelle, 6 – separator rzędów (tu pryzmat), 7 – zwierciadło kamery CCD, 8 – kamera CCD (opracowano na podstawie [14])

12.4.4. Detektory

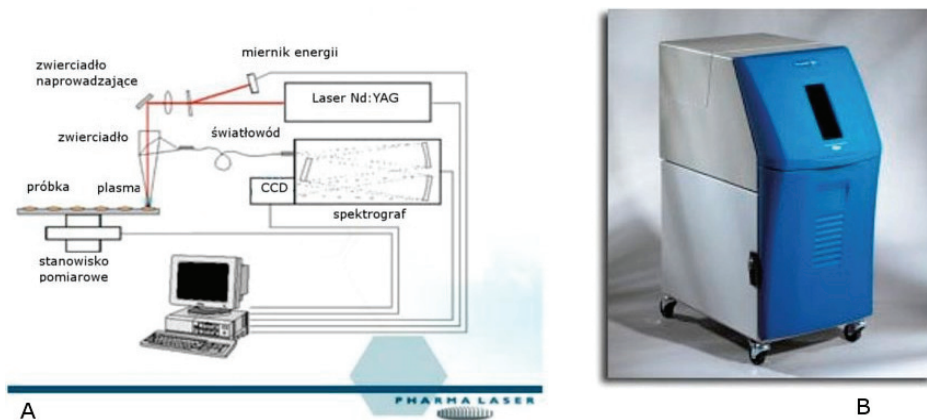
Do zbierania sygnału wykorzystuje się w technice LIBS różne detektory. W początkowych etapach rozwoju obrazy widm rejestrowano na płytach fotograficznych, co posiadało pewną zaletę, wynikającą z możliwości rejestracji szerokiego zakresu długości fali przy względnie niskiej cenie. Jednak sposób ten był wyjątkowo czasochłonny i powodował niską powtarzalność wyników. Detekcja fotograficzna została zastąpiona przez detektory spektralnie rozdzielonej emisji, takie jak fotopowielacze (PMT – ang. *photomultiplier*), macierze fotodiodowe (PDA – ang. *photodiode arrays*) czy kamery CCD, gwarantujące szybkie i powtarzalne pomiary. Fotopowielacz, umieszczony przed szczeliną wyjściową jednostki rozszczepiającej światło, produkuje fotoprąd, który jest wprost proporcjonalny do natężenia padającego promieniowania. Mankamentem tego rozwiązania jest to, iż w celu jednoczesnej detekcji wielu pier-

wiastków trzeba użyć wielu fotopowielaczy. Do jednoczesnej analizy wielu pierwiastków można wykorzystać optyczne analizatory wielokanałowe, jednak znacznie komplikuje to konstrukcję urządzenia i ogranicza ilość analizowanych pierwiastków. Detektory oparte o macierze fotodiodowe są dobrym rozwiązaniem w analizie wieloelementarnej. W początkowych badaniach nad techniką LIBS, Radziemski i Cremer użyli różnych typów fotopowielaczy, uzyskując zakres 200–900 nm. Wykorzystali oni także czasowo-bramkowaną liniową macierz diodową sprzężoną z analizatorem wielokanałowym. Macierz była zbudowana z 1024 diod na długości 2,54 cm, gdzie każdy kanał rejestrował sygnał odbierany przez jedną diodę w każdym impulsie. Macierz była czasowo bramkowana poprzez włączanie wysokiego napięcia na wzmacniaczu w przedziale czasu, który był zadawany, z reguły w przedziale od ok. 200 ns do kilku mikrosekund. To bramkowanie jest szczególnie istotne ze względu na silną emisję ciągłą plazmy przez pierwsze 500 ns po jej utworzeniu. Układ był pracował w zakresie długości fali 350–800 nm.

Obecnie, bramkowane i/lub wzmacniane detektory PDA oraz analizatory wielokanałowe są najczęściej wykorzystywane w technice LIBS. Jednak w ostatnich latach, ze względu na postęp w rozwoju, coraz częściej stosowane do detekcji emisji są kamery CCD. Wynika to również z możliwości czasowego bramkowania w celu izolacji czasowych interwałów w trakcie ewolucji plazmy, celem optymalizacji pomiaru sygnału w zależności od zastosowania. Kamery CCD są trzykrotnie bardziej czułe w porównaniu do detektorów PDA, jednak ich zakres dynamiczny jest nieznacznie mniejszy niż w przypadku PDA. Zhang [15] oraz Castle [16] wykorzystali jako detektor LIBS urządzenie ICCD (ang. *Intensified Charge-Coupled Device*), w którym programowalny generator opóźnienia impulsu został wykorzystany w celu bramkowania ICCD, aby otrzymać optymalny stosunek szumu do sygnału, a uruchamianie lasera oraz zbieranie danych było kontrolowane przez komputer. W innym przypadku Castle [17] zastosował linijkę CCD jako detektor, który nie był bramkowany, jednak miał możliwość zewnętrznego włączania oraz pętłę czasu, zaprojektowaną do kontroli uruchamiania lasera oraz zbierania danych. Linijka CCD posiadała 2046 piksele, a układ miał zakres spektralny 339–462 nm.

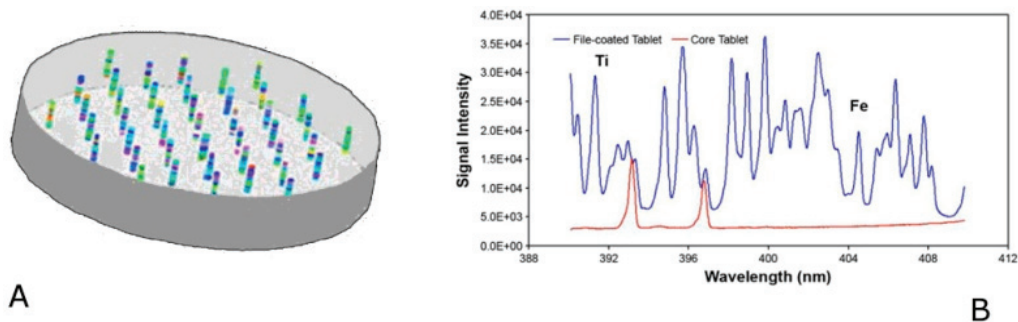
12.5. Przykładowe zastosowania

Technika LIBS stanowi uniwersalną technikę analityczną. W ostatnich latach zdobyła szczególną popularność w przemyśle farmaceutycznym – w działach kontroli jakości. Najpowszechniej stosowanym modelem tego urządzenia jest urządzenie PharmaLaserTM 200, wyprodukowane przez kanadyjską firmę Pharma Laser, którego zdjęcie i schemat konstrukcyjny przedstawiono na rys. 12.8.



Rys. 12.8. Schemat budowy spektrometru LIBS do zastosowań w przemyśle farmaceutycznym (A). Model urządzenia PharmaLIBS™200 (Pharma Laser, Kanada) (B) [6]

Urządzenie to ze względu na specyficzną konstrukcję umożliwia próbkowanie powierzchni, jak również wnętrza tabletek z punktu widzenia składu chemicznego. Dodatkowo, umożliwia też określenie rozkładu poszczególnych elementów w całej tabletkę, dzięki czemu w prosty sposób można określić poziom jednorodności składu chemicznego za pomocą wykresu 3D, tak jak to przedstawiono przykładowo na rys. 12.9(A). Oprócz informacji jakościowych możliwe jest także otrzymanie danych ilościowych, szczególnie dotyczących substancji aktywnych, jeśli zawierają one inne niż otoczenie pierwiastki bądź grupy funkcyjne, przykładowo takie, jak chlor, siarka, podwójne wiązanie C=C itp. Szczególnie użyteczna jest możliwość określenia grubości powłoki na tabletkę. Przykładowe wyniki takiego oznaczenia przedstawiono na rys. 12.9(B).



Rys. 12.9. Przykładowy wykres rozkładu stężenia substancji w tabletkę oznaczony za pomocą LIBS (A). Wykres obecności tytanu na powierzchni tabletki (linia niebieska) oraz wewnątrz tabletki (linia czerwona); tlenek tytanu jest głównym składnikiem otoczek stosowanych do powlekania tabletek (B)

12.6. Podsumowanie

Przenośne urządzenia pomiarowe nowej generacji wykorzystujące technikę LIBS są stosowane w wielu dziedzinach (w eksploracji kosmosu, górnictwie, archeologii, w przemyśle farmaceutycznym itp.). Istnieje wiele nowych zastosowań pomiarowych, dzięki którym analizy tą techniką są łatwiejsze i bardziej dokładne (double-pulse LIBS, analizy w atmosferze gazu obojętnego itp.). W dobie dbałości o ochronę środowiska naturalnego ta metoda analityczna staje się szczególnie cenna, ponieważ nie wymaga stosowania żadnych toksycznych związków chemicznych. Dużą zaletą tej techniki jest również jej prostota i możliwość pełnej automatyzacji procesu pomiarowego. Najlepszym tego przykładem jest analizator LIBS zamontowany na pojeździe PathFinder pomyślnie wysłany na Marsa i wykorzystany do analizy gruntu [18].

Literatura

- [1] CREMERS D.A., RADZIEMSKI L.J., *Handbook of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy*, John Wiley & Sons, London 2006.
- [2] GORNUSHKIN I., AMPONSAH-MANAGER K., SMITH B.W., OMENETTO N., WINEFORDNER J.D., *Microchip Laser Induced Breakdown Spectroscopy: Preliminary Feasibility Investigation*, *Applied Spectroscopy*, 2004, Vol. 58, No. 7, 762–769.
- [3] STURM V., PETER L., NOLL R., *Steel analysis with laser-induced breakdown spectrometry in the vacuum ultraviolet*, *Appl. Spectroscopy*, 2000, Vol. 54, 1275–1278.
- [4] VADILLO J.M., LASERNA J.J., *Laser-induced plasma spectrometry: truly a surface analytical tool*, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 2004, Vol. 59, No. 2, 147–161.
- [5] MIZIOLEK A.W., PALLESCHI V., SCHECHTER. I., *Laser Induced Breakdown Spectroscopy*, Cambridge University Press, New York 2006.
- [6] Pharma Laser – PharmaLIBS 250 Instrument Manual, 2008 Product Number 8119-001, Rev. 1.30.
- [7] SINGH J.P., THAKUR S.N., *Laser Induced Breakdown Spectroscopy*, Elsevier B.V., 2007.
- [8] http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/lines_form.html
- [9] <http://physics.nist.gov/PhysRefData/ASD/Html/lineshelp.html#OUTRELINT>
- [10] http://www.appliedphotonics.co.uk/Libs/about_libs.htm
- [11] BRECH F., CROSS L., *Optical microemission stimulated by a ruby maser*, *Appl. Spectrosc.*, 1962, Vol. 16, 59–62.
- [12] *Table of Laser Lines in Gases and Vapors*, 3rd Revised and Enlarged Edition by R. Beck, W. Englisch and K. Gürs, Springer-Verlag, Berlin 1980.
- [13] <http://www.files.chem.vt.edu/chem-ed/optics/selector/spectrom.html>
- [14] FLOREK S., HAISCH C., OKRUSS M., BECKER-ROSS H., *A new, versatile echelle spectrometer relevant to laser induced plasma applications*, *Spectrochimica Acta, Part B*, 2001, 56, 1027–1034.
- [15] ZHANG H., YUEH F.Y., SINGH J.P., *Laser-Induced Breakdown Spectrometry as a Multimetal Continuous-Emission Monitor*, *Applied Optics*, 1999, Vol. 38, No. 9, 1459–1466.
- [16] CASTLE B.C., TALABARDON K., SMITH B.W., WINEFORDNER J.D., *Variables Influencing the Precision of Laser-Induced Breakdown Spectroscopy Measurements*, *Applied Spectroscopy*, 1998, Vol. 52, No. 5, 649–657.

- [17] CASTLE B.C., KNIGHT A.K., VISSER K., SMITH B.W., WINEFORDNER J.D., *Battery powered laser-induced plasma spectrometer for elemental determinations*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 1998, Vol. 13, 589–595.
- [18] SIRVEN J.B., SALLE B., MAUCHIEN P., LACOUR J.L., MAURICE S., MANHES G., *Feasibility study of rock identification at the surface of Mars by remote laser-induced breakdown spectroscopy and three chemometric methods*, Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2007, Vol. 22, No. 12, 1471–1480.

ROZDZIAŁ 13
FOTODIAGNOSTYKA MEDYCZNA
W CZASIE RZECZYWISTYM.
APARATURA I APLIKACJE KLINICZNE

Mirosław Kwaśny

Spis treści

13.1. Wstęp	333
13.2. Metoda autofluorescencji i jej zastosowania kliniczne	334
13.2.1. Charakterystyka spektralna fluoroforów tkanek biologicznych	334
13.2.2. Praktyczne wykorzystanie metody autofluorescencji w klinikach	336
13.3. Układy diagnostyczne do wykrywania fotoczułaczy egzogennych	340
13.3.1. Przegląd układów diagnostycznych	340
13.3.2. Konstrukcje własnych układów fluorescencyjnych	342
13.4. Wybrane aplikacje medyczne metody PDD	347
13.4.1. Wykorzystanie metody PDD w dermatologii	348
13.4.2. Zastosowanie PDD w innych specjalnościach medycznych	350

13.1. Wstęp

Metody fluorescencyjne odgrywają w medycynie i biochemii od 50 lat ważną rolę. Analizy sekwencji DNA, metody immunologiczne, cytometria przepływowa, analizy witamin, aminokwasów, porfiryn, farmaceutyków czy kationów należą do klasycznych przykładów zastosowań techniki fluorescencyjnej. Do zalet metody należy jej czułość, bowiem natężenie fluorescencji jest proporcjonalne m.in. do natężenia światła wzbudzającego emisję, selektywność oraz możliwość oddzielenia spektralnego sygnałów emisji i wzbudzenia oraz odcięcie tła. Wymienione klasyczne oznaczenia wymagają jednak pobierania i wstępnego przygotowania materiału biologicznego. W ostatnim dwudziestoleciu pojawiły się nowe potrzeby wykorzystania w praktyce medycznej i mikrobiologii analiz fluorescencyjnych materiału biologicznego, w czasie rzeczywistym i to bez konieczności pobierania próbek. Klasyczne już przykłady wy-

korzystania analiz w czasie rzeczywistym obejmują: (1) fotodiagnostykę (ang. *Photodiagnosis* – PDD) sprzężoną z fotodynamiczną metodę leczenia (ang. *Photodynamic Therapy* – PDT), (2) wykrywanie wczesnych zmian szklwiwa i możliwości wykorzystania metody w praktyce stomatologicznej oraz (3) wykrywanie bakterii w powietrzu.

W klasycznej odmianie PDT, w pierwszym etapie do organizmu wprowadza się dożylnie lub śródtkankowo barwnik, który selektywnie gromadzi się w chorej tkance. Wzbudzany światłem barwnik reaguje następnie z tlenem rozpuszczonym w środowisku tkankowym, wytwarzając tlen singletowy lub wolne rodniki, które niszczą komórki w procesie utleniania. Lokalizację np. nowotworów przeprowadza się metodą fluorescencji wzbudzanej laserami (ang. *Laser Induced Fluorescence* – LIF). Wymienione trzy różne dziedziny badań, aplikacji metod i systemów fluorescencyjnych łączy biologiczne pochodzenie materiału, sama metoda fluorescencji wzbudzanej laserami, jak i konieczność zbudowania czułych, światłowodowych analizatorów widma czy obrazowania fluorescencji. Rozdział niniejszy dotyczy metody PDD z wykorzystaniem wzbudzanej laserowo fluorescencji do wykrywania endogennych (tzw. autofluorescencja) i egzogennych fluoroforów (barwników fluoryzujących) stosowanych w metodzie PDT.

Zaprezentowano istniejącą na świecie i zbudowaną w kraju aparaturę pomiarową, omówiono sposób ilościowego pomiaru egzogennych i endogennych fluoroforów zawartych w organizmach biologicznych oraz podano przykładowe kliniczne aplikacje fotodiagnostyki. Aparatura diagnostyczna ma za zadanie określić kinetykę akumulacji preparatów w nowotworze i jego otoczeniu, wyznaczyć optymalny czas naświetlania od momentu iniekcji, rozkład powierzchniowy preparatu, efekty fotowysielania uczulacza podczas naświetlania terapeutycznego. Skonstruowane światłowodowe laserowe analizatory widm i układy obrazowania fluorescencji pozwoliły na opracowanie powtarzalnych metodyk pomiarowych w klinikach.

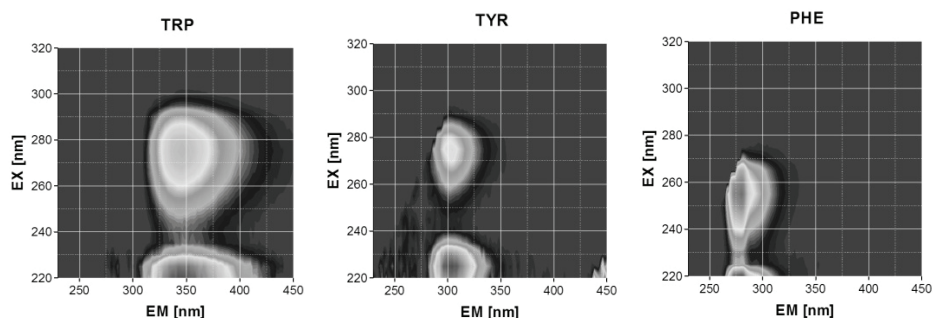
13.2. Metoda autofluorescencji i jej zastosowania kliniczne

13.2.1. Charakterystyka spektralna fluoroforów tkanek biologicznych

Źródłem endogennej fluorescencji w komórkach i tkankach biologicznych są aminokwasy aromatyczne, służące do budowy białek oraz koenzymy. W tkankach twardych silne własności fluorescencyjne wykazuje główny składnik kości – hydroksyapatyt. W niektórych przypadkach chorobowych obserwuje się też podwyższone poziomy metoloporfiryn [1].

Spośród 20 aminokwasów z których budowane są białka, tryptofan (TRP), tyrozyna (TYR) i fenyloalanina (PHE) wykazują fluorescencję w obszarze UV. Charaktery-

styki emisyjne fluoryzujących aminokwasów w postaci pełnych map wzbudzeniowo-emisyjnych (EX-EM) przedstawiono na rys. 13.1. W naturalnych białkach fluorescencja TYR jest często wygaszana, a powodem tego są oddziaływania z łańcuchami peptydowymi lub transfer energii do TRP. Emisję PHE można zaobserwować jedynie przy nieobecności TYR i TRP, co zdarza się bardzo rzadko [2]. Denaturacja białek powoduje wzrost natężenia fluorescencji TYR. Parametry emisji TRP są bardzo czułe na lokalne zmiany właściwości środowiska, stąd często są wykorzystywane do badania zmian konformacyjnych białek. Do drugiej grupy fluoryzujących endogennych związków należą koenzymy, w tym: dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NADH), dinukleotyd flawinoadeninowy (FAD) i mononukleotyd flawinowy (FMN). Koenzymy te współdziałają z oksyreduktazami i ich zadaniem jest przenoszenie protonów i elektronów. Silnie fluoryzujące właściwości wykazuje NADH, posiadający maksima absorpcji i emisji przy długościach fal 340 i 460 nm, przy czym forma utleniona koenzymu – NAD^+ nie fluoryzuje. W roztworach fluorescencja związku jest częściowo gaszona przez zderzenia z cząsteczkami adeniny.



Rys. 13.1. Mapy EX-EM fluoryzujących aminokwasów

Koenzymy FAD i FMN oraz witamina B₂ (różni się od FMN jedynie brakiem reszty fosforanowej) absorbują światło o długości fali około 450 nm, a emisja występuje przy długości fali około 530 nm. W przeciwieństwie do NADH, jedynie forma utleniona wykazuje fluorescencję. Nukleotydy i kwasy nukleinowe ogólnie nie wykazują fluorescencji, chociaż istnieją wyjątki. Przykładem jest drożdżowy tRNA^{PE} zawierający silnie fluoryzującą zasadę, znaną jako Y_t, z maksimum emisji przy około 470 nm.

Fosforylowa pochodna witaminy B₆ jest też fluoryzującym koenzymem [3]. Witamina B₆ występuje w trzech formach o jednakowej aktywności biologicznej: pirydoksyna, pirydoksal i pirydoksamina [4]. Biologicznie czynnymi formami są fosforanowe pochodne pirydoksaminy i pirydoksalu, które współdziałają z enzymami czynnymi głównie w przemianach aminokwasów (m.in. racemizacji optycznie czynnych aminokwasów, transaminacji, dekarboksylacji, syntezie tryptofanu).

Ważną grupą fluoroforów są pochodne pterydynowe, heterocykliczne związki zawierające różne podstawniki w podstawowej strukturze pteryny [5, 6]. Pteryna zbu-

dowana jest ze sprzężonych pierścieni pirazynowego i pirymidynowego, który zawiera karbonylowy tlen i grupę aminową. Układ pterydynowy jest rozpowszechniony w przyrodzie, gdyż jego pochodne są podstawą ubarwienia skrzydeł i oczu owadów oraz skóry płazów i ryb [5].

Kwas foliowy, niezbędny do wytwarzania czerwonych krwinek krwi, zbudowany jest z grupy pteroilowej, kwasów p-aminobenzoesowego i glutaminowego. Układ pterydynowy występuje w bakteriach i grzybach.

W wielu chorobach nowotworowych, zakażeniach grzybiczych, zaburzeniach metabolizmu porfiryń, w zmienionych miejscach chorobowych, następuje akumulacja endogennych pochodnych porfiryńowych, łatwych do diagnozowania metodami fluorescencji. Opisane powyżej związki są podstawowymi wewnętrznymi fluoroforami w tkankach zwierzęcych. Pozostałe istniejące związki mają o wiele mniejsze znaczenie z punktu widzenia możliwości wykrywania zmian fluorescencji w organizmach [7].

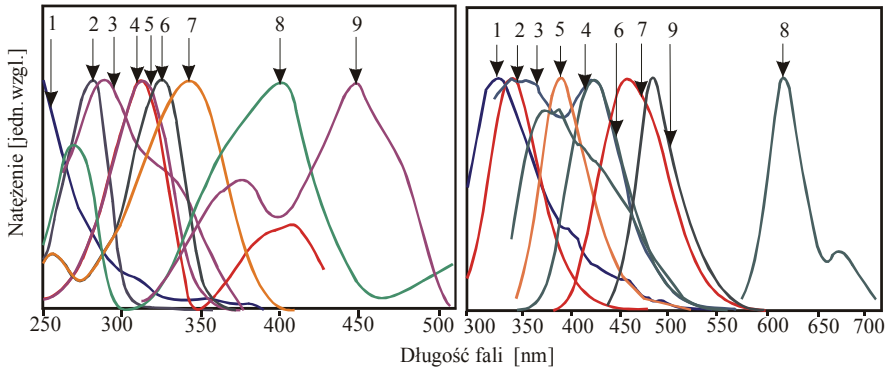
13.2.2. Praktyczne wykorzystanie metody autofluorescencji w klinikach

Wykorzystaniem metody LIF do analizowania stanu tkanek biologicznych zajmuje się wiele ośrodków na świecie od przeszło 20 lat. Metoda ta znalazła zastosowanie w diagnostyce chorób skóry, miażdżycy, kamicy nerkowej i moczowej, a przede wszystkim wczesnych faz nowotworów [8, 9]. „Optyczne biopsje” w przeciwieństwie do badań histopatologicznych są nieinwazyjne, nie wymagają pobierania materiału poprzez biopsję cienkoigłową, ilość analizowanego materiału jest Nielimitowana, promieniowanie doprowadzane i odbierane jest światłowodami, sygnały są mierzone w czasie rzeczywistym, te same obszary można analizować wielokrotnie.

Mechanizm zmian w widmach autofluorescencji (AF) chorych tkanek tłumaczony jest różnicą ilościową i jakościową fluoroforów, zmianą ich równowagi redox i głębokości położenia, różną zawartością w tkankach, absorbujących, lecz nie fluoryzujących chromoforów, zmianami struktury pozakomórkowej matrycy i różną ilością warstw komórkowych nabłonka.

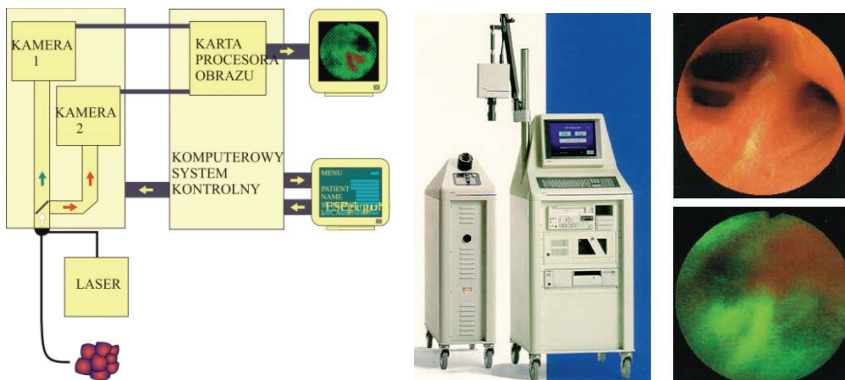
Trzeba jednak pamiętać, że widma emisji poszczególnych fluoroforów w tkankach są modyfikowane ze względu na rozpraszanie światła czy absorpcję krwi, która pochłania światło w widzialnym obszarze widma, a także lokalne zmiany parametrów środowiska (pH, potencjał redox).

Nakładanie się widm wielu fluoroforów jest jednym z poważniejszych ograniczeń w stosowaniu metody AF w diagnostyce medycznej, szczególnie przy wzbudzeniu układu promieniowaniem o jednej długości fali. Na rysunku 13.2 przedstawiono absorpcyjną i emisyjną charakterystykę najważniejszych fluoroforów występujących w układach biologicznych [10]. Można wyraźnie wydzielić pasma tryptofanu (składniki budowy elastyny, kolagenu), koenzymów FAD i NADH oraz endogennych porfiryń.



Rys. 13.2. Charakterystyka spektralna potencjalnych fluoroforów endogennych:
 1 – kolagen, 2 – tryptofan, 3 – elastyna, 4 – fosforan pirydoksaminy, 5 – pirydoksyna,
 6 – fosforan pirydoksalu, 7 – NADH, 8 – protoporfiryna IX, 9 – FAD

Po latach intensywnych badań prowadzonych na całym świecie przez wiele grup, końcowy efekt, w postaci wdrożenia handlowo dostępnych profesjonalnych systemów wykorzystujących techniki autofluorescencji ograniczył się jedynie do kilku przypadków. W bronchoskopii fluorescencyjnej wykorzystywany jest system LIFE firmy Xilix [11]. Układ wyposażony jest w laser He-Cd (442 nm) o mocy 150 mW i dwie kamery CCD sprzężone ze wzmacniaczami obrazu. Widok aparatury i przykład zmienionej nowotworowo tkanki pokazano na rys. 13.3.

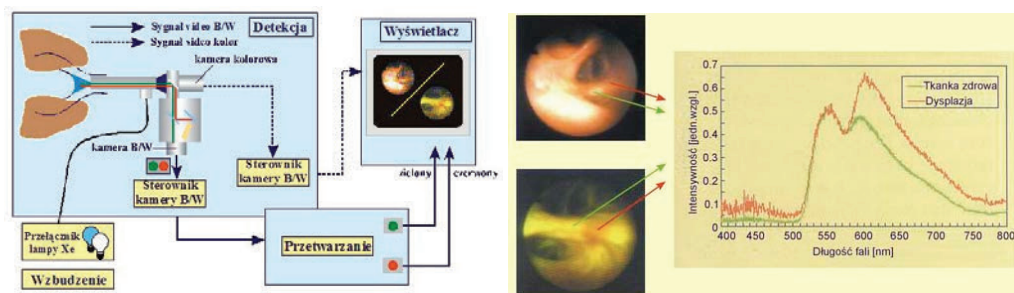


Rys. 13.3. Schemat oraz widok systemu LIFE. Po prawej: przykładowa diagnostyka metodą klasycznej bronchoskopii (u góry) i metodą LIF (u dołu)

Końcowy obraz fluorescencyjny jest kombinacją dwóch składowych obrazów tego samego obszaru tkanki, obserwowanych w zielonym i czerwonym zakresie widma. Nowotwory charakteryzują się niższą fluorescencją w zakresie zielonym i wyższym stosunkiem fluorescencji pasm czerwonego i zielonego w porównaniu do tkanek

zdrowych [12, 13]. Obniżenie poziomu AF w tkankach nowotworowych w obszarze emisji FAD związane jest m.in. z większym metabolizmem tych tkanek (wzrost poziomu NADH i obniżenie ilości utlenionej formy FAD). Układ przewidziany jest do badań fluoroforów endogennych i małych, diagnostycznych ilości zewnętrznego sensybilizatora ($0,1 \pm 0,5$ mg/kg). W Polsce układ ten jest wykorzystywany w Ośrodku Diagnostyki i Terapii Laserowej ŚAM w Bytomiu, do badań przesiewowych w pulmonologii, gastroenterologii, urologii i dermatologii [14, 15, 16, 17]. System LIFE przez kilka lat był eksploatowany w Klinice Chorób Płuc przez zespół prof. M. Pirożyńskiego. Kwaśny i wsp. [18] wskazali na możliwość wykorzystania systemu do diagnostyki wczesnej fazy próchnicy zębów.

Innym układem do analizy płuc metodą autofluorescencji jest system Wolfa [19]. Źródłem wzbudzenia fluorescencji jest lampa ksenonowa z filtrem fioletowym (maksimum emisji około 400 nm). Układ detekcyjny stanowi czarno-biała kamera CCD, która rejestruje na przemian obrazy tego samego obszaru przez filtry zielony i czerwony (patrz rys. 13.4). Po znormalizowaniu natężenia emisji w paśmie zielonym, obserwuje się różnice natężenia fluorescencji tkanek zdrowych i nowotworowych w paśmie czerwonym. Sposób analizy jest więc podobny do badania za pomocą systemu LIFE i sprowadza się do pomiaru stosunku natężeń fluorescencji w pasmach zielonym i czerwonym.



Rys. 13.4. System Wolfa do analizy bronchoskopowej, obraz w świetle białym, obraz fluorescencyjny tkanki zdrowej i dysplazji oraz charakterystyka widmowa tkanki zdrowej i dysplazji po oświetleniu tkanki światłem fioletowym

Zmiany przednowotworowe (dysplazje) i wczesne fazy nowotworowe (CIS – *carcinoma in situ*, mikroinwazja) są trudne do wykrycia tradycyjnymi metodami bronchoskopowymi, gdyż zmiany chorobowe obejmują obszar o średnicy do kilku milimetrów i grubości kilku warstw komórkowych (0,2–1 mm) [20]. Jedynie około 30% przypadków CIS udaje się wykryć za pomocą tradycyjnej bronchoskopii w świetle widzialnym. Powierzchniowy i płaski typ wczesnej fazy nowotworu jest możliwy do detekcji tradycyjną bronchoskopią przy średnicy powyżej 5 mm. Guzowate zmiany mogą być wykrywane przy wielkości obszaru nowotworowego ok. 2 mm [21].

Do stadium badań klinicznych czerniaka weszła metoda opracowana przez zespoły prof. B. Chwirot i prof. St. Chwirot z UMK w Toruniu [22]. Wykorzystując źródło

wzbudzenia z zakresu UVA i kombinacje obrazów fluorescencji otrzymywanych w różnych pasmach spektralnych, autorzy osiągnęli na dużym materiale doświadczalnym wykrywalność nowotworu na poziomie 85%. Jeszcze większą, bo aż 96% wykrywalność wykazali przy diagnostyce nowotworów żołądka w warunkach *in vitro*. Źródłem wzbudzenia fluorescencji był laser He-Cd generujący linię 325 nm, a cząstkowe obrazy fluorescencyjne rejestrowano przy długościach fal 350, 440 i 590 nm. Obiecujące wyniki osiągnięto również w diagnostyce raka jelita grubego i żołądka. Opracowany przez wymienionych autorów zestaw kliniczny ograniczony jest do badań powierzchniowych.

Układem, który znajduje coraz powszechniejsze zastosowanie w analizie fluorescencyjnej jest system firmy STORZ przeznaczony głównie do wykrywania PPIX w metodzie ALA-PDT. W niektórych przypadkach może dodatkowo służyć do diagnostyki endogennych fluoroforów; np. w obszarze drzewa oskrzelowego. Układ taki jest stosowany m.in. w Katedrze i Klinice Chirurgii Klatki piersiowej AM w Lublinie [23]. Problematyka badań autofluorescencji jest bardzo szeroka, a wyniki prac podstawowych różnych zespołów korzystających z układów laboratoryjnych można znaleźć w licznych artykułach [10, 14].

W diagnostyce ginekologicznej najlepszy zakres wzbudzenia to długości fal od 300 do 330 nm [24, 25]. Przyczyną świecenia tkanki raka płasko-komórkowego (*squamous cell carcinoma*) jamy ustnej są metaloporfiryny zawarte w bakteriach (np. *Pseudomonas*) [26]. Zwiększenie poziomu endogennych porfiryn w wielu chorobach jest bardzo ciekawym zagadnieniem. Zwiększona akumulacja porfiryn w tkankach nowotworowych wielokrotnie była obserwowana przez autora tej pracy w wielu schorzeniach skóry (*Keratosis senilis* – rogowacenie starcze), czy w zaawansowanych nowotworach szyjki macicy. Zakumulowane porfiryny nie wykazują jednak efektu fotodynamicznego.

Metoda AF ma duże szanse zastosowania praktycznego w diagnostyce różnych infekcji oraz zmian pigmentowych skóry oraz zaburzeń metabolizmu. Dotychczas powszechnie stosowana lampa Wooda do obserwacji zmian fluorescencji skóry jest ważnym narzędziem w dermatologii [27, 28]. Obecnie zmiany fluorescencji określane są jedynie wizualnie, co w połączeniu ze zbyt małą gęstością mocy stosowanych lamp rtęciowych jest dużym ograniczeniem metody. Niektóre infekcje grzybicze wywołane przez chorobotwórcze grzyby można precyzyjnie zdiagnozować metodami fluorescencji. Widma fluorescencji zależą od rodzaju choroby. Dotychczasowy poziom diagnostyki umożliwia jedynie powiązanie charakterystycznej barwy luminescencji z rodzajem zakażenia. W przypadku zakażenia skóry grzybem *Malassezia furfur*, wywołującego łupież pstry, luminescencja ma barwę miedzianopomarańczową, światło emisji koralowoczerwone charakterystyczne jest dla łupieżu rumieniowego (*Erythrasma*). Luminescencja może pomóc w odróżnieniu znamion na skórze [28]. Pomimo licznych prac, metoda AF znajduje się jednak wciąż na etapie badań podstawowych. Mechanizmy odpowiedzialne za zmiany widm fluorescencji i pełna charakterystyka zmienionych chorobowo tkanek znane są dla niewielkich ilości przypadków.

13.3. Układy diagnostyczne do wykrywania fotouczulaczy egzogennych

13.3.1. Przegląd układów diagnostycznych

W odróżnieniu od detekcji autofluorescencji, układy diagnostyczne egzogennych fotouczulaczy mają za zadanie zlokalizować konkretny, znany związek chemiczny, który wcześniej został wprowadzony do organizmu. Dotychczas zbudowano na świecie wiele systemów diagnostycznych, głównie jednak laboratoryjnych, wykorzystując różne techniki pomiarowe i źródła światła (lampy rtęciowe, ksenonowe, lasery: helowokadmowy, helowo-neonowy, argonowy, kryptonowy, barwnikowy pompowany azotowym, harmoniczne lasera Nd:YAG, tytanowy, fioletowy na bazie GaN). Układy te pracowały na potrzeby konkretnej grupy badawczej i nie były przeznaczone na sprzedaż.

Już pierwsze problemy z pomiarami fluorescencji najbardziej znanego światłouczulacza Fotofrinu II zmieniły podejście do fotodiagnostyki. Pierwotnie zakładano, że dzięki wprowadzeniu np. do krwi fotouczulacza, precyzyjnie będzie można zlokalizować i określić rozmiary nowotworu. Okazało się jednak, że selektywność metody nie jest tak wysoka, jak zakładano, poziom retencji przy dawkach leku około 2 mg/kg, wystarczający dla wywołania efektu fotodynamicznego w tkankach chorych, jest również wysoki dla tkanek zdrowych. Traci się więc informację o selektywności akumulacji. W przypadku czułych systemów, takich jak LIFE, dawka terapeutyczna jest za wysoka aby rozróżnić miejsca zdrowe od zmienionych nowotworowo. Obniżając dawkę leku do poziomu tzw. diagnostycznego (około 0,1–0,2 mg/kg ciała), poprawia się zdecydowanie selektywność retencji. Fotodiagnostyka przy ogólnym wprowadzeniu preparatu do organizmu musi być podporządkowana terapii. Zupełnie inna sytuacja jest ze światłouczulaczami czy prekursorami podawanymi miejscowo. Metoda PDD jest wtedy nieinwazyjna; badania można wielokrotnie powtarzać i jest sens ich prowadzenia nawet w celach tylko diagnostycznych.

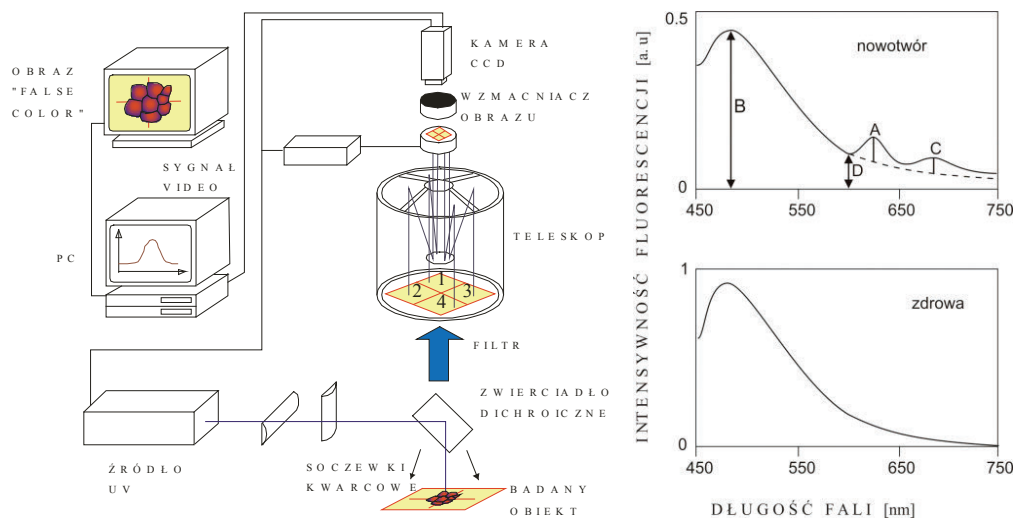
Między innymi z tego powodu metoda PDD/PDT wykorzystująca preparaty na bazie prekursora porfiryn – kwasu 5-aminolewulinowego (ALA) jest dominującą metodą medycyny fotodynamicznej. Ponad 80% zabiegów terapeutycznych dotyczy skóry; przy nawet niskiej selektywności akumulacji PPIX, miejsca zdrowe przysłania się w czasie naświetlania.

Historia pomiarów fluorescencji porfiryn, podobnie jak i metoda PDT, zostały zapoczątkowane w USA. Jednym z pierwszych prostych fluorescencyjnych przyrządów PDD był zbudowany w Roswell Park Cancer Institute fotometr fluorescencyjny [29]. Tkanka była naświetlana poprzez światłowód jednocześnie światłem lasera He-Ne o dwóch długościach fal: 612 i 632,8 nm. Przy długości fali 612 nm wzbudzane jest jedynie tło, natomiast przy 632,8 nm tło i porfiryny. Fluorescencja jest rejestrowana w zakresie 690 ± 10 nm za pomocą fotodiody z filtrami.

Pierwszy, klasyczny system diagnostyczno-terapeutyczny połączony z techniką endoskopową skonstruowano w Centrum Onkologicznym w Tokio [30]. Układ wzbudzenia stanowił laser barwnikowy pompowany ekscymerowym (XeCl-308 nm). Do diagnostyki wykorzystano wzbudzenie falą 405 nm poprzez naświetlanie roztworu difenylosulfonu, zaś do leczenia zastosowano falę 630 nm, otrzymaną poprzez naświetlenie rodaminy B. Wiązka światła była wprowadzana do kanału endoskopu poprzez światłowód o średnicy 400 μm . Widmo fluorescencji zaabsorbowanego w nowotworze sensybilizatora, wzbudzonego promieniowaniem laserowym (0,2 mJ w impulsie z częstotliwością 30 Hz) zbierane było z odległości około 1 cm od powierzchni tkanki nowotworowej. Emitowane z nowotworu światło fluorescencji porfiryny (630 nm i 690 nm), kierowane było następnie na monochromator, kamerę ICCD, procesor i monitor. W celu uzyskania rzeczywistego obrazu obserwowanej tkanki nowotworowej stosuje się światło białe z lampy ksenonowej. Obraz endoskopowy poprzez światłowód, kamerę TV, procesor jest sprzęgnięty z widmem fluorescencji HpD. Barwa obrazu jednocześnie informuje o natężeniu fluorescencji.

Koncepcja wyizolowania obszaru fluorescencji endogennych barwników od tła polegała na rejestracji fluorescencji w czterech różnych pasmach widma emisji i zastosowaniu algorytmu pozwalającego odjąć sygnały fluoroforów endogennych. Idea tego wielobarwnego obrazowania zaproponowana przez grupę prof. Svanberg [31] jest pokazana na rys. 13.5. Widmo emisji tkanki nowotworowej z wprowadzonym fotouczulaczem wskazuje na mały udział porfiryny, stąd zachodzi konieczność odjęcia tła (pomiar fluorescencji przy długości fali D) i normalizacja w stosunku do sygnału NADH.

Stosunkowo proste rozwiązanie diagnostyki wczesnych faz nowotworów w urologii przy wykorzystaniu ALA zastosowano w Klinice Urologii w Monachium [32]. Światło lasera kryptonowego (407–413 nm, Coherent) jest wprowadzane do światłowodu o średnicy 0,5 mm z końcówką dwustozkową umożliwiającą jednorodne oświetlenie powierzchni pęcherza (moc światła na wyjściu światłowodu wynosi do 200 mW). Do rejestracji fluorescencji zastosowano kolorową kamerę video (Storz, Tuttlingen). Obiecujące wyniki badań były powodem podjęcia prac dotyczących modernizacji systemu Storz na potrzeby diagnostyki fluorescencyjnej. Istnieją wersje układów diagnostycznych oparte na rejestracji i analizie całego widma fluorescencji. Pierwszy taki układ zastosowano w klinikach Lund University Technology [8]. Źródło światła stanowi laser barwnikowy pompowany impulsowym laserem azotowym (337 nm). Światło wzbudzające jest doprowadzane do analizowanej tkanki przez światłowód o średnicy 600 μm . Sygnał fluorescencji jest przesyłany tym samym światłowodem i po odcięciu filtrami promieniowania laserowego jest ogniskowany na szczeliny monochromatora. Do rejestracji widma wykorzystano wielokanałowy analizator widma (EG&G OMA III) wyposażony w linijkę detektorów. Oddzielenie sygnału tła od endogennych barwników zostało zrealizowane poprzez zastosowanie metody pomiarów fluorescencji rozdzielonej w czasie [33]. Fluorescencja pochodząca od barwników endogennych charakteryzuje się czasem życia krótszym niż 6 ns, podczas, gdy wprowadzone egzogenne hematoporfiryny mają czasy dłuższe, rzędu 15 ns.



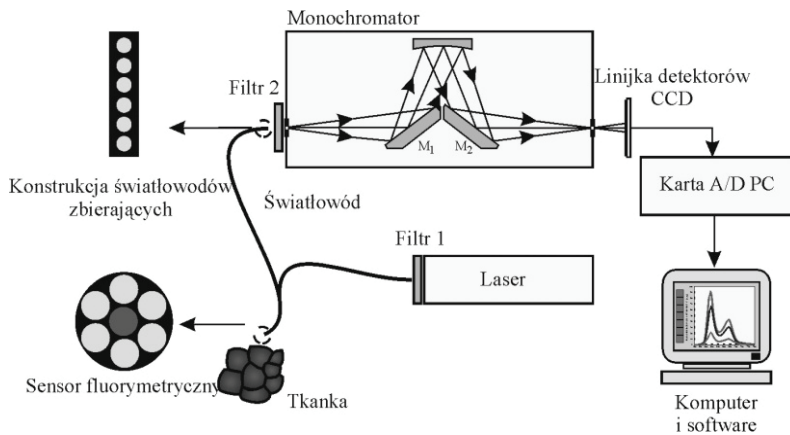
Rys. 13.5. Idea wielobarwnego obrazowania fluorescencji i widma emisji tkanki nowotworowej (EX = 405 nm) po iniekcji Fofofrinu (2,5 mg/kg ciała) oraz tkanki zdrowej

Również w Polsce trwają prace konstrukcyjne nad systemami i metodami pomiaru stężenia fotouczulaczy w tkankach. Układ do badania pochodnych chlorinu e6 zbudowała m.in. grupa prof. Stręka [34] wykorzystując czułą kamerę czarno-białą (czułość 0,002 lux) i jako źródło wzbudzenia – II harmoniczna lasera Nd:YAG (532 nm).

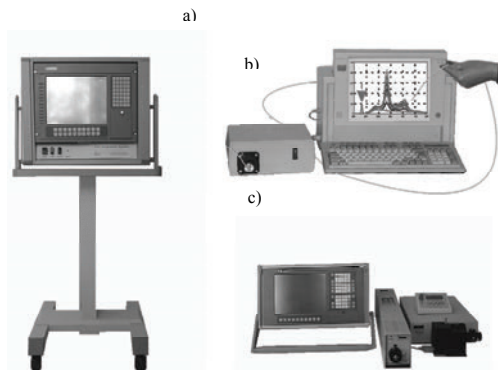
13.3.2. Konstrukcje własnych układów fluorescencyjnych

Zbudowane w Wojskowej Akademii Technicznej światłowodowe analizatory laserowe są oparte na pomiarze widma emisji z analizowanego punktu powierzchni [35, 36] lub obrazowaniu fluorescencji przy jednej lub dwóch wybranych długościach fali [30]. Układy składają się z lasera o mocy 2–10 mW w zakresie 355–633 nm, monochromatora, wielokanałowego detektora CCD, światłowodowego czujnika doprowadzającego światło do tkanki i zbierającego fluorescencję, komputera do akwizycji i obróbki danych. Do wzbudzenia emisji fluoroforów endogennych i egzogennych zastosowano proste, niezawodne w obsłudze następujące lasery: helowokadmowy (He-Cd, 442 nm, 25 mW), helowo-neonowy (He-Ne, 632,8 nm, 25 mW), półprzewodnikowy (GaN, 407 nm, 15 mW), II harmoniczna Nd:YAG (532 nm, 10 mW) [37, 38, 39, 40, 41, 42, 43]. Wybór tych źródeł umożliwia precyzyjne wykrycie egzogennych fotosensybilizatorów I i II generacji oraz monitorowanie zmian autofluorescencji chorych tkanek bez podawania zewnętrznych fotouczulaczy. Schemat analizatora widma fluorescencji przedstawiono na rys. 13.6. Zbudowane różne typy analizatorów przedstawia rys. 13.7. Źródło laserowe wyposażone jest

w zasilacz, przesłone, pokrętła regulujące ustawienie zwierciadeł, adapter wejścia światłowodu o średnicy 180 μm , czujnik światłowodowy (kateter). Kateter zbudowany jest z koncentrycznego światłowodu do wprowadzania światła laserowego i koncentrycznie rozmieszczonych 6 światłowodów do zbierania światła fluorescencji. Promieniowanie wzbudzające i promieniowanie fluorescencyjne po rozproszeniu na tkance pada na szczelinę monochromatora. Światło lasera stanowi wygodny sygnał odniesienia, przy pomocy którego można normalizować natężenie fluorescencji, zależne od natężenia światła wzbudzającego i geometrycznych warunków pomiarów. Aby uniezależnić się od tych czynników, dokonuje się również pomiaru natężenia światła wzbudzającego, które po odbiciu od badanego obiektu i 10^5 -krotnym osłabieniu na filtrze trafia na detektor. Stosunek powierzchni pasma emisji lasera i fluorującego obiektu jest wartością zależną jedynie od stężenia fluoroforu.

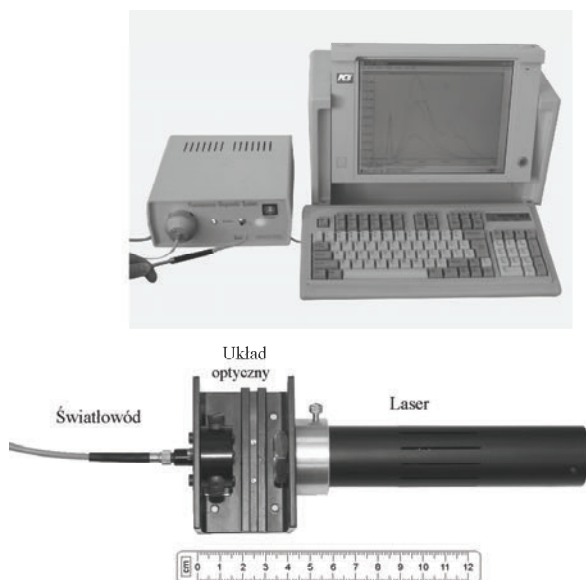


Rys. 13.6. Schemat optyczny światłowodowego analizatora fluorescencji



Rys. 13.7. Różne typy zbudowanych analizatorów widma fluorescencji ze wzbudzeniem laserami: a) He-Ne, b) II harmoniczna YAG:Nd, c) He-Cd

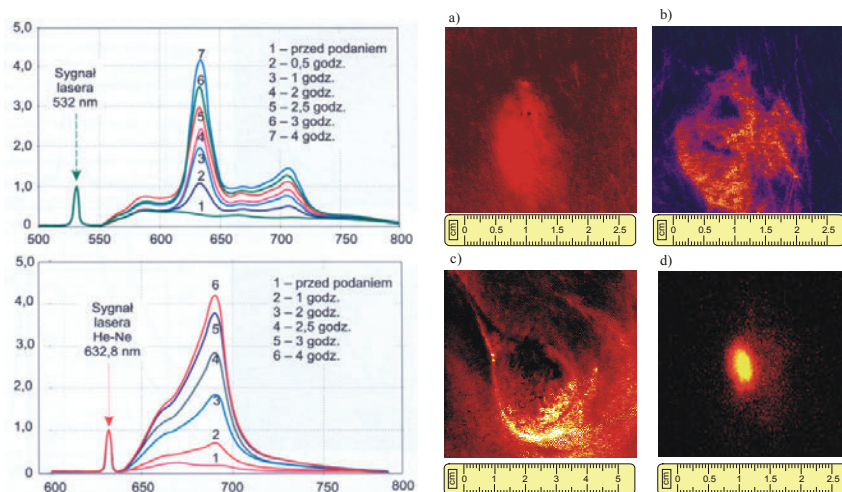
Po rozszczeniu na siatce monochromatora, światło dochodzi do liniiki detektorów, zbudowanej z 1024 (lub 2048) elementów. Cały zakres spektralny widma otrzymywany jest jednocześnie. Spektrometr może być zainstalowany na karcie komputera z programem sterującym pomiarami i obróbką widm. Aby zwiększyć czułość układu detekcyjnego, końcówka światłowódów zbierających emisję ukształtowana została w linię równoległą do szczeliny monochromatora. Sygnały z detektorów są analizowane komputerowo. Pomiary można prowadzić również wewnątrz organizmu ludzkiego, gdyż konstrukcja światłowódów umożliwia ich umieszczenie w endoskopach.



Rys. 13.8. Widok laserowego analizatora fluorescencji i lasera GaN z układem optycznym i światłowodem

Małe wymiary zestawów i prosta eksploatacja umożliwiają transport i pracę w warunkach klinicznych. Zbudowane oddzielne układy mogą znaleźć zastosowanie także w innych dziedzinach m.in. do wykrywania próchnicy zębów czy analizy laserowych materiałów aktywnych. Modułowy charakter opracowanych układów umożliwia zastosowanie nowych źródeł promieniowania w torze wzbudzenia fluorescencji. Największe możliwości diagnostyczne posiada analizator ze wzbudzeniem laserem GaN (patrz rys. 13.8) [43]. Oprócz wykorzystania go do detekcji w metodzie PDD, znalazł on zastosowanie w praktyce stomatologicznej do wykrywania wczesnych faz próchnicy i płytki nazębnej. Opracowano rozwiązanie spektrometru światłowodowego, w którym w torze wzbudzenia zastosowano laser półprzewodnikowy firmy Power Technology ze strukturą GaN firmy Nichia, generujący promieniowanie o długości fali 407 nm o mocy wyjściowej 15 mW. Testowanie zbudowanych układów diagnostycznych i prepara-

tów zawierających ALA w warunkach *in vivo* przeprowadzono na białych myszach z wszczepionym nowotworem płuc. Wielkość guza nie przekraczała średnicy 1 cm i grubości 5 mm. Kwas ALA i jego pochodne przykładano na miejsca zmienione chorobowo w postaci kremu. Na rysunku 13.9 przedstawiono zarejestrowane widma fluorescencji tkanek za pomocą laserowych spektrometrów ze wzbudzeniem 532 i 633 nm. Jednocześnie badania tych samych miejsc przy zastosowaniu fal o różnej penetracji pozwalają oszacować głębokość penetracji preparatu w głąb tkanek bez konieczności pobierania próbek do analizy fluorymetrycznej. Innym podejściem jest obrazowanie fluorescencji, które jest bardzo przydatne w praktyce klinicznej. Jednak duże koszty układów, konieczność znacznie silniejszych źródeł światła, skomplikowane procedury normalizacji wyników, trudności obsługi aparatury, szczególnie przy współpracy z endoskopami ograniczają powszechne wykorzystanie tego wariantu. Duże dawki terapeutyczne obniżają selektywność pomiędzy tkankami nowotworowymi i zdrowymi. Z drugiej strony, wysokie sygnały fluorescencji uzyskuje się jedynie przy wyższych stężeniach fotouczulaczy. Na rysunku 13.9 przedstawiono przykłady obrazowania fluorescencji nowotworów z wprowadzonym kompleksem PPIX z l-alaniną i arginina ($PP(Ala)_2Arg_2$).

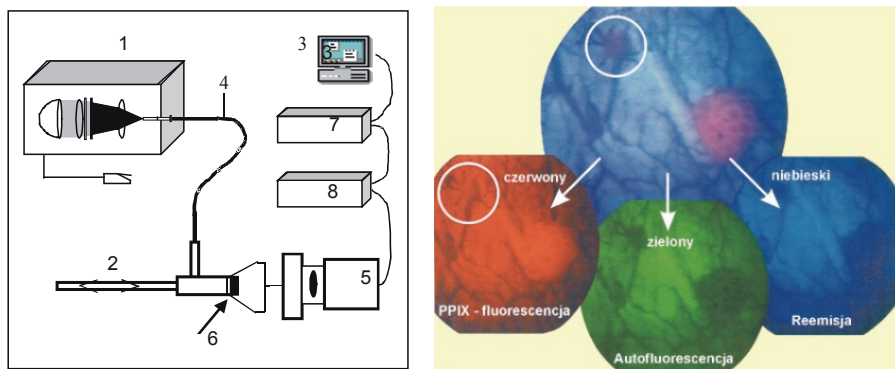


Rys. 13.9. Widma luminescencji nowotworu myszy przedstawiające zmianę stężenia PPIX w czasie po wprowadzeniu ALA i wzbudzeniu laserami: II harmoniczną Nd:YAG (532 nm) i He-Ne (632,8 nm). Obrazy fluorescencyjne nowotworów po iniekcji miejscowej $PP(Ala)_2Arg_2$ ($EX = 390 \text{ nm}$, 2 mW/cm^2 , $Em = 600\text{--}680 \text{ nm}$): a, b – Merkel Cell Carcinoma, c – Melanoma, d – Carcinoma mammae

Przy miejscowym wprowadzaniu ALA maksymalny poziom zsyntetyzowanej PPIX przekracza 10÷20-krotny poziom endogennych porfiryń. W przypadku stosowania ALA, do wzbudzenia fluorescencji wystarczy fioletowe światło emitowane przez lampę ksenonową oraz cyfrowa, kolorowa kamera CCD (GPKS162 firmy Panasonic) do

detekcji fluorescencji. Profesjonalne systemy endoskopowe do diagnostyki z wykorzystaniem ALA oferowane są przez firmy Storz i ESC Medical System (system Endolight). Zbudowano również układ do obrazowania powierzchni tkanek po podaniu PPIX współpracujący z endoskopem (GIN-1) do fotodiagnostyki ginekologicznej. Układ jest wzorowany na systemie do bronchoskopii Storz. Schemat układu i widok pokazano na rys. 13.10 i 13.11. Źródłem wzbudzenia jest wyładowcza lampa ksenonowa o mocy 300 W z filtrem 400 nm, układem przysłon dla regulacji natężenia światła białego i filtrem czerwonym. Światło niebieskie jest przeznaczone do wzbudzenia fluorescencji porfiryn, światło białe umożliwia rejestrację rzeczywistego obrazu narządu. Promieniowanie z lampy transmitowane jest cieczowym światłowodem o średnicy 5 mm do zewnętrznego toru endoskopu, promieniowanie odbite od tkanki i promieniowanie fluorescencji dochodzi torem centralnym endoskopu do kolorowej mikrokamery CCD firmy Philips o czułości 3 lux.

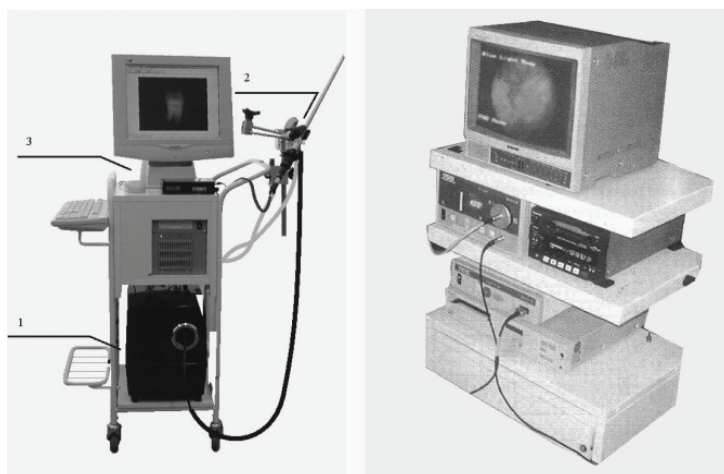
W efekcie na ekranie monitora o wysokiej rozdzielczości widoczny jest niebieski obraz odbiciowy badanej tkanki z obszarami czerwonej fluorescencji zakumulowanych barwników (patrz rys. 13.10). Szczególnie widoczne są naczynia krwionośne i ostro zarysowane charakterystyczne szczegóły ciała. Wzbudzając obszar tkanki z wprowadzonym fotouczulaczem światłem fioletowo-niebieskim i odcinając całkowicie światło wzbudzające, otrzymuje się czerwony obraz fluorescencyjny tła i barwnika.



Rys. 13.10. Schemat optyczny układu obrazowania fluorescencji (1 – źródło światła, 2 – endoskop, 3 – monitor, 4 – światłowód, 5 – kamera CCD, 6 – filtr optyczny, 7 – video, 8 – komputer) i zasada obrazowania barwnego przy stosowaniu filtrów optycznych

Przy niskich natężeniach fluorescencji fotouczulacza trudno jest zlokalizować jednoznacznie obszar nowotworu. Przy zastosowaniu żółtego filtra, część wzbudzającego promieniowania trafia do kamery (reemisja) i w efekcie na tle niebieskim otrzymuje się czerwony, wyraźny, kontrastowy obraz zakumulowanego barwnika. Autofluorescencję tkanki, przeszkadzającą przy wykrywaniu egzogennych porfiryn, można jednak wykorzystać jako dodatkowy element diagnostyczny. Przy zastosowaniu odpowiedniego filtra odcinającego całkowicie promieniowanie wzbudzające, jak i fluorescencję

porfiryń, otrzymuje się zielone obszary fluorescencji nowotworów o obniżonym poziomie autofluorescencji. Porównanie obrazów autofluorescencji i fluorescencji porfiryń jednoznacznie potwierdza istnienie obszaru zmienionego chorobowo. Sztywny endoskop z optyką Hopkinsa z kątem obserwacji 0°, 30° i 60° umożliwia bardzo dokładne odwzorowanie narządów wewnętrznych. Po przełączeniu filtra na kolor czerwony (630 nm) układ umożliwia przeprowadzenie naświetlania terapeutycznego miejsca, w którym zakumulowana została PPIX. Oprócz dermatologii układ może być stosowany w ginekologii.



Rys. 13.11. Układy obrazowania fluorescencji: GIN-1 (a) i Storz (b)
1 – ksenonowy oświetlacz, 2 – układ detekcji, 3 – komputer

13.4. Wybrane aplikacje medyczne metody PDD

Bazując na własnych preparatach z ALA i własnej aparaturze do fotodiagnostyki, przeprowadzono w 10 ośrodkach kilka tysięcy udokumentowanych procedur badawczych. Podstawowe zastosowanie metoda znalazła w dermatologii. Badania prowadziło m.in. w Klinice Dermatologicznej CSK WAM w Warszawie, Klinice Dermatologicznej WIM w Warszawie, Klinice Dermatologicznej UM w Łodzi. Centrum Diagnostyki i Terapii Laserowej w Łodzi (CDiTL).

Nad wykorzystaniem metody w ginekologii pracują zespoły z Kliniki Położnictwa i Ginekologii AM w Warszawie (Wojewódzki Szpital Bródnowski) i Kliniki Ginekologii AM w Łodzi. W okulistyce badania prowadzi Klinika i Katedra Kliniki Okulistycznej I Wydziału Lekarskiego AM w Warszawie, a w pulmonologii – Katedra Torakochirurgii Szpitala Wojewódzkiego Nr 4 w Lublinie.

13.4.1. Wykorzystanie metody PDD w dermatologii

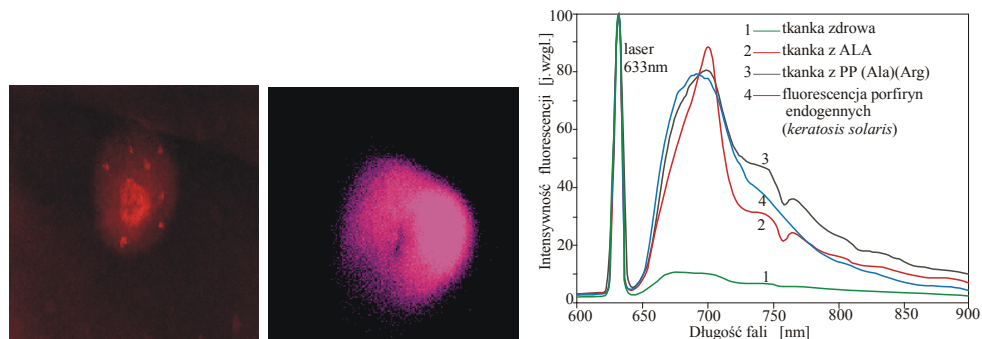
Pierwsze prace nad wykorzystaniem metody ALA-PDD/PDT przeprowadzono w Klinice Dermatologii AM w Warszawie [44]. Pokazały one problemy, z którymi zetknę się każdy zespół stosujący metodę: często konieczność kilkukrotnego powtórzenia procedury leczniczej, wznowy nowotworów, trudności w ocenie i kontroli całkowitego stopnia zniszczenia tkanek chorych.

Pierwsza seria badań przeprowadzona w Klinice Dermatologii CSK WAM w Warszawie na grupie 65 pacjentów pozwoliła na wstępną statystykę i ustalenie procedur badawczych [45, 46]. U wszystkich pacjentów wykonano badania histopatologiczne wycinka ze zmiany skórnej. Po weryfikacji histopatologicznej i zakwalifikowaniu do leczenia, na zmianę skórną nakładano preparat w formie kremu w opatrunku okluzyjnym, początkowo na 6 godzin. Po tym czasie przeprowadzano badania diagnostyczne, określając poziom i rozkład powierzchniowy zakumulowanej PPIX. Naświetlanie terapeutyczne prowadzono w czasie 10–15 minut, stosując promieniowanie czerwone o gęstości mocy od 70 do 100 mW/cm², po czym ponownie kontrolowano poziom nierozłożonego preparatu. W przypadku stwierdzenia obecności w tkance PPIX, przeprowadzano dodatkowe naświetlanie w ciągu 5 minut. Wybór gęstości mocy uwarunkowany był kilkoma czynnikami – powierzchnią zmiany, progiem wrażliwości pacjentów na ból, miejscem występowania zmiany. Po naświetlaniu zmianę zabezpieczano suchym opatrunkiem. W pierwszym tygodniu pacjenci zgłaszali się na badania kontrolne co 2 tygodnie, następnie co miesiąc. W razie konieczności stosowano kolejne naświetlania w odstępach miesięcznych, łącznie do 3 naświetlań. Osoby, u których nie stwierdzono poprawy po 2 naświetlaniach zostały skierowane do leczenia metodą alternatywną. Wdrożona metoda charakteryzuje się brakiem działań ubocznych, jedynie w pojedynczych przypadkach w obrębie naświetlanych zmian, przez kilka dni utrzymywał się nieznaczny stan zapalny i obrzęk. Ustępowanie zmian bez defektów kosmetycznych jest szczególnie cenne ze względu na częste ich umiejscowienie na twarzy, nosie, małżowinie usznej czy w przewodzie słuchowym zewnętrznym.

W trakcie rejestracji widm fluorescencji zauważono, że niektóre zaawansowane zmiany charakteryzują się silnymi pasmami charakterystycznymi dla porfiryn. Nagromadzone endogenne porfiryny nie wykazują jednak efektu fotodynamicznego, są to metaliczne kompleksy. Konieczne jest badanie tkanki przed aplikacją preparatu, aby wyeliminować wpływ metaloporfiryn, które blokują wydzielanie się protoporfiryny. Powstaje więc zaskakująca sytuacja – zaawansowany nowotwór z zaabsorbowaną endogenną porfiryń, nie dający się leczyć metodą fotodynamiczną. Podobne przypadki występowały w zaawansowanych nowotworach szyjki macicy. Charakterystykę emisyjną skóry pokazano na rys. 13.12 [38].

Ważnym wnioskiem z prowadzonych badań było wykazanie selektywnej biosyntezy PPIX w tkankach zmienionych chorobowo. W tym celu obrazy fluorescencyjne tych samych obszarów rejestrowano co 30 minut w czasie do 8 godzin, obserwując

jedynie zwiększanie poziomu fluorescencji w tym samym obszarze tkanki. Przykładowe obrazy fluorescencyjne tkanek przedstawiono na rys. 13.12 [47]. Charakterystyczne jest ujawnienie się w obrazie fluorescencyjnym tzw. satelitów. Zniszczenie tych niewidocznych miejsc innymi metodami gwarantuje całkowite wyleczenie i brak nawrotów. Dokładna analiza widma fluorescencji wykazuje różnice pomiędzy centrum nowotworu i jego granicą. W przypadku centrum pasmo emisyjne wydzielonej porfiryny położone jest na linii tła znacznie obniżonego w stosunku do zdrowej skóry. Na obrzeżu pasmo emisji tła dokładnie odpowiada charakterystyce tkanki zdrowej.



Rys. 13.12. Obrazy fluorescencyjne nowotworów podstawnocomórkowych skóry (BBC – Basal Cell Carcinoma) i widma emisji skóry pochodzącej od wprowadzonych fotouczulaczy egzogennych i endogennych porfiryn [38, 47]

Zaobserwowano również przypadki pojawiania się obszarów fluorescencji poza miejscami aplikacji, co świadczy o rozprzeczaniu preparatu przez krew. W ten sposób możliwości diagnostyczne metody znacznie się rozszerzają. Zaskakujące wyniki otrzymano w czasie leczenia trudno gojących się brodawek. Naświetlanie jednego miejsca powodowało również eliminację zmian chorobowych w innych obszarach, co świadczy, że metoda PDT nie działa jedynie miejscowo, przynajmniej w przypadku chorób pochodzenia wirusowego. Skuteczność metody ALA-PDT została potwierdzona w Klinice Dermatologii CSK WAM w Łodzi. Badania przeprowadzone z użyciem oświetlacza halogenowego wykazały 100% skuteczność w przypadku choroby Bowena, zrogowacenia słonecznego i 70% skuteczność – w przypadku BCC. Celem tych prac jest m.in. ocena dodatkowego wpływu światła podczerwonego na efekt fotodynamicznego niszczenia tkanek (proces synergizmu). Do naświetlania stosowany jest filtr czerwony, całkowicie wycinający zakres NIR i filtr pomarańczowy, transmitujący tę część promieniowania [48].

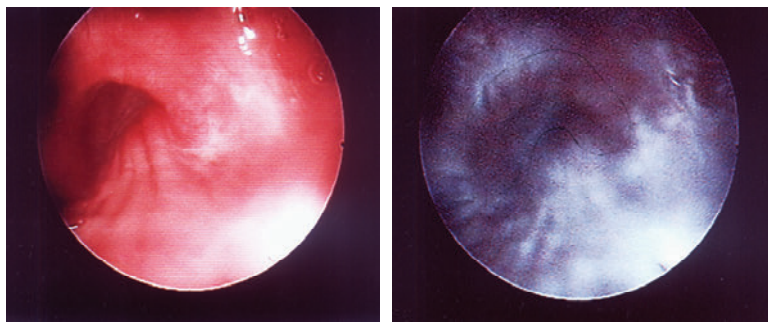
Następnymi ośrodkami, z którym podjęto współpracę w zakresie aplikacji metody jest Centrum Diagnostyki i Terapii Laserowej Politechniki Łódzkiej w Łodzi, gdzie badania dermatologiczne, ginekologiczne i urologiczne stanowią już standardową pozycję usług klinicznych oraz Ośrodek Diagnostyki i Terapii Laserowej, Śląskiej Akademii Medycznej [49].

13.4.2. Zastosowanie PDD w innych specjalnościach medycznych

Aparatura zbudowana na bazie elementów firmy Storz była testowana m.in. w Klinice Chirurgii Klatki Piersiowej AM w Lublinie, uzyskując pozytywną ocenę ze względu na możliwości diagnostyczne. W pierwszym etapie potwierdzono wpływ rodzaju tkanki na poziom natężenia fluorescencji, stosując analizator SUD-1 ze wzbudzeniem promieniowaniem o długości fali 442 nm [23].

Przeznaczeniem zbudowanego układu było wykrywanie podawanych egzogennych porfiryn, jak również analiza tkanek metodą autofluorescencji. Moc światła niebieskiego emitowanego przez lampę ksenonową wynosiła na wyjściu światłowodów około 250 mW, co oznacza, że można go stosować do naświetlania terapeutycznego obszaru płuc o powierzchni około 25 cm². Zmiany powierzchniowe w błonie śluzowej idealnie nadają się do leczenia tą metodą. Obok prostego wykrywania egzogennych porfiryn (około 40 przypadków podania preparatu do krwi), w latach 2001–2002 wykonano 398 zabiegów z wykorzystaniem metody autofluorescencji i 36 przypadków z wykorzystaniem metody PDD z użyciem kwasu 5-aminolewulinowego [23]. Podstawową zaletą metody autofluorescencji jest możliwość weryfikacji rozległości nacieków nowotworowych „pełnących” bezpośrednio podśluzówkowo. Umożliwia to wykonanie tzw. biopsji optycznej przed pobraniem materiału do badania histopatologicznego i ustalenie rozległości zabiegu chirurgicznego, a więc w wielu przypadkach chroni pacjenta przed niepotrzebną torakotomią. Na podstawie wykonanych biopsji optycznych wykluczono 48 chorych z planowanego leczenia operacyjnego. W 36 przypadkach udało się ustalić rozpoznanie histopatologiczne, co było niemożliwe w konwencjonalnej bronchoskopii. Na 398 przypadków u 52 chorych interpretacja badania AF była niemożliwa z powodu istniejącego, masywnego stanu zapalnego śluzówki drzewa oskrzelowego lub obecności krwi. Kolejnym aspektem wykorzystania tej metody do badania drzewa oskrzelowego jest ocena skuteczności tzw. chemioterapii indukcyjnej. Endoskopię wykonuje się przed i po 2 pełnych kursach cytostatyków i określenie rzeczywistej granicy resekcyjności w obrębie oskrzeli. Metoda AF umożliwia również znalezienie optymalnego miejsca do pobrania wycinków, jeżeli w świetle białym nie można stwierdzić nacieku podśluzówkowego w drzewie oskrzelowym. Przykład obrazowania metodą AF pokazano na rys. 13.13.

Metoda oparta na wykorzystaniu ALA stwarza szerokie możliwości diagnostyczne. Sposób podawania preparatu polegał na inhalacji roztworu 400 mg ALA w 100 ml wody umieszczonego w specjalnym inhalatorze dozującym aerozol do płuc pod ciśnieniem. W wyniku biosyntezy PPIX w obszarach nowotworów uzyskuje się wyraźne różnice w świeceniu tkanek zdrowych i chorych.



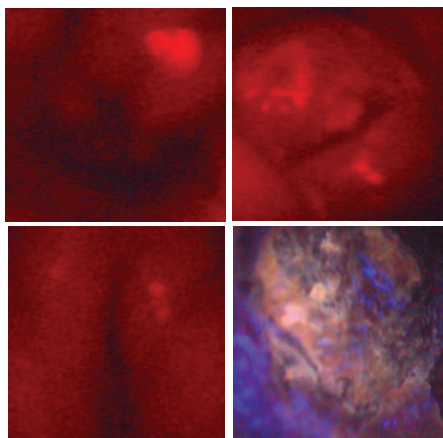
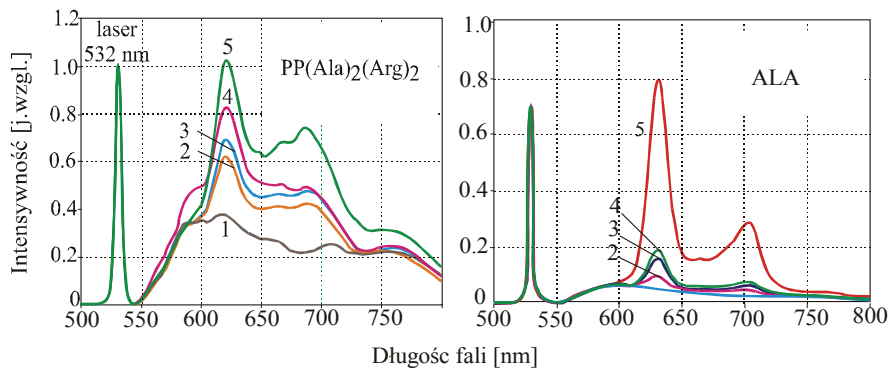
Rys. 13.13. Przykład obrazowania tradycyjną metodą bronchoskopii (lewy obraz) i PDD z wykorzystaniem ALA (po prawej)

Metodę PDD opartą na miejscowym podaniu fotouczulaczy stosuje się w Katedrze i Klinice Położnictwa i Ginekologii II Wydziału Lekarskiego AM w Warszawie w diagnostyce zmian przednowotworowych i nowotworowych szyjki macicy i sromu. Na podstawie badań 153 pacjentek (124 przypadki patologii szyjki macicy i 29 sromu) [50, 51] okazało się, że metoda ta pozwala dokładniej zdiagnozować zmiany niż ma to miejsce przy zastosowaniu tradycyjnych metod diagnostycznych. Do diagnostyki stosowano krem PHOTOACID (zawartość ALA-15%), który nakładano na analizowane miejsca i po 2 godzinach rejestrowano obrazy układem GIN-1. Porównanie widm emisji obszarów zmienionych nowotworowo i przykładowe obrazy fluorescencyjne pokazano na rys. 13.14.

Nowym obszarem zastosowań ALA-PDD jest okulistyka. Wyniki badań prowadzone na wirusach HSV1 namnożonych w hodowli komórkowej nabłonka rogówki wskazywały na możliwość wykorzystania metody ALA-PDT jako terapii uzupełniającej [52]. Zakażenia wirusowe oczu stanowią istotny problem kliniczny i terapeutyczny. Znaczną rolę odgrywiają zakażenia wirusami opryszczki - *Herpes simplex*. W prowadzonych badaniach leczeniu poddano 10 pacjentów z przewlekłym wirusowym zapaleniem rogówki i 5 z owrzodzeniami troficznymi rogówki [52, 53].

U wszystkich badanych osób, pomimo zastosowanego wcześniej leczenia zachowawczego, nie uzyskano całkowitego wygojenia rogówki. W leczeniu metodą PDT wykorzystano preparat PHOTOACID, który w postaci małego wałeczka z kremu zakładano do worka spojówkowego chorego oka.

Po 2 godzinach rogówkę naświetlano laserem He-Ne o mocy 25 mW do czasu rozłożenia się całej podanej PPIX. Procedurę leczniczą powtarzano po 7–14 dniach w zależności od stopnia gojenia się ubytków. Klinicznie, bezpośrednio po leczeniu, obserwowano znaczne zadrażnienie spojówek i brzegów powiek, oraz w większości przypadków delikatny obrzęk rogówki w miejscu zmian. Objawy te ustępowały po 24 godzinach, a stopniowy proces gojenia następował po 2 sesjach leczniczych w przypadku drobnych ubytków i 5–6 w przypadku rozległych owrzodzeń. Terapia była dobrze tolerowana przez wszystkich pacjentów.



Rys. 13.14. Przykłady widm fluorescencyjnych i przykładowe obrazy fluorescencyjne w badaniach ginekologicznych: 1 – przed podaniem miejscowym $PP(Ala)_2(Arg)_2$ i ALA, 2, 3, 4, 5 – dwie godziny po podaniu $PP(Ala)_2(Arg)_2$ i ALA w różnych miejscach szyjki macicy

Podane przykłady są ilustracją niektórych możliwości klinicznego zastosowania medycyny fotodynamicznej.

Literatura

- [1] KONIG K., TESCHKE M., EICK S., PFISTER W., MEYER H., HALBHUBER K.-J., *Photodynamically inactivation of Propionibacterium acnes*, Proc. SPIE, 1994, Vol. 3274, 106–110.
- [2] DEMCZENKO A.P., *Ultrafiolet spectroscopy of proteins*, Springer-Verlag, New York 1981.
- [3] KWON O.S., BLAZQUES M., CHURCHICH J.E., *Luminescence spectroscopy of pyridoxic acid and pyridoxic amid bund to protein*, Eur. J. Biochem., 1994, Vol. 219, 807–812.
- [4] KĄCZKOWSKI J., *Podstawy biochemii*, PWN, Warszawa 1996.
- [5] LORENTE C., CAPPARELLI A.L., THOMAS A.H, BRAUN A., OLIVEROS E., *Quenching of the fluorescence of pterin derivatives by anions*, Photochemical & Photobiological Sciences, 2004, Vol. 3, 167–173.

- [6] BLAKELY R.L., *The chemistry of folic acid and related pteridines*, Wiley Intersciences, New York 1969.
- [7] WOLBEIS O.S., *The fluorescence of Organic Natural Products*, [w:] *Molecular Luminescence Spectroscopy*, ed. S.G. Schulman, John Wiley & Sons, New York 1985, part 1, 167–370.
- [8] ANDERSSON-ENGELS S., JOHANSSON J., SVANBERG K., SVANBERG S., Fluorescence imaging and point S. measurements of tissue: applications to the demarcation of malignant tumors and atherosclerotic lesion from normal tissue, *Photochem. Photobiol.*, 1991, Vol. 53, 807–814.
- [9] KWAŚNY M., MIERCZYK Z., *Zastosowanie fluorymetrycznych metod analizy w diagnostyce wczesnych faz nowotworów*, [w:] *Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów* pod red. A. Graczykovej, Bellona, Warszawa 1999, 300–331.
- [10] KWAŚNY M., MIERCZYK Z., *Fluorimetric analysis for neoplasms diagnostics and localization*, *Proc. SPIE*, 1997, Vol. 3188, 36–47.
- [11] LAM S., MCAULAY C., HUNG J. et al., *Detection of dysplasia and carcinoma in situ by a lung imaging fluorescence endoscope (LIFE) device*, *Laser Surg. Med.*, 1992, Vol. 4, 40.
- [12] LAM S., HUNG J., PALCIC B., *Detection of lung cancer by ratio fluorometry with and without Photofrin II*, *Proc. SPIE*, 1990, Vol. 1201, 561–568.
- [13] HUNG J., LAM S., LERICHE J., PALCIC B., *Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue*, *Lasers Surg. Med.*, 1991, Vol. 11, 99–105.
- [14] SIEROŃ A., ADAMEK M., *Nowe oblicze światłolecznictwa- diagnostyka fluorescencyjna i fotochemioterapia*, cz. I. *Chir. Pol.*, 1999, Vol. 1, No. 2, 91–99, cz. II, 1999, Vol. 1, 169–179.
- [15] SIEROŃ A., CIEŚLAR G., ADAMEK M., LAITL-KOBIERSKA A., SZYGUŁA M., KAWCZYK-KRUPKA A., *Zarys fotodynamicznej diagnostyki i terapii nowotworów*, Alpha-Medica Press, Katowice 1997.
- [16] ADAMCZYK J., SIEROŃ A., BINISZKIEWICZ T., *Nowe możliwości analizy cyfrowej w diagnostyce laserowej*, [w:] *Diagnostyka i Terapia Fotodynamiczna*, red. H. Podbielska, A. Sieroń, W. Stręk, Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2004, 217–224.
- [17] ZIELEŻNIK W., SIEROŃ A., CEBUŁA W., ADAMEK M., PODWIŃSKA E., *Terapia fotodynamiczna w gastroenterologii*, *Chirurgia Polska*, 1999, Vol. 6, 57–61.
- [18] KWAŚNY M., MIELCZAREK A., WŁODARSKI M., *Zastosowanie metody laserowo wzbudzonej fluorescencji w diagnostyce próchnicy zębów*, *Acta Bio-Optica et Informatica Medica*, 2002, Vol. 8, 193–200.
- [19] GOUJON D., ZELLWEGER M., VAN DEN BERGH H., WAGNIERES G., *Autofluorescence imaging in the tracheo-bronchial tree*, *Photodynamic News*, 2000, Vol. 3, 11–14.
- [20] HAYATA Y., KATO H., KONAKA C., OKUNAKA T., *Photodynamic therapy in early stage cancer*, *Lung Cancer*, 1993, Vol. 9, 287–294.
- [21] NAGAMOTO N., SAITO Y., IAMI T. et al., *Roentgenographically occult squamous cell carcinoma: location in the bronchi, depth of invasion and length of axial involvement of the bronchus*, *Tohoku J. Exp. Med.*, 1986, Vol. 148, 241–256.
- [22] CHWIROT B.W., CHWIROT St., *Piętnaście lat badań nad zastosowaniem autofluorescencji komórek i tkanek do wykrywania zmian przednowotworowych i nowotworów u człowieka*, [w:] *Diagnostyka i Terapia Fotodynamiczna*, red. H. Podbielska, A. Sieroń, W. Stręk, Wydawnictwo medyczne Urban & Partner, Wrocław 2004, 103–116.
- [23] JABŁONKA A., JABŁONKA J., KWAŚNY M., *Próba oceny przydatności, zastosowania metody fotodynamicznej w rozpoznawaniu i leczeniu zmian nowotworowych układu oddechowego*, *Materiały XIX Krajowej Szkoły Optoelektroniki „Współczesna optoelektronika w medycynie”*, Sopot 2005, 138–150.
- [24] GLASSMAN W., LIU C.H., TANG G.C., LUBICZ S., ALFANO R.R., *Ultraviolet excited fluorescence spectra from non-malignant tissues of the gynecological tract*, *Laser Life Sci.*, 1992, Vol. 5, 49–58.

- [25] YANG Y., FE Y., LI F., MA B., *Characteristic autofluorescence for cancer diagnosis and its origin*, Laser Surg. Med., 1987, Vol. 7, 528–532.
- [26] KONIG J., HEMMER K., SCHECKENBURGER H., *Laser induced autofluorescence of squamous cell carcinoma*, [w:] *Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers*, Excerpta Medica, 1992, 903–906.
- [27] CEBULSKI G., PODBIELSKA H., *Zbadanie możliwości diagnostyki w świetle spolaryzowanym do oceny zmian pigmentowych skóry ludzkiej*, Acta-Bio-Optica et Informatica Medica, 2005, Vol. 11, No. 1–2, 1–11.
- [28] ASAWANODA P., TAYLOR R.C., *Woods light in dermatology*, Int. J. Dermatol., 1999, Vol. 38, 801–807.
- [29] POTTER W.R., MANG T.S., [w:] *Porphyrin irradiation and treatment of tumors*, red. D.R. Doiron, C.J. Gomer, New York, Alain Lise 1984, 177–186.
- [30] KATO H., IMAIZUMI T., AIZAWA K., IWABUCHI K. et al., *Photodynamic diagnosis in respiratory tract malignancy using an excimer dye laser system*, J. Photochem. Photobiol. B., 1990, Vol. 6, 189–196.
- [31] ANDERSSON-ENGELS S., JOHANSSON J., SVANBERG S., *A multi color imaging system for tissue diagnostics*, Proc. SPIE, 1990, Vol. 1205, 179–189.
- [32] STEPP H., BAUMGARTNER R., BEYER W., KNICHEL R., RICK K., STEINBACH P., STEPP H.G., KRIEGMAIR M., *Bladder tissue diagnostics utilizing Protoporphyrin IX fluorescence detection*, Proc. SPIE, 1995, Vol. 2324, 20–31.
- [33] CUBBEDU R., CANTI G., TARONI P., VALENTINI G., *Time - gated fluorescence imaging for the diagnosis of tumors in a murine tumor model*, Potodynamic therapy and biomedical lasers, Excerpta medica, 1992, 882–892.
- [34] BEDNARKIEWICZ A., STREK W., SIERON A., JARONSKI J., LICZNERSKI T., ZALEWSKI I.D., *System fotodynamicznej detekcji nowotworów*, [w:] *Diagnostyka i Terapia Fotodynamiczna*, red. H. Podbielska, A. Sieroń, W. Stręk, Wydawnictwo medyczne Urban & Partner, Wrocław 2004, 209–216.
- [35] ANDERSSON-ENGELS S., ELNER A., JOHANSSON J., KARLSSON S.-E., SALFORD L.G., STROMBLAD G., SVANBERG K., SVANBERG S., *Clinical recordings of laser-induced fluorescence spectra for evaluation of tumor demarcation feasibility in selected clinical specialities*, Lasers Med. Sci., 1991, Vol. 6, 415–24.
- [36] LOSCHENOV V.B., STEINER R., *Working out the early diagnostic and control for the cancer method with the use of photosensitizer of modeling action*, Proc. SPIE, 1994, Vol. 2325, 144–148.
- [37] KWAŚNY M., MIERCZYK Z., *Fluorometric measuring system for tumors diagnosis*, Proc. SPIE, 1999, Vol. 4018, 118–129.
- [38] KWAŚNY M., MIERCZYK Z., *Laser fluorescence spectrometers for medical diagnosis*, Proc. SPIE, 2000, Vol. 4238, 69–79.
- [39] KWAŚNY M., MIERCZYK Z., *Fluorometric analysis for neoplasms diagnostics and localization*, Proc. SPIE, 1997, Vol. 3188, 36–47.
- [40] KWAŚNY M., *Metody optoelektroniczne w diagnostyce i terapii medycznej*, Materiały Symposium Optoelektronika 2001, cz. 1, Warszawa 2001, 75–82.
- [41] GRACZYK A., KWAŚNY M., MIERCZYK Z., *Zastosowania laserów w medycynie ze szczególnym uwzględnieniem chorób nowotworowych*, Postępy Fizyki, 2000, Vol. 51, 6–12.
- [42] KWAŚNY M., MIERCZYK Z., *Fluorymetryczne układy pomiarowe do diagnostyki nowotworów*, Biul. WAT, 1999, Vol. 2, 48–63.
- [43] KWAŚNY M., MIERCZYK Z., *Devices for medical diagnosis with GaN lasers*, Proc. SPIE, 2003, Vol. 5229, 104–115.
- [44] STEĆ M., SZYMAŃCZYK J., DOMANIECKI J., KWAŚNY M., MIERCZYK Z., TOMCZAK M., *Zastosowanie kwasu 5-aminolewulinowego w fotodynamicznym leczeniu powierzchniowych nabłonaków podstawnokomórkowych skóry*, Współczesna Onkologia, 1999, Vol. 2, 76–79.

- [45] ZABIELSKI S., BACZ-MALINOWSKA M., MALEWICZ J., PIĄTKOWSKA A., KWAŚNY M., *Wstępna ocena leczenia metodą fotodynamiczną chorób przednowotworowych i nowotworowych skóry*, Materiały XXVII Zjazdu Polskiego Towarzystwa Dermatologicznego, Wrocław 2001, 177.
- [46] ZABIELSKI S., MIERCZYK Z., KWAŚNY M., MALEWICZ J., KUROWSKA-MADEJSKA Z., *Zastosowanie kwasu 5-aminolewulinowego w diagnostyce i leczeniu wybranych chorób skóry*, 35 Konferencja Szkoleniowo-Naukowa Konferencja Dermatologów Wojska Polskiego, Jurata, 15–17 VI 2000.
- [47] MIERCZYK Z., KWAŚNY M., *Systemy laserowe do diagnostyki i terapii nowotworów metodą fotodynamiczną*, [w:] *Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i leczenia nowotworów*, red. A. Graczyk, Bellona, Warszawa 1999, 244–299.
- [48] KASZUBA A., PACHOLCZYK G., KWAŚNY M., *Results of treatment of precancerous conditions and basal cell carcinoma of skin with photodynamic method with the use of red and orange filter*, 12 Congres EADU, Barcelona, 15–18 X 2003.
- [49] CHLEBDA M., SIEROŃ A., ADAMEK M., KWAŚNY M., DRZAZGA Z., KAWCZYK-KRUPKA A., *Zastosowanie spektroskopii fluorescencyjnej w diagnostyce i terapii fotodynamicznej pacjentów ze zmianami nowotworowymi skóry*, Acta Bio-Optica et Informatica Medica, 2002, Vol. 8, 29–34.
- [50] NOWAKOWSKI Z., *Metoda fotodynamiczna w diagnostyce zmian nowotworowych na szyjce macicy i sromie*, Zwalczenie Nowotworów, 2002, Vol. 1, 256.
- [51] NOWAKOWSKI Z., STELMAHÓW J., ŚPIEWANKIEWICZ B., GERULEWICZ G., KWAŚNY M., *Diagnostic value of the photodynamic method in the evaluation of lesions of the uterine cervix*, Eur. J. Gynaec. Oncol., 2005, Vol. XXVI, No. 3, 315–322.
- [52] KOBUS A., KAWECKI D., ŚWITKA-WIĘCŁAWSKA I., KĘCIK T., GRACZYK A., ŁUCZAK M., *Wpływ aktywowanej światłem laserowym pochodnej hematoporfiryny na przebieg doświadczalnego zakażenia wirusami opryszczki komórek nabłonka rogówki*, XL Jubileuszowy naukowy Zjazd Okuliistów Polskich, Warszawa 2001.
- [53] ŚWITKA-WIĘCŁAWSKA I., KĘCIK T., KWAŚNY M., GRACZYK A., *Photodynamic therapy (ALA-PDT) in the treatment of pathological states of the cornea*, Proc. SPIE, 2003, Vol. 5229, 82–86.

ROZDZIAŁ 14
ZASTOSOWANIE
WYBRANYCH METOD OPTYCZNYCH
W PRAKTYCE STOMATOLOGICZNEJ

Agnieszka Mielczarek, Mirosław Kwaśny

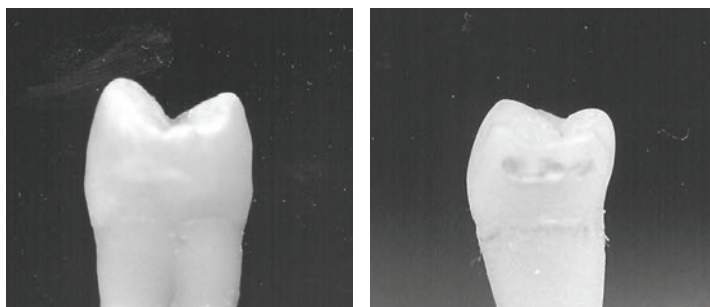
Spis treści	
14.1. Wstęp	357
14.2. Zjawiska optyczne w tkankach zęba	359
14.3. Wybrane optyczne metody diagnostyczne stosowane w stomatologii	359
14.3.1. Radiografia cyfrowa	359
14.3.2. Metoda DIFOTI	362
14.3.3. Polaryzacyjna koherentna tomografia optyczna (PS-OTC)	362
14.3.4. Metody laserowo wzbudzonej fluorescencji	363
14.3.4.1. System QLF	364
14.3.4.2. System DIAGNOdent	370
14.3.5. Metody optyczne aktywujące proces wybielania zębów	371
14.4. Podsumowanie	372

14.1. Wstęp

Badania zjawisk optycznych zachodzących w materiale biologicznym pod wpływem promieniowania świetlnego są często wykorzystywane do oceny budowy strukturalnej tkanek i stanowią podstawę wielu metod diagnostycznych stosowanych w medycynie. Dokładna analiza struktury tkanek zęba pozwala poznać procesy fizjologiczne i patologiczne, jakie zachodzą w środowisku jamy ustnej.

Próchnica jest jednym z najczęstszych schorzeń, z którymi pacjenci zgłaszają się do gabinetu stomatologicznego. Pierwszym objawem toczącej się choroby próchnicowej, który możemy zaobserwować jest stadium próchnicy początkowej tzw. *białej plamy*. Charakteryzuje się ono występowaniem na powierzchni zębów białawych, opalizują-

cych plam na niezmienionym podłożu tkanki. Zmiany typu *biała plama* mają związek z występowaniem zwiększonej mikroporowatości szkliwa (patrz rys. 14.1).



Rys. 14.1. Widok zębów z wczesnymi zmianami próchnicowymi typu *biała plama*

Osuszenie powierzchni zęba w przypadku istniejącej próchnicy początkowej powoduje eliminację wody z powiększonych, porowatych struktur szkliwa i wypełnienie ich powietrzem. Stosunek wartości współczynnika załamania światła powietrza i szkliwa jest większy niż wody i szkliwa, stąd zmiana próchnicowa staje się bardziej widoczna po osuszeniu obserwowanej powierzchni [1]. Monitorowanie plam bez przerywania ciągłości szkliwa daje szansę wdrożenia nieinwazyjnych metod leczenia bez konieczności stosowania generującej wysokie koszty terapii odtwórczej. Wczesne wykrywanie zmian strukturalnych szkliwa jest więc kluczowym problemem kariologii (dotyczy próchnicy). W praktyce stomatologicznej stosuje się wiele konwencjonalnych metod diagnostycznych, w tym ocenę wizualną, badanie konsystencji zmiany czy klasyczną rentgenodiagnostykę. Skuteczność diagnostyczna większości tradycyjnych metod klinicznych jest wciąż niezadowalająca. Dlatego też w ostatnich latach prowadzone są intensywne badania nad rozwojem optycznych metod diagnostycznych w stomatologii. Budowa nowoczesnych systemów oparta jest na ocenie zjawisk fizycznych obserwowanych w wyniku interakcji fali świetlnej z tkankami zęba. Optyczne metody diagnostyczne, które cieszą się szczególnym zainteresowaniem zespołów badawczych zestawiono w tab. 1.

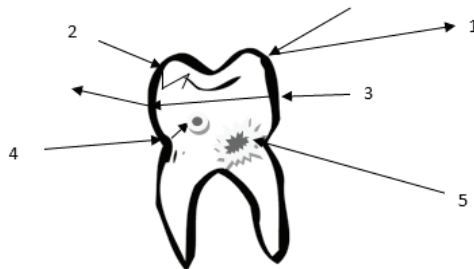
Tabela 1. Optyczne metody diagnostyki stomatologicznej

Metoda	Nazwa w języku angielskim
Radiowizjografia cyfrowa	RVG <i>radiovisiography</i>
Cyfrowa transiluminacja światłowodowa	DIFOTI <i>Digital Imaging Fiberoptic Transillumination</i>
Tomografia Optyczna	OCT <i>Optical Coherent Tomography</i>
Spolaryzowana Spektroskopia Ramanowska	PRS <i>Polorized Rama Spectroscopy</i>
Indukowana Fluorescencja	QLF <i>Quantitative Light-induced Fluorescence</i>
Transiluminacja podczerwieni	IR <i>transillumination</i>

14.2. Zjawiska optyczne w tkankach zęba

Diagnostyczne metody optyczne opierają się więc na ocenie interakcji światła z tkankami. Promień świetlny, padając na twarde tkanki zęba, może ulec odbiciu, rozproszeniu, transmisji przez struktury zęba lub absorpcji. Pochłonięta energia fotonów przekształcana jest np. na energię ciepłą lub powoduje indukowaną fluorescencję. Większość dotychczasowych badań wskazuje, że poziom natężenia fluorescencji w warunkach *in vivo* szkliwa zmienionego jest niższy w porównaniu do szkliwa zdrowego. Ta prawidłowość występuje jednak pod warunkiem, że promieniowanie wzbudzające emisję czystego hydroksyapatytu nie powoduje jednocześnie wzbudzenia innych domieszek fluoroforów organicznych. Efekt spadku fluorescencji spowodowany jest głównie rozproszeniem światła wzbudzenia i emisji na uszkodzonych powierzchniach hydroksapatytu. Współczynnik rozproszenia światła na szkliwie odwapnionym jest 5–10 razy większy niż na prawidłowym.

Oprócz zmniejszenia natężenia fluorescencji, zmienia się też kształt widma, którego maksimum przesunięte zostaje w stronę czerwieni w przypadku szkliwa próchnicowego [2]. Schemat interakcji zachodzących w tkankach zęba pod wpływem światła zobrazowano na rys. 14.2.



Rys. 14.2. Interakcje światła z tkankami zęba:

1 – odbicie, 2 – rozproszenie, 3 – transmisja, 4 – absorpcja, 5 – absorpcja i indukowana fluorescencja

14.3. Wybrane optyczne metody diagnostyczne stosowane w stomatologii

14.3.1. Radiografia cyfrowa

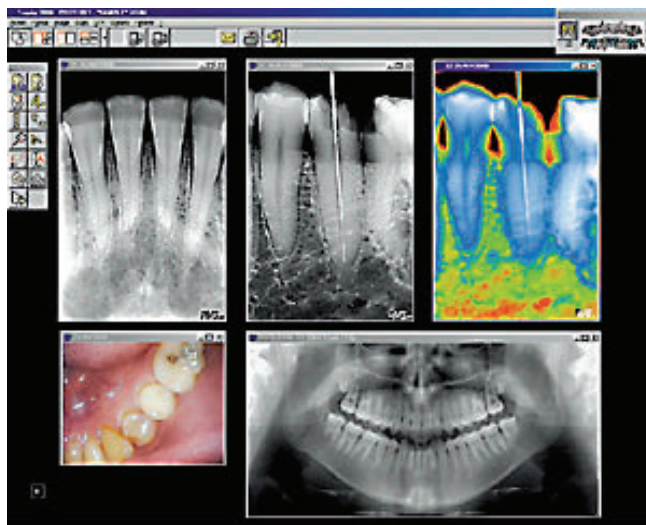
Trudności związane z właściwą oceną klasycznych zdjęć RTG zmusiły do szukania nowych rozwiązań technologicznych. Istotnym czynnikiem umożliwiającym właściwą, powtarzalną ocenę radiologiczną badanych powierzchni jest standaryzacja warunków

ków projekcji i ograniczenie szkodliwego wpływu promieni RTG na organizm pacjenta [3]. Rozwiązaniem tego problemu wydaje się być zastosowanie nowoczesnej metody radiologicznej – radiografii cyfrowej (RVG). Metoda ta pozwala na cyfrowy zapis obrazu. W radiografii cyfrowej zamiast filmów rentgenowskich stosuje się elektroniczne elementy rejestrujące. Układ posiada źródło promieniowania rentgenowskiego RTG oraz komputer PC z monitorem, który umożliwia zapis, obróbkę i wyświetlenie obrazu. Do obróbki i zapamiętywania zdjęć niezbędne jest specjalistyczne oprogramowanie. Obraz cyfrowy jest tu obrazem 10-bitowym. Dzięki temu możemy uzyskać 1024 poziomów szarości [2¹⁰]. Obraz prezentowany na monitorze jest 8-bitowy, a więc posiada 256 poziomów szarości [2⁸]. W obrazie cyfrowym każdy piksel może osiągnąć każdą wartość szarości od 0 do 255. Wartość poziomu szarości odpowiada pochłoniętemu promieniowaniu rentgenowskiemu, przy czym wartość 0 to kolor czarny, a 255 – biały.

Obecnie wyróżnić można dwa rodzaje systemów radiografii cyfrowej:

- systemy bezpośrednie z zastosowaniem półprzewodnika krzemowego,
- systemy pośrednie z zastosowaniem fosforu magnetyzującego.

W systemach bezpośrednich stosujemy urządzenia CCD (ang. *charge coupled device*). Umieszczony w sztywnej saszetce czujnik łączy się z komputerem za pomocą przewodu lub funkcjonuje jako układ bezprzewodowy. Ekran czujnika spełnia funkcję detektora promieni X. Wytworzony sygnał świetlny wysyłany jest przez układ optyczny lub światłowód z czujnika do urządzenia CCD. Tam sygnały analogowe zostają zamienione na sygnały cyfrowe i możliwa jest rejestracja obrazu cyfrowego. Na rysunku 14.3 przedstawiono przykładowe obrazy RVG.



Rys. 14.3. Wybrane możliwości obrazowania przy użyciu systemu radiowizjografii

W systemach pośrednich czujnik został zastąpiony płytką pokrytą fosforem (ang. *PS – photostimulable phosphor*). Płytki są produkowane w różnych rozmiarach, podobnie jak błony radiologiczne. Niezaprzeczalną zaletą tego systemu jest to, że płytki nie wymagają bezpośredniego połączenia z komputerem i nie muszą być połączone z lampą rentgenowską. Ułatwia to znacznie wprowadzenie i prawidłowe ustawienie sensora w jamie ustnej pacjenta. W systemie DIGORA płytka po wykonaniu zdjęcia zostaje umieszczona w skanerze laserowym. Następnie w fotodetektorze następuje zamiana sygnału analogowego na cyfrowy. Obrazy powstałe w systemie DIGORA mają większy format niż powstałe z czujników CCD. Wadą tej metody jest brak natychmiastowej wizualizacji obrazu i konieczność użycia skanera.

Radiografia cyfrowa posiada wiele zalet i podlega ciągłym udoskonaleniom. Rozszerzane są możliwości obrazowania, a także interpretacji wykonanych zdjęć. Do niezaprzeczalnych zalet należą:

- możliwość zmiany kontrastu i wysycenia,
- możliwość obrotu zdjęcia,
- funkcja pozytyw–negatyw,
- funkcja *false color*,
- możliwość pomiaru gęstości optycznej tkanek zęba (*funkcja densytometryczna*),
- funkcja tomosyntezy,
- możliwość pomiaru odległości po liniach prostych i zakrzywionych,
- możliwość projekcji trójwymiarowych.

Aby ułatwić ocenę obrazów radiografii cyfrowej, można stosować wzmocnienie kontrastowe, powiększenie, zmniejszenie lub kadrowanie obrazu, wzmocnienie brzeżne oraz, co ma szczególne znaczenie w badaniu powierzchni stycznych, pomiar gęstości optycznej. Zdjęcia skrzydłowo-zgryzowe wykonane techniką radiografii cyfrowej stanowią obecnie podstawę oceny powierzchni stycznych. We wszystkich jednak badaniach na uwagę zasługuje fakt wysokiej skuteczności badania radiologicznego w ocenie zmian próchnicowych sięgających zębiny, a znacznie mniejszy w odniesieniu do wczesnych zmian próchnicowych.

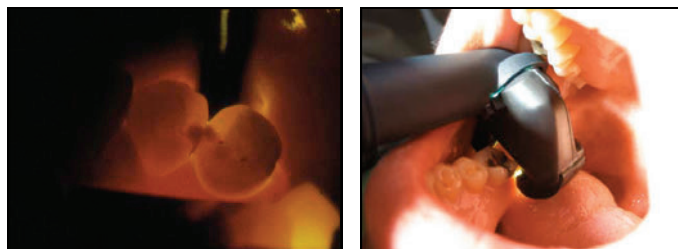
Ponadto radiografia cyfrowa umożliwia archiwizację zarejestrowanych obrazów, co jest bardzo ważnym elementem diagnostyki, umożliwiającym obserwację i porównywanie zmian na różnych etapach rozwoju zmiany próchnicowej. RVG pozwala również wyeliminować błędy wynikające z nieprawidłowej obróbki filmu w ciemni. Niedoskonałe zdjęcia można retuszować za pomocą różnych funkcji [4].

Szukając możliwości skuteczniejszej oceny wczesnych zmian próchnicowych opracowano program komputerowy LCD (ang. *Logicon Caries Detector software*) [5]. Program ten służy do analizy obrazu rentgenowskiego i może ułatwić interpretację obrazów powierzchni stycznych.

14.3.2. Metoda DIFOTI

Metoda transiluminacji – DIFOTI (ang. *Digital Imaging Fiberoptic Transillumination*) jest z powodzeniem stosowana przez lekarzy, często intuicyjnie, do badania zmian próchnicowych na powierzchniach stycznych zębów przednich. Technika ta opiera się na wykorzystaniu optycznych metod odbiciowych. Wiązka światła pochodząca z lampy stomatologicznej, odbijająca się od lusterka stomatologicznego wchodzi w interakcję z tkankami zęba. Obecność ubytku próchnicowego powoduje wzrost transmisji światła w głąb tkanek, część światła ulega rozproszeniu, co widoczne jest w postaci zacienienia. Wielkość i natężenie cienia decyduje o stopniu zaawansowania zmiany próchnicowej, czyli o stopniu demineralizacji tkanki. Stosowanie źródeł światła o większej mocy umożliwi również badanie zębów bocznych. Źródło światła umieszcza się na powierzchni policzkowej, a lusterko stomatologiczne na powierzchni językowej obserwowanego zęba.

Na tej zasadzie działa system DIFOTI, który dzięki umieszczeniu kamery w końcówce światłowodu umożliwia rejestrację i komputerowe przetworzenie obrazu obserwowanej powierzchni zęba [6]. Kolejne modyfikacje urządzeń polegające na zastosowaniu wielopunktowych źródeł światła umożliwiły również obserwacje powierzchni stycznych zębów bocznych. System nie jest jednak wyposażony w program komputerowy pozwalający na ilościową ocenę obserwowanych zmian. Otrzymany obraz jest subiektywnie analizowany przez lekarza. Możliwość rejestracji obrazu pozwala jednak na porównanie kolejnych zdjęć i monitorowanie badanej powierzchni zęba w czasie. Metoda DIFOTI jest szczególnie zalecana do obserwacji i monitorowania stanu powierzchni stycznych [7]. Przykładowe obrazy zarejestrowane za pomocą systemu DIFOTI pokazano na rys. 14.4.



Rys. 14.4. System DIFOTI: widok końcówki światłowodowej i obraz zarejestrowany metodą transiluminacji

14.3.3. Polaryzacyjna koherentna tomografia optyczna (*PS-OCT*)

Polaryzacyjna koherentna tomografia optyczna (ang. *PS-OCT Polarization-Sensitive Optical Coherence Tomography*) jest nowym nieinwazyjnym sposobem badania tkanek

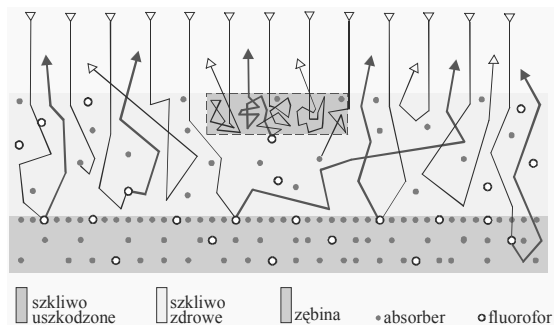
biologicznych. Metoda jest nieinwazyjna i nie naraża pacjenta na szkodliwe promieniowanie jonizujące. W układzie badawczym jako źródło światła wykorzystywana jest dioda superluminescencyjna (SLD) [8]. Emitowana przez diodę wiązka światła przechodzi przez polaryzator, prowadząc do powstania liniowo spolaryzowanego światła o mocy 7,5 mW. Rozszczepiony promień, odbity od badanej tkanki przechodzi przez polaryzator, a następnie dociera do detektorów. Dzięki badaniu możemy określić głębokość badanej warstwy, a także ewentualne nierówności na jej powierzchni. Warto podkreślić, iż metoda pozwala na ocenę różnych tkanek. Dzięki zastosowaniu PS-OCT otrzymujemy dwu- lub trójwymiarowe obrazy tkanek biologicznych. Przekrojowe obrazy pokazują natężenie i stan polaryzacji wstecznie rozproszonego przez tkankę światła. Pomiarów dokonuje się w trakcie skanowania osiowego. Każde zdjęcie składa się z 240 osiowych skanów wykonywanych co 50 μm . Każdy skan wykonywany jest z prędkością 5 sekund, co pozwala na uzyskanie obrazu o wymiarach 4,5 mm na 12 mm w czasie 48 sekund.

Opisywana metoda znalazła zastosowanie w wielu dziedzinach medycyny, między innymi w okulistyce, chirurgii naczyniowej i kardiologii. W stomatologii system PS-OCT umożliwia postawienie prawidłowej diagnozy, wykrycie ognisk próchnicy i innych chorób np. przyzębia, ocenę stanu remineralizacji tkanek twardych zęba, ocenę jakości uzupełnień protetycznych, a także określenie poziomu osteointegracji implantów z tkanką kostną. PS-OCT jest skuteczną metodą zarówno do wykrywania zmian na powierzchniach gładkich, jak i w bruzdach i szczelinach powierzchni zgryzowych. Pozwala na określenie stopnia demineralizacji i monitorowanie postępu zmian w czasie. PS-OCT to technika dokładna i nowoczesna, która podlega ciągłym udoskonaleniom. Jak dotąd nie jest powszechnie stosowana w praktyce klinicznej.

14.3.4. Metody laserowo wzbudzonej fluorescencji

Metoda ilościowej fluorescencji wzbudzonej laserowo (ang. LIF *Laser Induced Fluorescence*) stanowi nową diagnostyczną technikę przeznaczoną do oceny próchnicy szkliwa i badania zmian demineralizacyjnych w przebiegu początkowych uszkodzeń twardych tkanek zęba. Metoda może być również wykorzystana do wykrywania złogów kamienia i płytki bakteryjnej.

Większość dotychczasowych badań wskazuje, iż poziom natężenia fluorescencji szkliwa zmienionego w warunkach *in vivo* jest niższy niż szkliwa prawidłowego. Ta prawidłowość występuje jednak pod warunkiem, że promieniowanie wzbudzające emisję czystego hydroksyapatytu nie powoduje jednocześnie wzbudzenia innych domieszek fluoroforów organicznych. Efekt spadku fluorescencji spowodowany jest głównie rozproszeniem światła wzbudzenia i emisji na uszkodzonych powierzchniach hydroksapatytu (patrz rys. 14.5) [9].



Rys. 14.5. Schematyczne przedstawienie fluorescencji plam próchnicowych szkliwa

Współczynnik rozproszenia światła na szkliwie odwapnionym jest 5 do 10 razy większy niż na nieodwapnionym. Z powodu krótszej drogi optycznej prawdopodobieństwo wzbudzenia fluoroforów zmniejsza się. Obok spadku natężenia emisji fluorescencji, zmienia się również kształt widma, którego maksimum przesunięte zostaje w stronę czerwieni w przypadku szkliwa próchnicowego.

14.3.4.1. System QLF

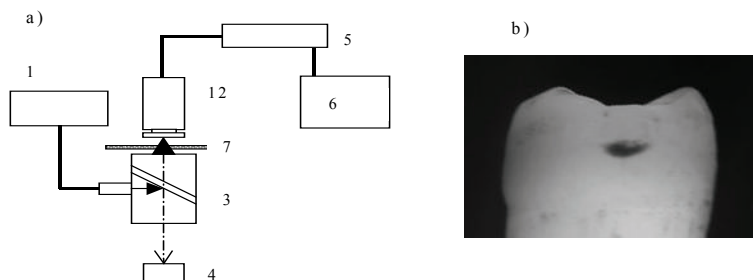
Metoda ilościowej laserowej fluorescencji (ang. QLF – *Quantitative Laser Induced Fluorescence*) jest optyczną techniką oceny stopnia de- i remineralizacji tkanek zęba. Pierwsze badania metodą QLF wykazały wysoką korelację wyników z pomiarami ubytków minerałów. Metoda była stosowana w warunkach *in vitro* do testowania skuteczności różnych procedur powstrzymywania zmian próchnicowych i ich remineralizacji [10, 11].

QLF jest najbardziej skuteczna w diagnostyce wczesnych zmian szkliwa gładkich na bezpośrednio dostępnych powierzchniach. Metodę QLF próbowano stosować do detekcji i ilościowej oceny próchnicy wtórnej. Najlepsze wyniki uzyskano w wizualizacji zmian przylegających do wypełnień amalgamatowych lub barwnej rekonstrukcji tkanek [12, 13].

Badając wpływ długości fali wzbudzenia promieniowaniem laserowym 442 nm i 532 nm na zmiany poziomu fluorescencji szkliwa, wykazano, że poziom autofluorescencji szkliwa zdrowego jest wyższy w porównaniu do zmienionego próchnicowo, zarówno w badaniach *in vitro*, jak i *in vivo* [14]. Przy wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali 633 nm zależność ta jest identyczna przy zmianach badanych w warunkach *in vitro*, natomiast zmiany *in vivo* generują powstanie dodatkowych struktur, dających podwyższenie poziomu autofluorescencji próchnicy w porównaniu do szkliwa zdrowego. Zastosowanie jako źródło wzbudzenia lasera półprzewodnikowego o długości fali 407 nm i mocy ciągłej 15 mW umożliwia połączenie obu opisanych efektów – obniżenie autofluorescencji próchnicy w zakresie światła zielonego i wy-

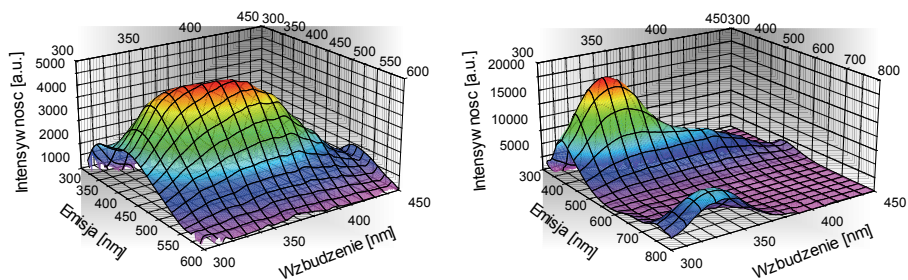
krywanie porfiryn w postaci czerwonej fluorescencji. W efekcie barwny obraz fluorescencyjny szkliwa, w którym wystąpiła zaawansowana próchnica z akumulacją porfiryn składa się na zielono fluoryzującej części szkliwa zdrowego i ciemno brązowych plam z obszarami czerwieni pochodzących od obszarów próchnicowych.

W pracach własnych opracowano charakterystyki emisyjne szkliwa przy różnych długościach fali promieniowania laserowego w celu znalezienia optymalnego źródła wzbudzenia fluorescencji [15, 16]. Charakterystykę wzbudzeniowo-emisyjną szkliwa zębów wyznaczono na spektrofluorymtrze LS 900 firmy Edinburgh Instruments. W układzie laboratoryjnym, przedstawionym schematycznie na rys. 14.6, źródło wzbudzenia stanowi laser niebieski o mocy około 25 mW. Promieniowanie odbite od tkanki i promieniowanie fluorescencji dochodzi do kolorowej kamery CCD (GP – KS162 firmy Panasonic). Przed kamerą zainstalowane jest zestaw filtrów optycznych m.in. żółty filtr pochłaniający nadmiar odbitego od tkanki promieniowania wzbudzającego. Do rejestracji obrazów wykorzystano również kamerę czarno-białą (EDC-2000N firmy Electrim Corp.) o czasie zbierania sygnału 1 ms do 5 s. W przypadku kamery czarno-białej obraz fluorescencyjny tego samego obszaru otrzymywano z użyciem interferencyjnego filtra zielonego ($\lambda = 530$ nm, $\delta = 15$ nm), a następnie czerwonego ($\lambda = 625$ nm, $\delta = 20$ nm). Parametr δ oznacza szerokość połówkową filtra, czyli różnicę długości fali, przy których transmisja wynosi 50%. Do analizy obrazów zastosowano program Microscan.



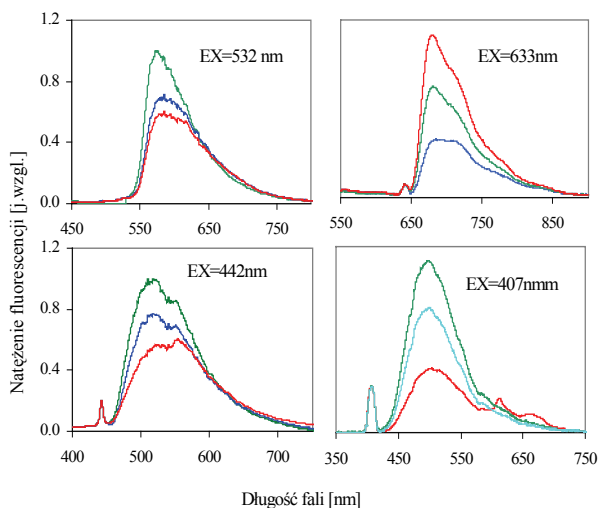
Rys. 14.6. a) Schemat laboratoryjnego układu obrazowania fluorescencji wzbudzonej laserami: źródło laserowe ze światłowodem (1), kamera CCD (2), dzielnik wiązki promieniowania (3), powierzchnia zęba (4), moduł kontroli kamery (5) komputer PC z systemem do akwizycji (6), koło filtrów (7) b) przykład obrazu fluorescencyjnego (EX = 407 nm)

Uzyskaną w badaniach własnych charakterystykę emisyjno-wzbudzeniową szkliwa i zębiny przedstawiono na rys. 14.7. Widoczny kontur uzyskano przez przecięcie płaszczyzną trójwymiarowej matrycy EM-EX, linie poziome łączą punkty o tym samym natężeniu emisji. Najsilniejszą fluorescencję szkliwa otrzymano przy wzbudzeniu promieniowaniem z zakresu bliskiego UV i fioletu. Zastosowanie źródła laserowego o długości fali 405 nm umożliwia uzyskanie wysokiego poziomu sygnałów emisji szkliwa, dużego kontrastu pomiędzy prawidłową i uszkodzoną powierzchnią szkliwa oraz jednoczesną wyraźną detekcję porfiryn.



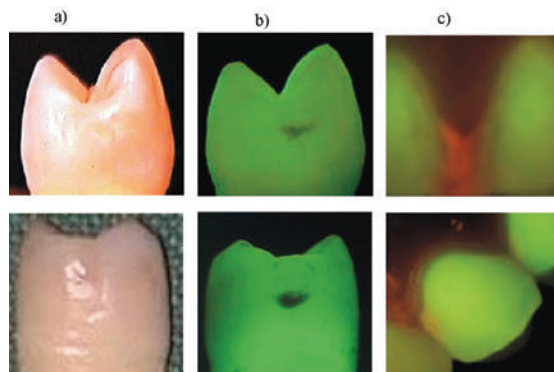
Rys. 14.7. Charakterystyka emisyjno-wzbudzeniowa szkliwa (po lewej) i zębiny (po prawej)

Przykładowe widma emisji szkliwa prawidłowego i próchnicowego przy wzbudzeniu promieniowaniem lasera GaN przedstawia rys. 14.8. Wyniki badań fluorescencji wskazują jednoznacznie na obniżenie poziomu intensywności emisji szkliwa zmienionego badanego w warunkach *in vitro* w całym zakresie spektralnym, dla wszystkich zastosowanych długości fal wzbudzenia. W przypadku naturalnych zmian próchnicowych obserwuje się podobne zjawisko z wyjątkiem wzbudzenia w zakresie czerwieni (633 nm), gdzie poziom fluorescencji w obszarze 650–750 nm jest wyższy.



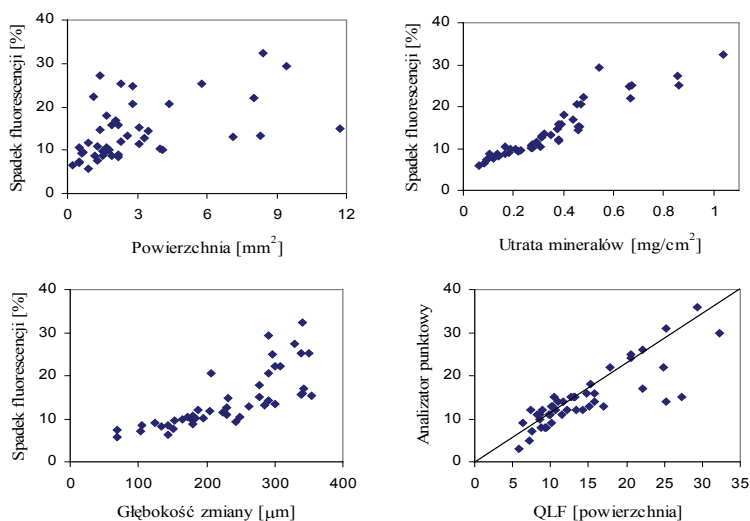
Rys. 14.8. Wpływ długości fali wzbudzenia promieniowaniem laserowym na zmiany poziomu fluorescencji szkliwa (kolor zielony – szkliwa normalne, niebieski – zmienione w warunkach *in vitro*, czerwony – zmienione w warunkach *in vivo*)

Przykłady obrazów wczesnych zmian próchnicowych zarejestrowanych metodą wzbudzonej fluorescencji szkliwa zaprezentowano na rys. 14.9. Dla porównania przedstawiono również obrazy zarejestrowane metodami odbiciowymi. Dodatkowo, zobrazowano możliwość oceny ilości płytki nazębnej z użyciem metody fluorescencyjnej.



Rys. 14.9. Porównanie obrazów szkliwa odbiciowych (a) i fluorescencyjnych (b), fluorescencja płytki bakteryjnej (c)

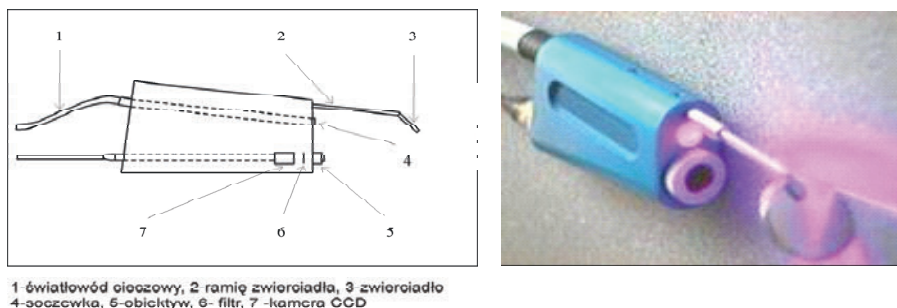
Na rysunku 14.10 zobrazowano zależności pomiędzy spadkiem natężenia fluorescencji a innymi parametrami charakteryzującymi stopień próchnicy: głębokością zmiany, powierzchnią zmiany i stopniem utraty minerałów.



Rys. 14.10. Wpływ powierzchni i głębokości zmian oraz stopnia demineralizacji szkliwa na spadek natężenia fluorescencji

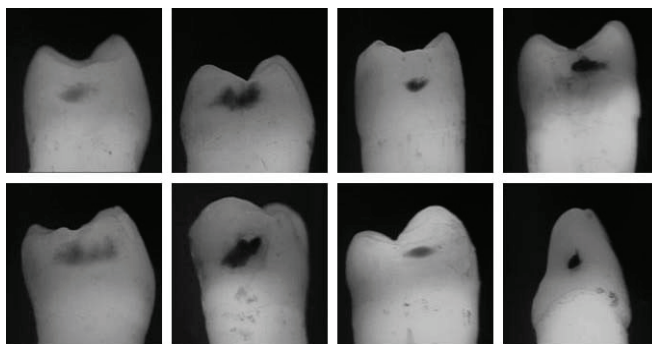
Na podstawie wykresów widać, że spadek natężenia fluorescencji jest proporcjonalny do stopnia demineralizacji. Wielkość obszaru zmiany nie jest natomiast skorelowana ze stopniem zaawansowania choroby próchnicowej, a więc stopniem demineralizacji. Zaobserwowano niższy współczynnik korelacji pomiędzy natężeniem fluorescencji a głębokością zmiany. Fakt ten można tłumaczyć słabą penetracją światła fioletowego

w strukturę szkliwa. Pomiarów opisanych parametrów przeprowadzono metodą mikroradiografii poprzecznej, a średni spadek fluorescencji obszaru zdemineralizowanego wyznaczono przy pomocy systemu QLF-Inspector Research (patrz rys. 14.11).



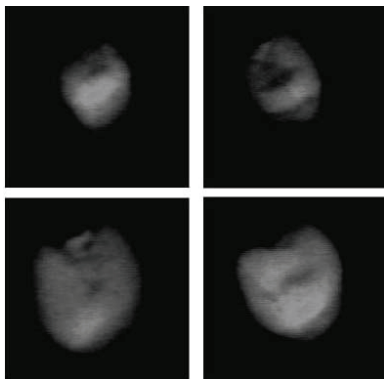
Rys. 14.11. Budowa i widok układu QLF-Inspector Research

Wybrane obrazy fluorescencyjne zmian próchnicowych pokazano na rys. 14.12.



Rys. 14.12. Przykłady obrazów fluorescencyjnych badanych zębów ze zmianami szkliwa

Do wykrywania wczesnych zmian próchnicy wykorzystano system fluorescencji różnicowej LIFE. Pomimo wysokiej czułości układu, obrazy fluorescencyjne są gorszej jakości niż otrzymywane w układach ze wzbudzeniem promieniowania fioletowego (patrz rys. 14.13). Próby zastosowania metody różnicowej z kamerą czarno-białą również nie dały lepszych rezultatów. Metoda ze względu na wysoką wydajność kwantową luminescencji szkliwa nie wymaga czułych kamer i źródeł światła o wysokich mocach. Typowe mikrokamery kolorowe i miniaturowe źródła światła laserowego o mocy około 15–25 mW rozwiązują problem techniczny pomiarów. Oprócz diagnostyki próchnicy, metoda oferuje możliwość monitorowania skuteczności wdrożonej terapii demineralizacyjnej oraz dokładną kontrolę płytki bakteryjnej.



Rys. 14.13. Obrazy fluorescencyjne szkliwa zębów zarejestrowane przy pomocy systemu LIFE

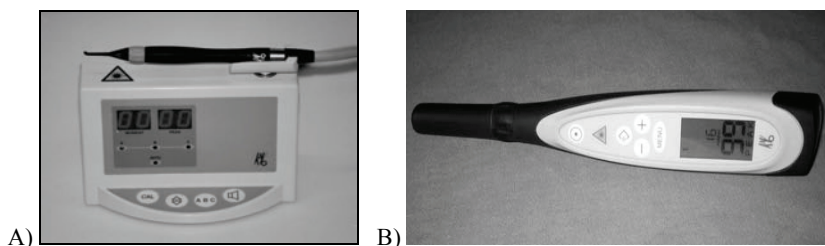
Przedstawiona metoda laserowo indukowanej fluorescencji LIF daje w warunkach klinicznych duże możliwości oceny stopnia zaawansowania próchnicy i ma istotną przewagę w stosunku do tradycyjnej metody odbiciowej. W obrazach fluorescencyjnych znikają refleksy światła utrudniające prawidłową ocenę, a miejsca dotknięte zmianami widoczne są jako ciemne plamy na jasnym tle. Metoda ze względu na wysoką wydajność kwantową luminescencji szkliwa nie wymaga superczułych kamer i specjalnych źródeł światła. Można zastosować typowe mikrokamery kolorowe (np. firmy Philips o czułości 3 lux) i miniaturowe źródła światła laserowego o mocy około 25–30 mW i długości fali promieniowania około 400–410 nm. Wymagana gęstość napromienienia na powierzchni zęba wynosi około 2 mW/cm².

Po wzbudzeniu szkliwa promieniowaniem o długości fali 407 nm, maksimum widma emisji położone jest w okolicy długości fali 500 nm. W przypadku zmian w szkliwie w warunkach *in vivo* widoczne jest obniżenie maksymalnego poziomu fluorescencji, przesunięcie maksimum w stronę czerwieni i pojawienie się dodatkowych pasm emisyjnych przy 630 i 670 nm, typowych dla porfiryn. W badanym materiale podobną charakterystykę uzyskano w około 70% przypadków, w pozostałych nie dało się wykryć porfiryn. Obserwowano jedynie typowy spadek poziomu luminescencji.

Ważną zaletą metody LIF jest jej czułość. Wymienione zmiany fluorescencji szkliwa zostały potwierdzone w 95% jako zmiany próchnicowe. Przypadki fałszywej diagnostyki spowodowane były głównie czynnikami mechanicznymi uszkodzającymi mikrostrukturę szkliwa. Wyniki ilościowe stopnia zdemineralizacji tkanki zęba dostarczają lekarzowi danych o stopniu zaawansowania procesu próchnicowego i pomagają w podjęciu decyzji terapeutycznej. Warto podkreślić, że jasną fluorescencję rejestruje się w przypadku obserwacji płytki nazębnej. Zwiększone gromadzenie się płytki nazębnej ma miejsce w rejonie szczeliny dziąsłowej. Metoda fluorescencyjna daje więc poza badaniem stopnia odwapnienia doskonałe możliwości monitorowania procesu remineralizacji oraz kontroli usuwania płytki z powierzchni zębów.

14.3.4.2. System DIAGNOdent

Ciekawym urządzeniem dostępnym na rynku od 1998 roku jest urządzenie DIAGNOdent[®], wykorzystujące zjawisko fluorescencji tkanek zęba i przeznaczony do oceny stopnia zaawansowania procesu próchnicowego [17]. System ten umożliwia diagnozowanie powierzchni żujących oraz powierzchni gładkich. Jako źródło światła wykorzystano w nim laser półprzewodnikowy o mocy ok. 1 mW, emitujący światło czerwone o długości fali 665 nm. Zastosowany w urządzeniu układ światłowodowy pozwala na oświetlenie powierzchni zęba i indukowanie w nim zjawiska fluorescencji. Detektor rejestrujący natężenie wzbudzonej fluorescencji umieszczony jest koncentrycznie na obwodzie końcówki światłowodu. System wyposażony jest w zestaw końcówek przeznaczonych do badania różnych powierzchni zębów. Przed wykonaniem badania należy każdorazowo skalibrować układ. Natężenie uzyskanej fluorescencji skorelowane jest z niemianowanymi wartościami cyfrowymi (w skali od 0 do 99), wyświetlanymi na ekranie urządzenia. Badania kliniczne sugerują przydatność DIAGNOdentu w ocenie stopnia zaawansowania zmian próchnicowych. Na uwagę zasługuje również fakt istnienia zależności pomiędzy wskazaniami DIAGNOdentu a stopniem zainfekowania zębiny próchnicowej. Na tej podstawie wysunięto koncepcję zależności natężenia fluorescencji od stopnia aktywności procesu próchnicowego. W myśl tej teorii metoda fotoluminescencji różnicuje obecność próchnicy zatrzymanej – nieaktywnej i aktywnych zainfekowanych ognisk zmienionej próchnicowo tkanki zęba. Duży wpływ na wskazania DIAGNOdentu ma jednak obecność płytki lub złogów nazębnych na badanej powierzchni. Przed oceną diagnostyczną urządzeniem DIAGNOdent zaleca się więc bezwzględnie oczyszczenie i osuszenie badanej powierzchni. Silnie przebarwione bruzdy o twardym podłożu lub ogniska hipomineralizacji mogą być jednak źródłem uzyskania błędnych pomiarów fotoluminescencji [18]. Obecnie na rynku dostępne jest zmodyfikowane urządzenie DIAGNOdent, którego użycie w warunkach klinicznych jest znacznie ułatwione. System o nazwie DIAGNOdent pen produkowany jest w zminimalizowanej wersji długopisowej. Zasada działania urządzenia pozostała niezmienną. Widok urządzenia DIAGNOdent i DIAGNOdent pen przedstawia rys. 14.14.



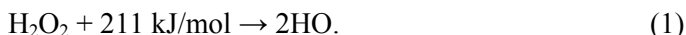
Rys. 14.14. A) System DIAGNOdent, B) widok urządzenia DIAGNOdent pen

14.3.5. Metody optyczne aktywujące proces wybielania zębów

Nadtlenek wodoru (H_2O_2) jest głównym, aktywnym składnikiem materiałów stosowanych do wybielania zębów. Jako związek chemiczny nie jest zaliczany do grupy wolnych rodników, ale cechuje się wysoką reaktywnością i łatwością wchodzenia w reakcje chemiczne. W celu akceleracji tempa zabiegu wybielania zębów z żywą miazgą wykorzystywane są następujące procesy:

A. Termokataliza

Uwalnianie wolnych rodników tlenowych z preparatów wybielających może być przyspieszone dzięki zastosowaniu podwyższonej temperatury, zgodnie z reakcją:



Do zainicjowania zjawiska termokatalizy często wykorzystywane są źródła światła. Część światła ulega absorpcji przez preparaty wybielające, a dostarczona energia zamieniana jest na ciepło. Aby zwiększyć ilość pochłanianego światła, a tym samym doprowadzić do wzrostu temperatury, niektóre preparaty wzbogaca się w odpowiednie substancje aktywujące, np. karoten czy krzem. Zawartość karotenu zwiększa pochłanianie światła niebieskiego, a cząsteczki krzemu powodują wzrost absorpcji czerwieni i podczerwieni. Podwyższenie temperatury zwiększa ilość uwolnionych rodników OH^\bullet i teoretycznie przyspiesza proces wybielania. Wzrost temperatury musi być jednak kontrolowany ze względu na jej niekorzystny wpływ na miazgę zębów.

B. Fotoliza

Wzrost uwalniania wolnych rodników z H_2O_2 może być spowodowany przez bezpośrednie wzbudzenie światłem:



Dostarczenie wymaganej energii możliwe jest dzięki zastosowaniu światła o długości fali mniejszej lub równej 248 nm. Wykorzystanie właściwego źródła energii gwarantuje bezpieczeństwo zabiegów wybielania aktywowanych falą świetlną.

C. Źródła światła

Jako źródła światła przeznaczone do aktywacji procesów wybielania zębów wykorzystuje się wiele systemów. Najbardziej popularne są:

1. Lamy halogenowe (Th) – emitują szeroki zakres długości fal od ultrafioletu do podczerwieni, w zakresie od 380 do 750 nm.
2. Łukowe lamy plazmowe – emitują szeroki zakres długości fal od ultrafioletu do podczerwieni, w zakresie od 380 do 750 nm. Wyposażone są w filtry eliminujące szkodliwe dla komórek żywych promieniowanie UV. Pracują zwykle w zakresie 400–580 nm.

3. Systemy laserowe – emitują światło monochromatyczne o określonej długości fali. Zwykle stosowane są do różnych aplikacji stomatologicznych w tym do akceleracji procesu wybielania.
4. Lampy diodowe LED.

Znajomość zjawisk fizycznych zachodzących w tkankach zęba pod wpływem określonych długości fal świetlnych pozwala na bezpieczne wykonanie zabiegów wybielania. Szczególnie istotne są właściwości absorpcyjne, które wpływają na głębokość penetracji i wzrost temperatury w tkankach.

14.4. Podsumowanie

Występowanie chorób twardych tkanek zębów o próchnicowym i niepróchnicowym pochodzeniu dotyczy wielu pacjentów. Wczesne wykrycie zmian strukturalnych twardych tkanek zęba daje możliwość wdrożenia nieinwazyjnych metod leczenia lub terapii małej inwazyjności. Według wielu autorów idealny system diagnostyczny powinien cechować się następującymi parametrami:

- niską inwazyjnością i łatwością stosowania,
- wysoką czułością – zdolnością do prawidłowego rozpoznania choroby,
- wysoką swoistością,
- weryfikacją aktywności próchnicy i korelacją z procesami biologicznymi – z wynikami referencyjnego badania diagnostycznego (ang. *gold standard*),
- użytecznością w podejmowaniu decyzji terapeutycznych.

Jak dotąd nie udało się jednak skonstruować wzorcowego układu, który spełniałby powyższe warunki. Konwencjonalne metody z użyciem wzroku i sondy stomatologicznej uzupełniane są więc często metodami wykorzystującymi nowoczesne technologie optyczne.

Szczególnie przydatne są metody umożliwiające wizualizację i zapis uzyskanego obrazu. Funkcje te pozwalają na monitorowanie badanych powierzchni zębów i porównanie zmian w czasie. Prezentowane w tym rozdziale systemy posiadają takie funkcje.

System QLF obrazuje fluorescencję wzbudzoną na powierzchni zęba. W warunkach klinicznych pozwala na ocenę powierzchni gładkich i żujących łatwo dostępnych, przy braku możliwości oceny powierzchni stycznych. Jako źródło światła w systemie QLF stosuje się oświetlacz ksenonowy, który jest tańszym źródłem wzbudzenia fluorescencji w porównaniu z pierwotnie stosowanym laserem argonowym. Dodatkową cechą układu jest możliwość ilościowej oceny stopnia demineralizacji tkanki oraz określenie wielkości zmienionego obszaru. Mimo, iż system QLF w wielu badaniach eksperymentalnych wykazał się skutecznością w wykrywaniu wczesnych zmian próchnicowych, jego wysoka cena oraz konieczność stosowania specyficznego

oprogramowania do ilościowej analizy obrazu znacznie ogranicza jego dostępność w praktyce klinicznej.

Drugi obecny na rynku system diagnostyki fluorescencyjnej – DIAGNOdent, wykorzystuje laser półprzewodnikowy o mocy ok. 1mW, emitujący światło czerwone o długości fali 665 nm. Natężenie uzyskanej fluorescencji skorelowane jest z niemianowanymi wartościami cyfrowymi (w skali 0–99), wyświetlanymi na ekranie urządzenia. Układ nie umożliwia jednak wizualizacji zmian obserwowanych w strukturach tkanek zęba. Silnie przebarwione bruzdy o twardym podłożu lub ogniska hipomineralizacji mogą być źródłem uzyskania błędnych pomiarów fotoluminescencji.

Metoda RVG obciążona jest emisją promieniowania jonizującego, co w wielu wypadkach ogranicza jej stosowanie. Rentgenodiagnostyka nie jest ponadto wystarczająco skuteczna w wykrywaniu subklinicznych stadiów próchnicy. Prezentowana metoda DIFOTI, mimo iż pozwala na ocenę trudnodostępnych powierzchni stycznych nie umożliwia ilościowej oceny stopnia demineralizacji.

Skuteczność diagnostyczna metody OCT oceniana jest bardzo wysoko. System daje możliwość wykrywania wczesnych zmian próchnicowych oraz pozwala na obserwację procesów de- i remineralizacji. Metoda nie jest jednak rozpowszechniona w praktyce klinicznej ze względu na wysokie koszty aparatury.

W świetle przytoczonych informacji istnieje konieczność kontynuowania badań nad opracowaniem wysoce czułego i swoistego narzędzia diagnostycznego, które pozwoli na rejestrację i wizualizację subklinicznie toczącego się procesu próchnicowego oraz monitorowanie procesów naprawczych w przebiegu wdrożonej terapii.

Literatura

- [1] FEATHERSTONE J.D.B., *Dental Caries: a dynamic disease process*, Austr. Dent. J., 2008, Vol. 53, 286–291.
- [2] SPITZER D., TEN BOSH J., *Luminescence quantum yields of sound and carious dental enamel*, Calcif. Tiss. Res., 1977, Vol. 24, 249–251.
- [3] DOVE S.B., *Radiographic diagnosis of dental caries*, J. Dent. Educ., 2001, Vol. 65, 985–990.
- [4] HEINRICH-WELTZIEN R., WEERHEIJ K.L., KUHNISCH J., OEHME T., STOSSER L., *Clinical evaluation of visual, radiographic, and laser fluorescence methods for detection of occlusal caries*, ASDC J. Dent. Child, 2002, Vol. 69, No. 2, 27–32.
- [5] WENZEL A., *Computer-Automated Caries Detection in Digital Bitewings: Consistency of a Program and Its Influence on Observer Agreement*, Caries Res., 2001, Vol. 35, 12–20.
- [6] YOUNG D.A., FEATHERSTONE J.D., *Digital imaging fiber-optic trans-illumination, F-speed radiographic film and depth of approximal lesions*, J. Am. Dent. Assoc., 2005, Vol. 136, No. 12, 1682–1687.
- [7] BIN-SHUWAISH, YAMAN P., DENISSON J., NEIVA G., *The correlation of DIFOTI to clinical and radiographic images in class II carious lesions*, JADA, 2008, Vol. 139, 1374–1381.
- [8] DRABARCZYK M., KACPRZAK M., MIELCZAREK A., *Nowa metoda diagnostyczna w stomatologii – tomografia optyczna*, Stomatologia Współczesna, 2000, Vol. 3, 34–36.

- [9] BJELKHAGEN H., SUNDSTROM F., ANGMAR-MANSSON B., RYDEN H., *Early detection of enamel caries by the luminescence excited by visible laser light*, Swed. Dent. J., 1982, Vol. 6, 1–7.
- [10] AL-KHATEB S., OLIVEBY A., DE JOSELIN DE JONG E., ANGMAR-MANSSON B., *Laser fluorescence quantifications of remineralisation of enamel lesions: Influence of fluoride supplements*, Caries Res., 1997, Vol. 31, 132–140.
- [12] HALL A.F., DE SCHEPPER E.D., VAN DER VEEN M.H., DE JOSELIN DE JONG E., STOOKEY G.K., *Quantitative laser fluorescence and detection of in vitro mineral changes in caries adjacent to amalgam restorations*, Caries Res., 1996, Vol. 30, 299–303.
- [14] KWAŚNY M., MIELCZAREK A., *Fluorymetryczne układy diagnostyczne wczesnej próchnicy zębów*, Biul. WAT, 2001, Vol. 6, 19–135.
- [15] MIELCZAREK A., KWAŚNY M., WOJTOWICZ A., WIERZBICKA M., *Effect of different conditions of excitation on fluorescence of enamel*, The 4 th Joint-Meeting of the IADR CED/NOF, 2000, Warsaw, 151.
- [17] CORTES D.F., ELLWOOD R.P., EKSTRAND K.R., *An in vitro comparison of a combined FOTI/visual examination of occlusal caries with other caries diagnostic methods and the effect of stain on their diagnostic performance*, Caries Res., 2003, Vol. 37, No. 1, 8–16.
- [18] BAMZAHIN M., SHI X.-Q., ANGMAR-MANSSON B., *Secondary caries detection by DIAGNOdent and radiography: a comparative in vitro study*, Acta Odont. Scand., 2004, Vol. 62, No. 1, 61–64.

ROZDZIAŁ 15

WYKORZYSTANIE ODDZIAŁYWANIA ŚWIATŁA W BLISKIEJ PODCZERWIENI NA STRUKTURY BIOLOGICZNE

**Małgorzata Komorowska, Sylwia Olsztyńska-Janus,
Katarzyna Szymborska-Malek**

Spis treści

15.1. Promieniowane z zakresu bliskiej podczerwieni	375
15.1.1. Źródła promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni	375
15.1.2. Chromofory	377
15.1.3. Efekty wywołane przez promieniowanie NIR	379
15.2. Fotochemiczne działanie NIR na proste cząsteczki	380
15.2.1. Wpływ promieniowania NIR na wodę	380
15.2.2. Wpływ promieniowania NIR na cząsteczki biologiczne	381
15.2.3. Wpływ promieniowania NIR na tkanki	383

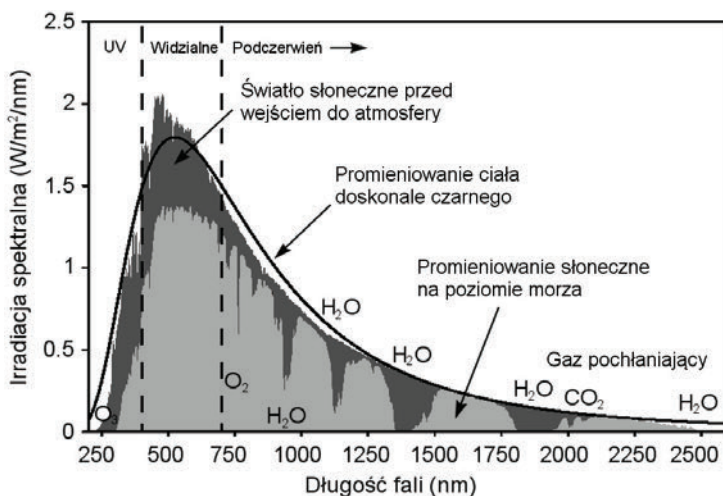
15.1. Promieniowane z zakresu bliskiej podczerwieni

Promieniowane z zakresu podczerwieni (IR – *infra red*) obejmuje następujące zakresy: bliską podczerwień NIR – *near infra red* (760–4000 nm), średnią MIR – *mid infra red* (4000–14000 nm) oraz daleką FIR – *far infra red* (14000–100000 nm). W fotobiologii natomiast wyróżniamy tzw. obszar IR-A (760–1400 nm), IR-B (1400–3000 nm) oraz IR-C (3000–1000·10³ nm).

15.1.1. Źródła promieniowania z zakresu bliskiej podczerwieni

Słońce jest naturalnym źródłem promieniowania bliskiej podczerwieni. Część promieniowania elektromagnetycznego, które dociera do Ziemi ulega pochłonięciu

podczas przechodzenia przez warstwy atmosfery, głównie przez parę wodną, dwutlenek węgla oraz ozon. Rozkład promieniowania słonecznego (ultrafiolet UV, widzialne VIS i podczerwień IR) oraz długości fal absorbowane przez dwa główne składniki atmosfery prezentowane są na rys. 15.1. Warto zwrócić uwagę na liczne pasma absorpcji wody w całym zakresie widmowym, zaczynając od ultrafioletu po bliską podczerwień (na rys. 15.1). Woda także silnie absorbuje średnią i daleką podczerwień, ale ten zakres promieniowania jest prawie nieobecny w promieniowaniu słonecznym.



Rys. 15.1. Rozkład widmowy promieniowania słonecznego z zaznaczonymi pasmami absorpcji wody, dwutlenku węgla oraz tlenu. Praktycznie cały zakres krótkofalowego ultrafioletu jest pochłaniany przez warstwę ozonową [1]

Źródłem promieniowania NIR są także lampy halogenowe (emitują cały zakres promieniowania widzialnego oraz NIR), diody luminescencyjne, diody laserowe oraz lasery. Promieniowanie IR długofalowe (inaczej promieniowanie cieplne) emitowane jest przez np. rozżarzony pręt silitowy (ceramiczny).

Efekty oddziaływania promieniowania NIR na materię są zależne od rodzaju źródła światła. Konwencjonalne źródła światła emitują bardzo małą liczbę fotonów, a efekty działania promieniowania NIR związane są przede wszystkim ze zjawiskami fotochemicznymi. Identyczne efekty obserwuje się zarówno w przypadku źródeł konwencjonalnych, jak i laserów, oczywiście tych emitujących promieniowanie niskiej mocy. Promieniowanie laserowe wysokoenergetyczne, oprócz efektów fotochemicznych, generuje niszczące materię efekty cieplne. Stosowanie spolaryzowanego promieniowania może mieć tylko uzasadnienie w przypadku materii o ściśle uporządkowanym i znanym kierunku uporządkowania chromofo-

rów, a kierunek polaryzacji musi być dostosowany do obiektu. Ten rozdział poświęcony jest efektom fotochemicznemu promieniowania NIR, a więc promieniowania o niskiej mocy.

Warto zwrócić uwagę jeszcze na jeden fakt. Obserwowane efekty działania NIR na materię wykazują silną zależność od dawki i spełniają bez wyjątku prawo Arndta-Schultza. Oznacza to, że istnieje optymalna dawka promieniowania wywołująca największe efekty w materii. Dawki mniejsze i większe od optymalnej albo słabo oddziałują, albo hamują indukowane procesy.

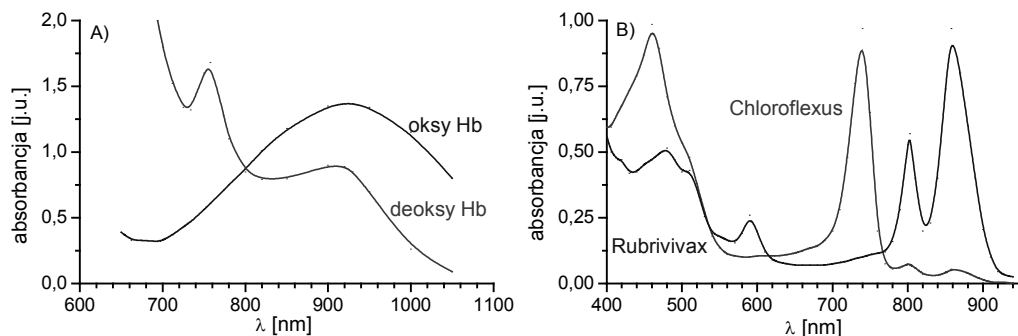
15.1.2. Chromofory

Zgodnie z prawami fotochemii tylko promieniowanie zabsorbowane aktywuje cząsteczkę, w następstwie czego może dojść do inicjacji procesu fotochemicznego. Aby więc zdefiniować mechanizm fotochemiczny działania promieniowania NIR, należy zastanowić się, jakie substancje absorbują ten zakres widmowy i jakiego typu wzbudzenia odpowiadają energii fotonów. W tabeli 1 wymienione są podstawowe składniki materii żywej, które absorbują NIR wraz z pasmami absorpcji.

Tabela 1. Zestawienie pasm absorpcji w obszarze promieniowania NIR dla wybranych cząsteczek biologicznych. Położenie pasm podane jest w nm. Litera *e* oznacza niskoenergetyczne wzbudzenia elektronowe dzięki obecności w cząsteczce hemoglobiny żelaza II [2]

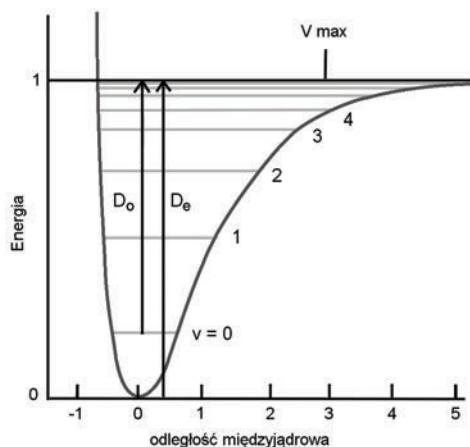
Glukoza	Woda	Hemoglobina	Lipidy	Białka
714	749	760- <i>e</i>	770	910
939	880	805- <i>e</i>	920	1020
1126	980	820- <i>e</i>	1040	2174
1408	1211	910	2299	2288
1536	1450	1020- <i>e</i>	2342	
1688	1787			
2261	1934			
2326				

Oprócz hemoglobiny (patrz rys. 15.2) znane są inne barwniki, które absorbują w zakresie NIR. Do nich należy bakteriochlorofil (patrz rys. 15.2), oksydaza cytochromu *c*, a także dysmutaza ponadtlenkowa (NADH), która zawiera w swojej strukturze miedź.



Rys. 15.2. Widma absorpcyjne w zakresie NIR oksy-, deoksyhemoglobiny i bakteriochlorofili pochodzących z bakterii fotosyntetycznych Chloroflexus i Rubrivivax

Jak już zostało wcześniej powiedziane, pierwotnym procesem fotofizycznym jest absorpcja promieniowania i przejście cząsteczki w stan wzbudzony. Energia fotonów promieniowania NIR w zakresie 700–2000 nm wynosi 171–60 kJ/mol. Dostarczenie do cząsteczki takiej energii może jedynie wzbudzić niskoenergetyczne przejścia elektronowe. W tabeli 1 zaznaczono literą „e” przejścia elektronowe. Jak widać, tylko hemoglobina, chlorofile czy białka zawierające atomy miedzi mogą po absorpcji energii w zakresie bliskiej podczerwieni przejść we wzbudzony stan elektronowy. W przypadku pozostałych związków energia NIR jest za mała. W takim razie, jakiego rodzaju wzbudzenia wywołuje ten zakres promieniowania? Cząsteczka w podstawowym stanie elektronowym, dzięki absorpcji odpowiedniej energii, może przejść w wyższe stany oscylacyjne (absorpcja w podczerwieni) lub rotacyjne (absorpcja promieniowania mikrofalowego). Oscylacje cząsteczek polegają na zmianie długości wiązań – drgania rozciągające lub kątów pomiędzy wiązaniami. Szczególnie ważne w omawianym



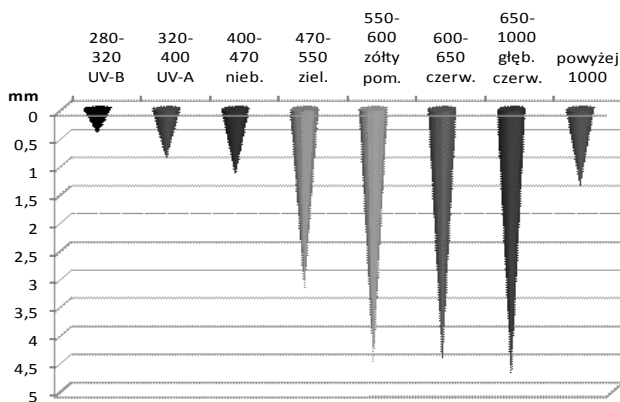
Rys. 15.3. Energia drgań cząsteczki opisywana funkcją Morsa

przypadku są drgania rozciągające. Energia drgającej cząsteczki zależy od odległości pomiędzy atomami. Zależność ta jest opisana w przybliżeniu funkcją paraboliczną. W przypadku wiązań rozciągających funkcja opisująca drgającą cząsteczkę nie jest już parabolą, a funkcją Morsa (patrz rys. 15.3).

Na wykresie zaznaczone są poziomy oscylacyjne. Liczbie kwantowej oscylacji $\nu = 0$ odpowiada poziom podstawowy. Przejście na pierwszy poziom wzbudzony oscylacji $\nu = 1$ zachodzi po absorpcji promieniowania IR długofalowego. Gdy drgania opisywane są funkcją Morsa, oznacza to, że są silnie anharmoniczne. Taki kształt funkcji opisującej drgania cząsteczki, mówi o tym, że dozwolone jest przejście $0 \rightarrow 2$ – nazywane pierwszym nadtonem, $0 \rightarrow 3$ – drugim nadtonem. Energia tych przejść odpowiada energii promieniowania MIR i NIR. Poziomy oscylacyjne o większych liczbach kwantowych, zmniejszają swoją energię i dla odpowiednio dużych liczb kwantowych tworzy się kontinuum. Wielkość energii oznaczona symbolem D_0 jest energią dysocjacji cząsteczki. Jak wynika z przedstawionych rozważań, absorpcja energii z zakresu NIR wzbudza tylko nadtony drgań, przede wszystkim rozciągających, co w konsekwencji może doprowadzić do dysocjacji cząsteczki. Ze względu na fakt, że energia wiązań wodorowych (w białkach nawet dochodzi do $-125,5$ kJ/mol) jest porównywalna z energią promieniowania NIR, efektem działania tego promieniowania może być modyfikacja wiązań wodorowych, w tym również warstw hydratacyjnych.

15.1.3. Efekty wywołane przez promieniowanie NIR

Rysunek 15.4 przedstawia głębokość wnikania promieniowania elektromagnetycznego w głąb skóry. Ten przykład jest ilustracją zachowania się większości materiałów biologicznych zawierających w swojej strukturze dużą ilość wody oraz naturalnych barwników, takich jak hemoglobina.



Rys. 15.4. Głębokość penetracji fal elektromagnetycznych w głąb skóry od zakresu UV po bliską podczerwień [3]

Istotny jest zakres dużej przepuszczalności skóry pomiędzy 600 a 1200 nm. Obszar spektralny w zakresie ok. 600–1300 nm to tzw. „okno terapeutyczne”, gdzie obserwuje się najgłębszą penetrację promieniowania elektromagnetycznego w struktury biologiczne.

15.2. Fotochemiczne działanie NIR na proste cząsteczki

15.2.1. Wpływ promieniowania NIR na wodę

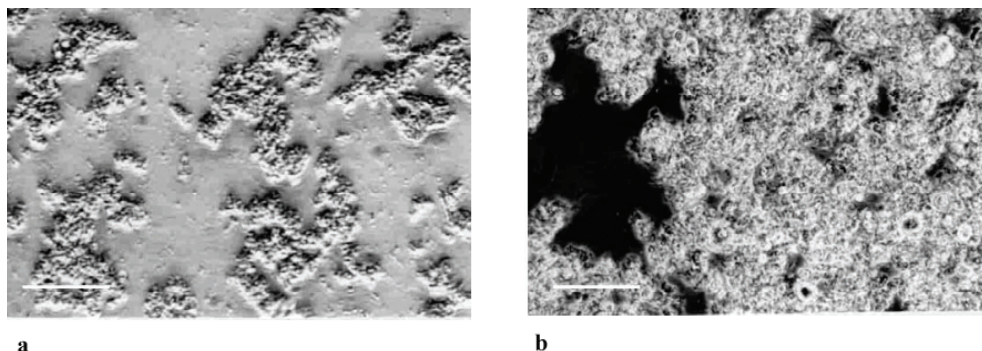
Jedną z najsilniej absorbujących cząsteczek w zakresie NIR jest cząsteczka wody. W tabeli 1 podane są pasma absorpcji wody występujące w tym zakresie. W latach 80 ubiegłego wieku zostały przeprowadzone badania nad procesami zachodzącymi po wzbudzeniu cząsteczek wody promieniowaniem NIR o długościach fali odpowiadających pasmom absorpcji w bliskiej podczerwieni. Badania te wykazały, że absorpcja promieniowania NIR przez wodę może powodować modyfikację jej struktury. Wzbudzając nadtony drgań rozciągających grup O-H dla wody za pomocą pojedynczych fotonów, zwiększa się jej dysocjacje. W procesie tym powstają jony hydroniowe i wodorotlenkowe.



Wydajność kwantowa tej reakcji jest niewielka i wynosi mniej niż 0,01%. Taka mała wydajność świadczy o zachodzących bardzo szybko dwóch procesach: zderzenia międzycząsteczkowe, powodujące ich szybką dezaktywację oraz rekombinacja utworzonych par jonowych. Czas rekombinacji w temperaturze bliskiej 0 °C wynosi 233 μs, a w temperaturze 30 °C skraca się do 33 μs. Badania te wykazały także, że fotochemiczny efekt wywołują tylko te cząsteczki wody, które tworzą wiązania wodorowe. Obecność substancji rozpuszczonych nie zmienia procesu dysocjacji wody; natomiast zmienia silnie czas relaksacji. Wzbudzenia elektronowe cząsteczek powodują zmianę w rozkładzie ładunku, a co za tym idzie wpływają na ich reaktywność. Natomiast absorpcja promieniowania NIR i wzbudzenia oscylacyjne mogą prowadzić do rozpadu wiązań wodorowych oraz wzrostu stężenia jonów hydroniowych i wodorotlenowych. W konsekwencji prowadzi to do protonacji rozpuszczonych w wodzie cząsteczek, zmian ich geometrii, a zubożenie ładunku może prowadzić do łączenia się ich w większe agregaty. Jeśli mamy do czynienia z agregatami tworzonymi przez system wiązań wodorowych po absorpcji promieniowania, może zachodzić ich rozpad.

15.2.2. Wpływ promieniowania NIR na cząsteczki biologiczne

Badania wykazały, że promieniowanie NIR silnie modyfikuje zarówno aminokwasy, jak i białka. Aminokwasy posiadają dwie charakterystyczne grupy chemiczne: grupę aminową i karboksylową. W zależności od stężenia jonów wodorowych w środowisku otaczającym, te cząsteczki stają się kationami, jonami obojnaczymi lub anionami. Kationy tworzą się, gdy stężenie jonów wodorowych jest wysokie (niskie pH). W środowisku obojętnym (blisko pH = 7) aminokwas jest jonem obojnaczym i wreszcie przy bardzo niskich stężeniach jonów wodorowych (pH = 9–10) staje się anionem. W środowisku wodnym aminokwas nie występuje jako obojętna cząsteczka. Jak się okazało, po zadziałaniu promieniowania NIR na aminokwasy czy białka, obserwuje się obecność obojętnych elektrycznie cząsteczek. Brak ładunku powoduje agregację tych cząsteczek. Tworzące się agregaty są bardzo trwałe i nie ulegają rozpadowi nawet w stosunkowo wysokich temperaturach. Mechanizm działania NIR nie jest prosty. Modelowanie molekularne wykazało, że tworzenie obojętnych cząsteczek związane jest z przepływem protonu od naładowanej dodatnio grupy aminowej (NH_3^+) do ujemnie naładowanej grupy karboksylowej. W efekcie powstaje obojętna elektrycznie cząsteczka. Aby jednak ten proces miał miejsce, sama cząsteczka aminokwasu musi osiągnąć sprzyjającą temu procesowi geometrię. To właśnie zmiana geometrii cząsteczki zachodzi pod wpływem promieniowania NIR jako bezpośredni efekt absorpcji fotonu [4, 5].

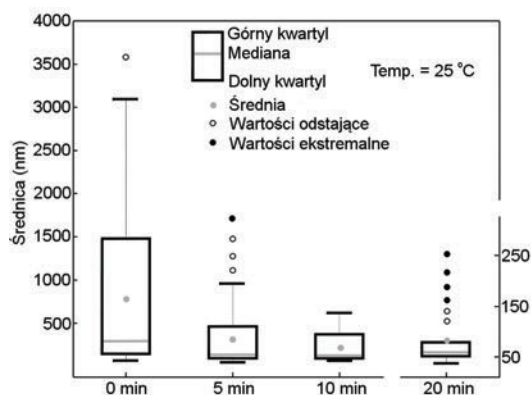


Rys. 15.5. Przykłady obrazu mikroskopowego liposomów wielowarstwowych, naładowanych ujemnie: a – liposomy nienaświetlone, b – po ekspozycji na promieniowanie NIR. Biała skala na zdjęciu ma długość 55 μm

Białka reagują nieco odmiennie. Tutaj absorberami promieniowania są przede wszystkim struktury wody związanej z powierzchnią białka. Woda tworzy z powierzchnią białka wiązania wodorowe, formując pierwszą, drugą i trzecią warstwę hydratacyjną. Białko pozbawione warstwy hydratacyjnej traci swoje właściwości. Usunięcie struktur wody z powierzchni makrocząsteczki powoduje denaturację białka.

Wiązania wodorowe tworzące te struktury są tworami bardzo dynamicznymi. Nie ma mowy, aby te wiązania rozpadły się całkowicie. Zmienia się tylko ich czas życia. W konsekwencji polarne grupy funkcyjne, uzyskując swobodę, mogą zmieniać silnie swoją geometrię i tworzyć pary jonowe lub ulegać protonacji. W końcowym efekcie białko może całkowicie zmienić swoją strukturę aż do tworzenia, podobnie jak w przypadku aminokwasów, dużych agregatów. Zdjęcia mikroskopowe (mikroskop optyczny) liposomów ilustrują efekty obserwowane w białkach (patrz rys. 15.5).

Na rysunku 15.5 widać wyraźne granice dużych wielowarstwowych liposomów. Posiadają one ładunek ujemny, ponieważ na powierzchni znajdują się cząsteczki zdysocjowanego kwasu palmitynowego i dlatego bardzo słabo agregują. Po ekspozycji na promieniowanie NIR, ładunek został zubożony, a liposomy łatwo tworzą bardzo wielkie agregaty [2]. Tak samo zachowują się cząsteczki DNA rozpuszczone w buforze MOPS (kwas 3-N-morfolinopropanosulfonowy), co ilustruje rys. 15.6.

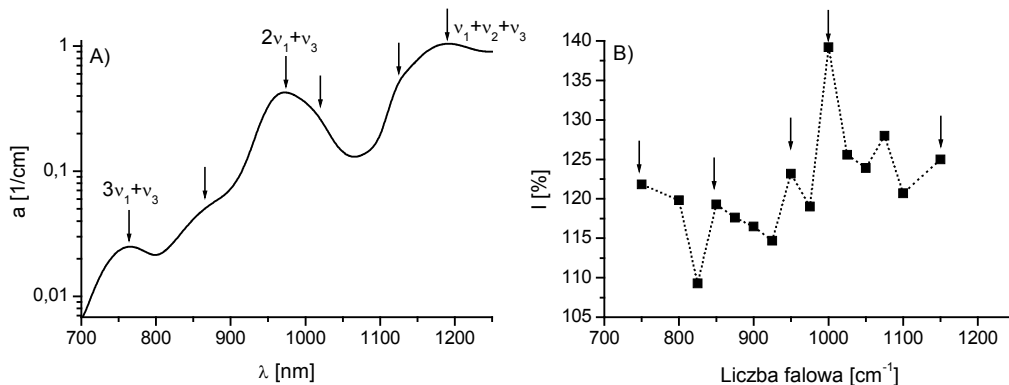


Rys. 15.6. Działanie promieniowania NIR na DNA uzyskane ze spermy śledzia. Zależność rozmiarów agregatów (wartości średnie) od czasu ekspozycji na promieniowanie NIR. Średnia zawartość par zasad wynosi 700

Po rozpuszczeniu w buforowanym roztworze wodnym początkowo obserwuje się ogromne agregaty o największej średnicy ok. 3000 nm. Wraz ze wzrostem czasu naświetlania wielkość agregatów praktycznie jest stała, a rozkład wielkości prawie jednolity. Najmniejsze agregaty uzyskuje się po 20-minutowej ekspozycji (średnica agregatów wynosi 50 nm). Struktura pojedynczej cząsteczki DNA także ulega modyfikacji po naświetleniu promieniowaniem NIR. Analiza spektrofotometryczna wykazała znaczne zmiany w strukturze wody, podobnie jak w białkach.

Badania spektrofotometryczne jednoznacznie wykazały, że we wszystkich przypadkach przyczyną zmian strukturalnych indukowanych promieniowaniem NIR jest zawsze absorpcja promieniowania przez wodę, następnie zmiana jej struktury, co pociąga za sobą zmiany strukturalne zachodzące w obrębie rozpuszczonej w wodzie cząsteczki. Na rysunku 15.7A i B zestawione jest widmo absorpcyjne wody w bliskiej

podczerwieni i widmo akcji promieniowania NIR na aminokwas glicynę. Pokazano natężenie widmowe drgań grupy NH_3^+ w zależności od długości fali. Obydwa wykresy mają podobny charakter, potwierdzając proponowany mechanizm.



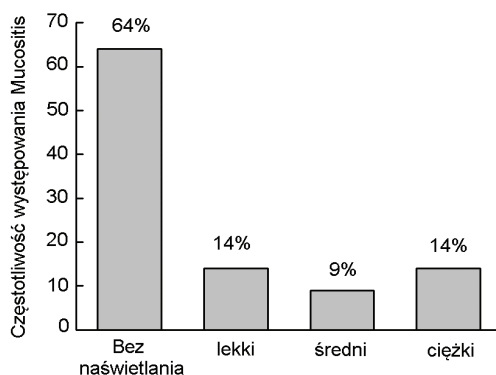
Rys. 15.7. Porównanie widma absorpcyjnego wody w stanie ciekłym (A) oraz widma akcji promieniowania NIR na aminokwas glicynę (B). a – absorbancja, I – względny wzrost absorbancji, który jest efektem działania promieniowania NIR na glicynę liczony względem próbki nienaświetlanej. Długości fal wywołujące największą efektywność działania NIR pokrywa się z widmem absorpcyjnym wody – zaznaczono je na rysunku strzałkami

15.2.3. Wpływ promieniowania NIR na tkanki

Promieniowanie o długości fal w zakresie 600–1200 nm jest absorbowane głównie przez takie składniki tkankowe, jak: woda, glukoza, hemoglobina, melanina, lipidy, aminokwasy, białka, kwasy nukleinowe. Stąd widać wyraźnie, że fotochemiczne działanie promieniowania NIR można rozpatrywać zarówno w odniesieniu do roślin, jak i świata zwierzęcego. Pierwszorzędną rolę odgrywają dwa barwniki strukturalnie zbliżone do siebie, a różniące się atomem centralnym koordynowanym przez pierścień porfirykowy. Chodzi tu o cząsteczki chlorofilu i hemoglobiny. W chlorofilu występuje magnez; natomiast w hemoglobinie żelazo dwuwartościowe lub w methemoglobinie – żelazo trójwartościowe. Zarówno hemoglobina, jak i chlorofil pochodzenia bakteryjnego, posiadają pasma absorpcji w NIR. W tym rozdziale zajmiemy się jednak tylko medycznym aspektem promieniowania NIR.

Promieniowanie NIR jest wykorzystywane zarówno w terapii, jak i diagnostyce medycznej. Początkowo sądzono, że energia promieniowania z tego zakresu nie może wywoływać efektów fotochemicznych, a obserwowane działanie terapeutyczne związane jest tylko z efektami cieplnymi. Rozwój badań i coraz większa baza danych potwierdza, że jednak mamy tutaj do czynienia ze zjawiskami fotochemicznymi, chociaż pierwotne procesy fotofizyczne i fotochemiczne nie są w pełni wyjaśnione. Promie-

niowanie z zakresu IR posiada działanie przeciwbólowe i przeciwzapalne, przyspiesza gojenie się ran i procesów zapalnych, opóźnia procesy starzenia się skóry i wzmacnia układ odpornościowy. Przykładem tego działania jest ochronne działanie promieniowania o długości fali 670 nm (dioda laserowa) po radioterapii w procedurze medycznej przeszczepiania szpiku kostnego u dzieci (patrz rys. 15.8).



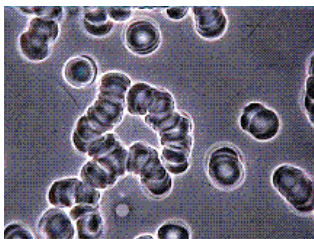
Rys. 15.8. Redukcja częstotliwości występowania *Mucositis* u dzieci podczas terapii przeszczepu szpiku kostnego. Pierwsza kolumna odpowiada częstotliwości występowania tej choroby u pacjentów nienaświetlanych NIR. Następne kolumny wskazują na obniżenie ilości przypadków w czterech stanach zaawansowania choroby: lekkim, średnim i ciężkim. We wszystkich przypadkach widać ochronne działanie tego promieniowania [6]

Na skutek chemioterapii lub naświetlań promieniowaniem X obserwuje się powikłania w postaci ciężkiego uszkodzenia błony śluzowej jamy ustnej i przewodu pokarmowego (*Mucositis*). Badania wykazały, że po zastosowaniu naświetlania zmienia się skład śliny: maleje stężenie i aktywność mieloperoksydazy, ślinowej peroksydazy i immunoglobuliny A, co oznacza zmniejszoną odporność na stany zapalne [6].

Długości fali w zakresie NIR modyfikują działanie enzymów transportu przez błony, a w tym działanie kanałów w błonach biologicznych, wzrost komórek, komunikacji komórek i systemu obronnego. Opisywana aktywność światła związana jest z modyfikacjami na poziomie genów zawiadujących tymi funkcjami komórki. Na podstawie tego typu doświadczeń została sformułowana hipoteza robocza przyjmująca, że za obserwowane efekty odpowiedzialna jest zmiana potencjałów oksydacyjno-redukcyjnych w cyklu oddechowym poprzez fotoaktywację cytochromu *c*. Absorpcja fotonów przez komponenty cyklu oddechowego powoduje jego krótkotrwałą aktywację oraz indukuje proces utleniania NADH, który prowadzi do zmian w potencjale oksydacyjno-redukcyjnym po obu stronach wewnętrznej błony mitochondrium. Aktywacja cyklu transportu elektronów objawia się w rezultacie wzrostem siły napędowej protonu ($\Delta\mu_H^+$), potencjału elektrycznego błony mitochondrialnej ($\Delta\psi$), ilości ATP oraz zmianą pH cytoplazmy. Jest to jednak tylko hipoteza.

Działanie promieniowania NIR badane jest *in vivo* lub *in vitro*. *In vitro* badane są hodowle tkankowe, komórkowe lub wyizolowane komórki takie jak krew, leukocyty czy trombocyty. *In vivo* światło jest dozowane poprzez skórę albo poprzez światłowód wprowadzany bezpośrednio do naczyń krwionośnych. Z tego też względu istotnym zagadnieniem jest określenie obszaru widmowego, jaki jest absorbowany przez skórę i co wydaje się najważniejsze, jak reagują składniki morfotyczne krwi na ten zakres promieniowania.

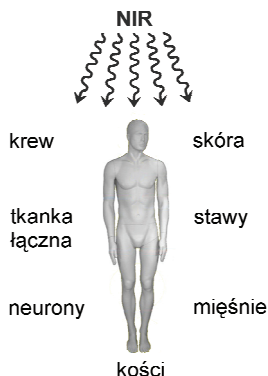
Po ekspozycji na NIR obserwuje się zmiany w erytrocytach, płytkach i leukocytach. Bada się takie parametry, jak zdolność do agregacji, lepkość, odkształcalność, aktywność w przypadku leukocytów i płytek oraz efektywność w przenoszeniu tlenu. Działanie NIR ściśle zależne jest od dawki. Dobierając najefektywniejszą dawkę, obserwuje się zmniejszenie lepkości krwi, co związane jest przede wszystkim z rozpadem rulonów i ich trójwymiarowej struktury. Rysunek 15.9 pokazuje taką strukturę.



Rys. 15.9. Tworzenie rulonów przez komórki erytrocytów ludzkich

Po ekspozycji na NIR część oksyhemoglobiny przechodzi w formę deoksy-, co decyduje o szybszym transporcie tlenu do tkanek. NIR jest także czynnikiem chroniącym komórki krwi przed stresem oksydacyjnym.

Rysunek 15.10 schematycznie pokazuje stosowane w praktyce działanie terapeutyczne światła w medycynie, a w szczególności w procesie rehabilitacji po urazach.



Rys. 15.10. Działanie rehabilitacyjne promieniowania NIR. Wyszczególnione są tkanki szczególnie podatne na działanie terapeutyczne tego zakresu promieniowania [7]

Literatura

- [1] PODBIELSKA H., *Metody optyczne w fizyce środowiska*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1996.
- [2] KOMOROWSKA M., *Fotoprocesy indukowane promieniowaniem z zakresu bliskiej podczerwieni w erytrocytach i modelach błon biologicznych*, Prace Naukowe Instytutu Fizyki Politechniki Wrocławskiej, 35, Seria: Monografie, 24, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 2001.
- [3] KASPRZAK W., MAŃKOWSKA A., *Fizykoterapia, medycyna uzdrowiskowa i SPA*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008.
- [4] OLSZTYŃSKA S., VRIELYNCK L., KOMOROWSKA M., DUPUY N., *Why light therapy is more effective than thermotherapy in rehabilitation?*, Acta Bioeng. Biomech., 2001, Vol. 3, No. 2, 387–391.
- [5] OLSZTYŃSKA S., DZIAMSKA A., KOMOROWSKA M., *Light therapy in mechanic damages*, Acta Bioeng. Biomech., 1999, Vol. 1, 129–133.
- [6] EELLS M.T.T., WONG-RILEY M.T.T., VERHOEVE J., HENRY M., BUCHMAN E.V., KANE M.P., GOULD L.J., DAS R., JETT M., HODGSON B.D., MARGOLISI D., WHELAN H.T., *Mitochondrial signal transduction in accelerated wound and retinal healing by near-infrared light therapy*, Mitochondriom, 2004, Vol. 4, 559–567.
- [7] TANAKA Y., MATSUO K., YUZURIHA S., *Near-infrared irradiation non-thermally affects subcutaneous adipocytes and bones*, Journal of Plastic Surgery, 2001, Vol. 11, 97–105.

IV. Zastosowania terapeutyczne

ROZDZIAŁ 16

PRZYKŁADOWE ZASTOSOWANIA LASERÓW W MEDYCYNIE

Joanna Pucińska, Iwona Hołowacz, Halina Podbielska

Spis treści

16.1. Wstęp	387
16.2. Zastosowania laserów wysokoenergetycznych	388
16.2.1. Lasery w chirurgii	388
16.2.2. Lasery w angioplastyce	393
16.2.3. Lasery w ortopedii	394
16.2.4. Lasery w stomatologii	395
16.2.5. Lasery w okulistyce	396
16.2.6. Lasery w dermatologii	398
16.2.6.1. Terapia laserowa w zmianach naczyniowych	399
16.2.6.2. Usuwanie tatuaży i zmian barwnikowych	400
16.2.6.3. Leczenie łuszczycy	400
16.2.6.4. Laserowe usuwanie owłosienia	400
16.2.6.5. Fotoodmładzanie	401
16.3. Zastosowanie laserów średnio- i niskoenergetycznych	403
16.3.1. Lasery w biostymulacji	403
16.3.2. Lasery w medycynie fotodynamicznej	404
16.3.3. Terapia fototermalna	405

16.1. Wstęp

Na efekt oddziaływania promieniowania laserowego z tkankami wpływ mają zarówno właściwości tkanki (np. współczynniki absorpcji, rozpraszania i anizotropii rozpraszania), jak i parametry promieniowania laserowego (np. długość fali, energia promieniowania, czas trwania impulsu laserowego). W zastosowaniach terapeutycznych wykorzystywane są różnego rodzaju oddziaływania światła z tkanką. Przykładowo odpowiednie dobranie parametrów promieniowania lasera Nd:YAG pozwala na

wywołanie za jego pomocą efektów fototermicznych, fotochemicznych lub fotojonizacyjnych. Poniżej przedstawiono niektóre przykłady wykorzystania laserów w medycynie (patrz tab. 2 na końcu rozdziału). Zastosowanie laserów w leczeniu ma podobnie długą historię, jak sam laser. We współczesnej medycynie lasery stosowane są dość często. Nie sposób wymienić wszystkie zabiegi laserowe. Niniejszy rozdział omawia wybrane przykładowe zastosowania.

16.2. Zastosowania laserów wysokoenergetycznych

16.2.1. Lasery w chirurgii

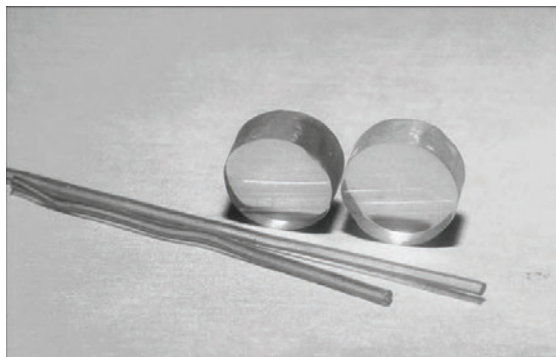
W chirurgii laserowej najczęściej wykorzystuje się procesy fototermiczne (koagulacja, odparowanie tkanki) lub fotoablację [1, 2]. Wzrost temperatury tkanki spowodowany jest zaabsorbowaniem przez nią promieniowania laserowego. Kiedy temperatura przekracza 60 °C, dochodzi do koagulacji, tym samym do destrukcji tkanki. W ten sposób można dokonać zniszczenia zmian patologicznych, przy czym na obrzeżach naświetlanego obszaru dochodzi do zasklepienia włosowatych naczyń krwionośnych. Ponieważ brak bezpośredniego kontaktu narzędzia z tkanką, metoda ta jest całkowicie sterylna. Ponadto krwawienie jest natychmiast tamowane, a niebezpieczeństwo rozsiewu komórek nowotworowych jest znacząco zredukowane [1]. Kolejną zaletą jest czyste pole widzenia, gdyż nie zasłania go żaden instrument [3]. Do koagulacji tkanek w chirurgii ogólnej najczęściej wykorzystuje się lasery pracujące w podczerwieni: laser CO₂ ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$) oraz dwie linie lasera Nd:YAG: $\lambda = 1064 \text{ nm}$ oraz $\lambda = 1320 \text{ nm}$. Jako wskaźnik stosuje się lasery pomocnicze, generujące promieniowanie widzialne o małej mocy (kilku mW). Zwykle są to lasery He-Ne ($\lambda = 632,8 \text{ nm}$) [4] lub półprzewodnikowe ($\lambda = 635 \text{ nm}$).

Jeżeli naświetlany obszar osiągnie temperaturę umożliwiającą przemianę wody zawartej w tkance w parę wodną, to odparowywana woda zabiera ze sobą mikroskopijne fragmenty tkanek [2, 5]. Na powierzchni, na którą działa zogniskowana wiązka laserowa, tworzy się krater otoczony strefą martwicy. Metodę tę stosuje się do cięcia tkanek przy pomocy tzw. lancetu laserowego. Jako lancet najczęściej wykorzystuje się laser CO₂. Promieniowanie tego lasera jest silnie absorbowane przez wodę, co skutkuje niewielką głębokością penetracji promieniowania (do ok. 0,2 mm) i znacznie zwiększa precyzję cięć [1]. Dlatego też lancet CO₂ wykorzystuje się w mikrochirurgii i neurologii. Niestety dużym utrudnieniem jest fakt, iż promieniowanie tego lasera do miejsca zabiegu doprowadzane jest za pomocą sztywnego przegubowego ramienia, tzw. pantografu, zawierającego elementy optyczne [3, 4].

Wciąż jednak poszukuje się falowodów zdolnych transmitować przy małym tłumieniu promieniowanie o długości fali $\lambda = 10,6 \mu\text{m}$. W tym celu można wykorzystać

tw. *hollow fibers*, które są cienkimi pustymi w środku rurkami o powierzchni wewnętrznej pokrytej warstwą odbijającą (np. metaliczną, półprzewodnikową lub strukturą wielowarstwową o wysokim współczynniku odbicia) [6]. Takie rozwiązanie pozwala na lepszą manipulację sondą zabiegową oraz umożliwia sprzężanie laserów CO₂ z aparaturą endoskopową.

Innym rozwiązaniem są światłowody wykonane z halogenków srebra [7, 8]. Światłowody takie wykonane są z różnych związków, np. AgCl, AgBr lub ich modyfikacji. Tego typu włókna badane były m.in. na Uniwersytecie w Tel Awiwie w Grupie profesora Abrahama Katzira [9] (patrz rys. 16.1). Światłowody takie są oferowane także przez firmę Ceramoptec [10].

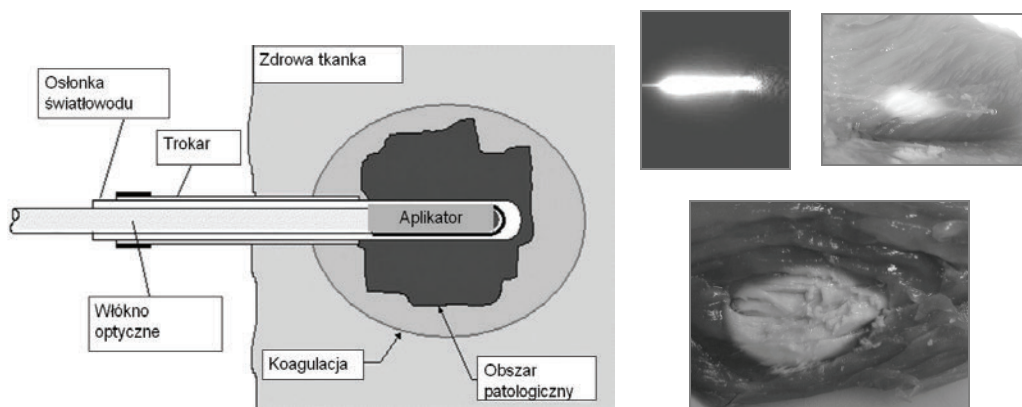


Rys. 16.1. Włókna światłowodowe wykonane z AgClBr [9]

W przypadku lasera Nd:YAG głębokość penetracji wiązki jest zbyt duża (ok. 4 mm), by wykorzystać go jako lancet [1, 4]. Jednak laser ten doskonale nadaje się do koagulacji. Jego promieniowanie odznacza się też dobrym działaniem hemostatycznym, dlatego często wykorzystywany jest do tamowania krwawienia. Dzięki temu możliwe są dziś laserowe zabiegi na tak mocno ukrwionych narządach, jak mózg czy wątroba. Ponadto długość fali 1064 nm jest dobrze transmitowana przez światłowody kwarcowe, co w połączeniu z aparaturą endoskopową umożliwia dostarczenie promieniowania do narządów rurowych. Dzięki powyższym zaletom laser Nd:YAG znalazł także zastosowanie jako źródło światła w interstycjalnej termoterapii laserowej LITT (ang. *Laser-Induced Interstitial Thermotherapy*) [5, 11].

LITT jest metodą leczenia wewnątrznarządowych zmian patologicznych, najczęściej nowotworowych. Polega ona na umieszczeniu wewnątrz tkanki, która ma być zniszczona, światłowodu zakończonego specjalnym aplikatorem [11]. Następnie światłowodem doprowadza się promieniowanie lasera Nd:YAG (1064 nm) lub lasera półprzewodnikowego (z zakresu 800–980 nm). Tkanka, absorbując promieniowanie, nagrzewa się i po osiągnięciu temperatury około 60 °C zostaje skoagulowana. Ponieważ koagulują również naczynia krwionośne, niebezpieczeństwo krwotoku na przykład

z silnie unaczynionego guza jest znacznie mniejsze niż w przypadku tradycyjnych metod chirurgicznych. Ponadto, dzięki wykorzystaniu światłowodów, ta metoda terapii wymaga jedynie minimalnego nacięcia powłok ciała. Kształt i wielkość obszaru koagulacji zależy m.in. od kształtu aplikatora i dostarczonej energii (patrz rys. 16.2).



Rys. 16.2. Schematyczne przedstawienie idei terapii interstycjalnej (po lewej). Po prawej: aplikator światłowodowy skonstruowany w Grupie Bio-Optyki (u góry po lewej) i aplikator w tkance wątroby. Po prawej na dole: obszar skoagulowanej tkanki laserem półprzewodnikowych, 980 nm, czas ekspozycji 5 min, moc wyjściowa 14 W

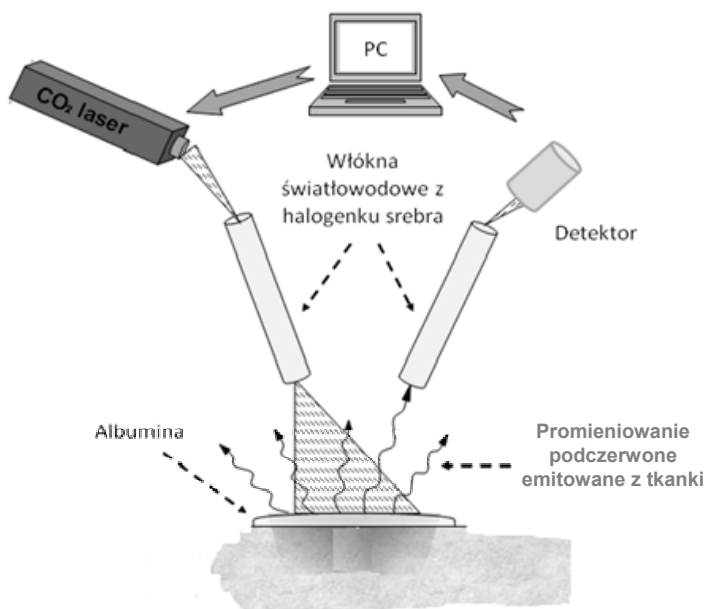
Lasery Nd:YAG stosowane są też do kontaktowej koagulacji tkanki za pomocą rozgrzanego końca światłowodu lub też specjalnej końcówki zakładanej na wyjściu światłowodu [4]. Przy zabiegach endoskopowych, kiedy wymagane jest zastosowanie większych mocy promieniowania, na końcu światłowodów nakładane są końcówki termiczne lub szafirowe. Końcówki termiczne oraz małe końcówki szafirowe znalazły zastosowanie w rekanalizacji naczyń krwionośnych. Natomiast większe końcówki szafirowe świetnie sprawdzają się jako lancet chirurgiczny. Utrzymują bardzo wysoką temperaturę (do ok. 2000 °C), przez co są doskonale sterylne. Końcówki takie chłodzone są wodą, która wypełnia przestrzeń pomiędzy zakończeniem włókna a szafirową końcówką. Układy takie często mają też wbudowany czujnik temperatury, który jest równocześnie akuatorem, czyli po osiągnięciu wymaganej temperatury, na zasadzie *feed back*, laser zostaje wyłączony [12].

Wywołane wiązką laserową podwyższenie temperatury może również posłużyć do zgrzewania fragmentów miękkich tkanek; np. do spawania naczyń krwionośnych lub włókien nerwowych [13]. Główną korzyścią zespajania struktur biologicznych techniką laserową jest brak konieczności wprowadzania ciał obcych np. nici. Ponadto szew pooperacyjny jest szczelny i gładki niż w przypadku tradycyjnego zszywania. Pamiętać należy, że spawanie laserowe zachodzi przy energiach niższych niż te, które prowadzą do odparowania czy zwęglenia tkanki. Temperatura osiągnięta w tkance nie

powoduje jej zniszczenia. Dlatego bardzo ważne jest monitorowanie temperatury podczas zabiegu i wyłączenie lasera w momencie, gdy temperatura zaczyna rosnąć.

Do laserowego łączenia włókien nerwowych stosuje się impulsy lasera CO₂ trwające nie dłużej niż 100 ms [14]. Krótki czas trwania impulsu zapobiega powstawaniu uszkodzeń termicznych. Laser argonowy Ar⁺ również znalazł zastosowanie w spawaniu włókien nerwowych. Promieniowanie tego lasera (np. $\lambda = 488$ nm lub $\lambda = 514$ nm) jest silnie pochłaniane przez chromofory występujące w tkankach ludzkich, przede wszystkim hemoglobinę, mioglobinę i melaninę. Do przywracania ciągłości włókien nerwowych wykorzystuje się także lasery Nd:YAG i lasery diodowe np. o długości fali $\lambda = 980$ nm [15]. Spajanie włókna nerwowego za pomocą lasera może odbywać się w dwojaki sposób: przez bezpośrednie spawanie *epineurium* (najbardziej zewnętrznej warstwy pochewki nerwu zawierającej kolagen typu I i liczne fibroblasty) lub poprzez koagulację komórek krwi lub albuminy użytej jako spoiwo (patrz rys. 16.3).

Trzeba dodać, że w literaturze fachowej w języku angielskim używane są dwa terminy: spawanie tkanek (ang. *tissue welding*) i lutowanie tkanek (ang. *tissue soldering*). Mówiąc o spawaniu mamy najczęściej na myśli łączenie tkanek za pomocą promieniowania laserowego, podczas gdy w lutowaniu tkanek używa się spoiwa, najczęściej w postaci albuminy. Lutowanie tkanek może znaleźć zastosowanie w chirurgii dróg oddechowych [16], w chirurgii plastycznej czy też może zastąpić klasyczne szwy w tkankach skóry [9]. Duży wkład w tę dziedzinę zastosowania laserów w biomedycynie wniosła również grupa profesora Abrahama Katzira [17, 18].



Rys. 16.3. Idea laserowego lutowania przeciętej skóry (przez grzeczność prof. A. Katzira)

W przypadku laserowego łączenia naczyń krwionośnych zastosowanie znalazły lasery: Ar^+ , CO_2 i Nd:YAG. Wszystkie te lasery można z sukcesem wykorzystać do spajania małych naczyń krwionośnych, jednak spawanie większych żył i tętniczek (o średnicy od 3 do 8 mm) udaje się tylko z wykorzystaniem lasera argonowego [19].

Kolejnym ciekawym przykładem zastosowania laserów w medycynie jest litotrypsja laserowa [1, 5], czyli rozbijanie kamieni nerkowych lub kamieni żółciowych. Na skutek działania bardzo krótkich impulsów laserowych (10^{-13} – 10^{-7} s) o dużej gęstości mocy (ponad 10^8 W/cm²) wytwarza się silne pole elektryczne, które powoduje jonizację tkanki [2, 3]. Prowadzi to do powstania obszarów mikroplazmy, która rozszerza się z prędkością ok. 4 km/s, powodując powstanie uderzeniowej fali akustycznej. Lokalne zmiany ciśnienia, wywołane przez rozchodzącą się falę, skutkują powstaniem pęcherzyków kawitacyjnych, które zapadają się po zakończeniu impulsu laserowego. Implozja pęcherzyków wywołuje powstanie kolejnych fal uderzeniowych.

Wytworzone za pomocą impulsów laserowych fale mechaniczne wykorzystuje się do rozbijania złożeń nerkowych i żółciowych. Promieniowanie do miejsca zabiegu doprowadza się światłowodem. Promieniowanie laserowe w efekcie prowadzi do rozkruszenia kamieni na drobne kawałki, które w przypadku złożeń nerkowych mogą być usunięte wraz z moczem. Do litotrypsji najczęściej stosowane są mikrosekundowe impulsy lasera Nd:YAG ($\lambda = 1064$ nm) o energii ok. 30 mJ [1]. Do rozkruszania kamieni stosuje się także laser aleksandrytowy ($\lambda = 750$ nm), którego promieniowanie jest w mniejszym stopniu pochłaniane przez wodę znajdującą się w układzie moczowym [4]. Innym laserem, który ma zastosowanie w litotrypsji jest laser Ho:YAG o długości fali 2,1 μm , który jest często stosowany także w innych zabiegach chirurgii laserowej. Laser ten umożliwia dostarczenie do tkanki mocy około 15 W. Impuls trwa 350 μs , a energia impulsu wynosi 1,5 J [20]. Częstotliwość impulsów jest regulowana w zakresie 5–12 Hz. Wiązka prowadzona jest światłowodem, który musi dotykać powierzchni konkretnych, poddawanego litotrypsji.

W chirurgii laserowej wykorzystuje się też fotoablację za pomocą promieniowania ultrafioletowego [2, 5]. Energia, jaką niesie ze sobą pojedynczy foton takiego promieniowania wystarcza, by rozzerwać wiązania międzycząsteczkowe. W przypadku lasera ArF ($\lambda = 193$ nm) zaabsorbowany przez tkankę foton ma energię 6,4 eV, co przekracza energię wiązań chemicznych większości związków organicznych (2–6 eV). Pod wpływem promieniowania następuje gwałtowne rozerwanie wiązań i wyrzut pewnej części tkanki w postaci pojedynczych cząstek (lub nawet całych fragmentów), co prowadzi do powstania krateru. Grubość warstwy usuwanej pojedynczym impulsem może być mniejsza niż ułamki mikrometrów, co pozwala osiągnąć niebywałą precyzję zabiegu. Natomiast szybkość usuwania tkanki jest w przedziale 10–100 $\mu\text{m/s}$, przy długości trwania impulsu wynoszącej kilka nanosekund. Zatem proces fotoablacji cechuje się brakiem produktów ubocznych (usunięcie tkanki jest całkowite) oraz minimalną strefą uszkodzeń termicznych. Najczęściej fotoablację wykorzystuje się

w oftalmologii do chirurgii refrakcyjnej rogówki i w dermatologii do usuwania zmarszczek (ang. *skin resurfacing*).

Lasery wykorzystywanymi w fotoablacji są lasery ekscymerowe. Dzięki rozwojowi fotoniki opracowano metodę wytwarzania włókien optycznych o rdzeniu z ultraczystego syntetycznego silikonu, które transmitują promieniowanie z zakresu 180–1200 nm [21]. Wykorzystanie światłowodów do doprowadzania promieniowania UV do trudnodostępnych miejsc w ciele pacjenta znacznie zwiększyło możliwości stosowania laserów ekscymerowych. Przykłady konkretnych zastosowań laserów ekscymerowych podano w dalszych częściach rozdziału.

16.2.2. Lasery w angioplastyce

Miażdżycza jest chorobą tętnic, polegającą na powstaniu w ich błonie wewnętrznej i środkowej zmian, prowadzących do zmniejszenia elastyczności ścian i zwężających światło naczyń. Zwężenie światła naczynia jest związane z pojawianiem się blaszek miażdżycowych. Upośledzony przepływ krwi może spowodować powstawanie w naczyniach zakrzepów.

Oprócz wspomnianego w poprzednim podrozdziale spawania naczyń krwionośnych, lasery w angioplastyce stosuje się do usuwania blaszek miażdżycowych i udrażniania naczyń (patrz rys. 16.4). Naczynia można udrożnić np. za pomocą włókna optycznego z odpowiednią końcówką, podłączonego do lasera Nd:YAG. Wykorzystanie natomiast laserów ekscymerowych do udrażniania naczyń krwionośnych znacznie zmniejsza ryzyko wystąpienia uszkodzeń termicznych [3, 22]. Najczęściej stosowanym laserem jest laser ksenonowo-chlorowy XeCl ($\lambda = 308$ nm). Ponieważ jego promieniowanie jest silnie absorbowane przez proteiny, może on również zostać wykorzystany do fotoablacji zakrzepów, czyli do trombolizy laserowej [23]. Należy jednak pamiętać, że promieniowanie UV może wywoływać mutację DNA. Ponadto, poniżej progu ablacji, światło UV może wywoływać niepożądane efekty fotochemiczne [1, 3].



Rys. 16.4. Schemat zastosowania laseroterapii w udrażnianiu naczyń. Światło z lasera prowadzone jest światłowodem do miejsca w naczyniu, gdzie występuje zwężenie z powodu blaszki miażdżycowej

Lasery Ho:YAG również wykorzystuje się do udrażniania naczyń ze względu na silne pochłanianie promieniowania o długości fali 2,1 μm przez wodę [23]. W celu

minimalizacji efektów cieplnych towarzyszących usuwaniu tkanki, wykorzystuje się impulsy o czasie trwania 250 μ s i energii 250–600 mJ.

W przypadku trombolizy laserowej zastosowanie znalazły również lasery barwnikowe [24]. Ich działanie w naczyniach polega na podgrzaniu promieniowaniem laserowym aż do momentu waporyzacji i utworzenia pęcherzyka. Następnie pęcherzyk pęka, niszcząc jednocześnie zakrzep. Jeżeli promieniowanie pada bezpośrednio na zakrzep, również dochodzi to jego destrukcji. Przykładem może być laser barwnikowy emitujący promieniowanie impulsowe o długości fali 577 nm o czasie trwania impulsu 1 μ s i energii impulsu 30–70 mJ.

Oprócz laserów wysokoenergetycznych w kardiologii wykorzystuje się też promieniowanie niskoenergetyczne do wewnątrznaczyniowej laseroterapii. Laseroterapia w kardiologii jest więc wykorzystywana nie tylko do udrażniania naczyń, ale także do leczenia np. pacjentów po wszczepieniu stentów. Zabiegi takie wykonuje się głównie laserami emitującymi promieniowanie w bliskiej podczerwieni lub światło czerwone. Okazuje się, że takie naświetlanie u pacjentów, którym wszczepiono stenty naczyniowe, zapobiega powstaniu restenozy, czyli ponownemu zwężeniu naczynia w miejscu stentowania [25].

16.2.3. Lasery w ortopedii

W celu wydłużenia kończyn w ortopedii stosuje się osteotomię – zabieg chirurgiczny polegający na przecięciu kości. Następnie odłamy kości łączy się ze sobą za pomocą specjalnych urządzeń, które służą wyciąganiu tworzącej się kostniny. Zazwyczaj osteotomia wykonywana jest za pomocą specjalnych pił i wiertel [5]. Powoduje to nie tylko uciążliwe mechaniczne wibracje, ale także może wywołać krwotoki. Zastosowanie do tego celu laserów pozwala na uniknięcie tych efektów ubocznych. Laserem najczęściej stosowanym w ortopedii jest laser Ho:YAG ($\lambda = 2,1 \mu\text{m}$) [26]. Jego promieniowanie wykazuje dobre działanie hemostatyczne i jest silnie absorbowane przez wodę, która stanowi do 20% zawartości kości. Ponadto długość fali $\lambda = 2,1 \mu\text{m}$ może być transmitowana torem światłowodowym, co umożliwia wykorzystanie lasera Ho:YAG do przeprowadzenia zabiegów w wąskich obszarach przestrzeni stawowych [4, 26].

Za pomocą lasera dokonuje się także dyscektomii – usunięcia części jądra miazdzystego krążka międzykręgowego, co redukuje ucisk na struktury kanału kręgowego i związany z tym silny ból [27, 28]. Podczas zabiegu w przestrzeń dyskową wprowadza się światłowód doprowadzający promieniowanie lasera. Za pomocą promieniowania dokonuje się waporyzacji niewielkiej objętości centralnej części dysku. Jest to minimalnie inwazyjna metoda leczenia; nie pozostawia blizn i nie wymaga ogólnego znieczulenia ani hospitalizacji. Laserami dającymi najlepsze wyniki w zabiegach przezskórnej laserowej dekompresji dysku PLDD (ang. *Percutaneous Laser Disc Decompression*) są lasery Nd:YAG/KTP i Ho:YAG.

Podjęto też próby laserowego lutowania kosteczek w aparacie słuchowym [29]. W ortopedii laser stosowane są również do leczenia tkanek śród- i okołostawowych, w szczególności w połączeniu z artroskopią. Takie możliwości oferuje m.in. laser VersaPulse PowerSuite Ho:YAG firmy Lumenis [30].

16.2.4. Lasery w stomatologii

Lasery w stomatologii mogą być używane zarówno w diagnostyce, jak i w terapii. Diagnostyce stomatologicznej poświęcony jest rozdział 14. *Zastosowanie wybranych metod optycznych w praktyce stomatologicznej*. Jeśli chodzi o zastosowania terapeutyczne, lasery stosowane są zarówno do opracowania tkanki twardej, jak i leczenia chorób w jamie ustnej. Impulsami promieniowania laserów erbowych Er:YAG ($\lambda = 2,94 \mu\text{m}$) lub Er, Cr:YSGG¹ ($\lambda = 2,8 \mu\text{m}$) z powodzeniem można zastąpić wiertła dentystyczne [27]. Długości fal generowane przez te lasery są silnie absorbowane przez wodę będącą składnikiem szkliwa i zębiny, co pozwala na usuwanie tych tkanek przy minimalnym efekcie cieplnym. Zaletą stosowania promieniowania laserowego do usuwania zmian próchnicowych jest eliminacja wibracji i gwałtownych zmian temperatury, na które wrażliwe są nerwy zębowe, a także tkanka twarda [5]. Pomaga to bez użycia środków farmakologicznych ograniczyć ból związany z zabiegiem.

W przypadku tkanek miękkich (np. dziąseł) często stosowany w stomatologii jest laser Nd:YAG, którego promieniowanie o właściwościach hemostatycznych zapewnia bezkrwawy zabieg i likwiduje konieczność szycia [3]. To z kolei redukuje ból i przyspiesza gojenie się ran. Natomiast promieniowanie lasera CO₂ stosowane jest m.in. do usuwania włókniaków, brodawczaków, a także w zabiegach przecinania wędzidełek, pogłębienia przedsionka i korekcji przerośniętych dziąseł.

Lasery stosuje się także do wybielania zębów [27]. Lasery diodowe ($\lambda = 810\text{--}980 \text{ nm}$) i laser CO₂ ($\lambda = 10,6 \mu\text{m}$) indukują wybielanie fototermalne, podczas gdy laser Ar⁺ ($\lambda = 514,5 \text{ nm}$) lub KTP ($\lambda = 532 \text{ nm}$) stosowany jest do wybielania fotochemicznego.

Istnieje też szybka i dokładna metoda diagnozowania nawet wczesnych stadiów próchnicy zębów przy pomocy lasera [31]. Wykorzystuje się tu fluorescencję zdemineralizowanych struktur zęba. Sonda emitująca promieniowanie impulsowe lasera diodowego o długości fali $\lambda = 655 \text{ nm}$ jest przesuwana nad powierzchnią zęba. Światło lasera wzbudza fluorescencję tym większą, im bardziej zaawansowana jest próchnica. Sygnał fluorescencyjny jest zbierany i następnie przeliczany na wartości liczbowe odzwierciedlające stopień demineralizacji. W taki właśnie sposób działa komercyjnie dostępne urządzenie DIAGNOdent [32]. Pozwala ono nie tylko na wykrycie, ale i ocenę stopnia zaawansowania próchnicy bez wykonywania zdjęć RTG czy naruszania powierzchni zęba zgłębnikiem.

¹ Er, Cr:YSGG – domieszkowany erbem i chromem granat skandowo-ityrowo-aluminiowy (ang. *Erbium, Chromium doped Yttrium Scandium Gallium Garnet*).

16.2.5. Lasery w okulistyce

W okulistyce wykorzystuje się ablację indukowaną plazmowo [2, 5]. Do jonizacji tkanki dochodzi na skutek działania krótkich impulsów laserowych (do 100 ns) o dużej gęstości mocy ($>10^8$ W/cm²). Promieniowanie laserowe prowadzi do wytworzenia plazmy, która dodatkowo silnie absorbuje padające promieniowanie. Efekt ten wykorzystuje się do usuwania fragmentów struktur oka przy minimalnych zniszczeniach termicznych. Przykładem zastosowania ablacji indukowanej plazmowo jest wykorzystanie impulsów lasera Nd:YAG do wykonania otworu w tęczówce, dzięki czemu zostaje ułatwiony przepływ cieczy wodnistej pomiędzy tylną a przednią komorą [1, 3, 5]. W ten sposób można obniżyć podwyższone ciśnienie wewnątrzgałkowe w przypadku jaskry. Zabieg ten nazwany jest irydotomią laserową. Innym przykładem jest zabieg kapsulotomii tylnej z wykorzystaniem impulsowego lasera Nd:YAG [5]. Jest to zabieg wykonywany w przypadkach zaćmy wtórnej, gdy dochodzi do zmętnienia tylnej torebki soczewki po kilku latach od usunięcia zaćmy i wszczęcia sztucznej soczewki wewnątrzgałkowej. W zabiegu kapsulotomii laserowej w zmętniałej torebce wykonywany jest centralnie mały otwór, dzięki czemu widzenie poprawia się natychmiast po zabiegu.

Omówiony przy okazji litotrypsji efekt fotorozrywania wykorzystuje się również do fragmentacji zmętniałej soczewki [5]. W tym przypadku stosuje się pikosekundowe impulsy lasera Nd:YLF² ($\lambda = 1047$ nm lub 1053 nm) o energii ok. 1 mJ. Zmieniając położenie ogniska wiązki laserowej, chirurg może dokonać fragmentacji całej objętości soczewki bez uszkodzenia torebki soczewkowej.

Za pomocą laserów Ar⁺ i KTP leczy się jaskrę z otwartym kątem [5]. Istniejący w tej chorobie ograniczony drenaż cieczy wodnistej z komory przedniej do kanału Schlemma można usprawnić, wykonując wiele delikatnych otworków w okolicy beleczkowania. Wzrost temperatury w naświetlanych obszarach powoduje lokalne obkurczenie struktur beleczkowych, co ułatwia odpływ cieczy wodnistej i obniża nadmierne ciśnienie wewnątrzgałkowe. Zabieg ten nazywany jest trabekuloplastyką laserową. Ważną zaletą tego zabiegu jest możliwość powtarzania oraz brak powikłań takich, jak stany zapalne czy krwawienia.

W przebiegu retinopatii cukrzycowej na dnie oka rozrastają się nadmiernie naczynia krwionośne (neowaskularyzacja). Ich słabe ściany mogą pękać, co prowadzi do lokalnych krwawień. Zogniskowanie wiązki lasera w tych punktach wywołuje koagulację i zamknięcie nieszczelnych naczyń krwionośnych [33]. Fotokoagulacja jest też metodą leczenia odwarstwienia siatkówki (tzw. laserowe przyklejanie siatkówki). Wykorzystuje się tutaj linię zieloną ($\lambda = 514,5$ nm) lasera Ar⁺, linię żółtą ($\lambda = 568$ nm) i czerwoną ($\lambda = 647$ nm) lasera Kr⁺ lub laser KTP ($\lambda = 532$ nm) [1, 33]. Wymienione

² Nd:YLF – domieszkowany neodymem fluorek litowo-itrowy (ang. *Neodymium-doped Yttrium Lithium Fluoride*).

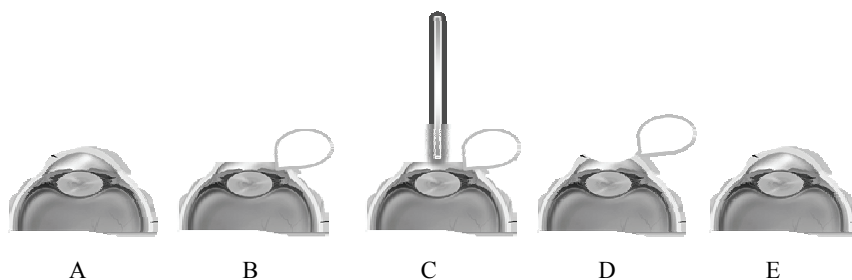
długości fal są silnie absorbowane przez hemoglobinę oraz barwniki nabłonka i naczyńcówkę, a jednocześnie dobrze transmitowane przez rogówkę i soczewkę.

Ostatnio niezwykle rozwój przeżywa chirurgia refrakcyjna rogówki, stosowana przy korekcji widzenia. W chirurgii refrakcyjnej rogówki zastosowanie znajdują lasery neodymowe Nd:YAG i Nd:YLF, powodujące ablację indukowaną plazmowo, laser Ho:YAG wykorzystujący efekt fotociepny i lasery ekscymerowe wykorzystujące fotoablację. W przypadku laserów neodymowych pikosekundowe impulsy dużej mocy wytwarzają plazmę, co w efekcie prowadzi do usunięcia tkanki i spłaszczenia rogówki w naświetlanym miejscu [5]. Impulsami promieniowania lasera Ho:YAG ($\lambda = 2,1 \mu\text{m}$) dokonuje się zabiegu termokeratoplastyki [4, 34]. Technika ta polega na miejscowym lub punktowym koagulowaniu powierzchni rogówki, mając na celu wtórną zmianę jej krzywizny. Naświetlana laserem tkanka podgrzewana jest do temperatury 55–60 °C, co powoduje hydrotermiczne obkurczenie włókien kolagenowych rogówki o ok. 1/3 ich początkowej długości. Technika ta stosowana jest do korekcji nadwzroczności i astygmatyzmu nadwzrocznego.

Jednak najczęściej do zmiany refrakcji rogówki wykorzystuje się efekty fotoablastyczne. Najstarszą i jednocześnie najprostszą w realizacji metodą jest fotokeratektomia refrakcyjna PRK (ang. *PhotoRefractive Keratectomy*) [35, 36]. Polega ona na mechanicznym usunięciu warstwy nabłonka rogówki w centrum, na obszarze o średnicy ok. 6–8 mm, a następnie wykonaniu fotoablastacji, tak aby zmienić jej kształt i przywrócić ostre widzenie. Modelowaniu podlega wierzchnia warstwa rogówki, podczas gdy komórki głębszych jej warstw pozostają nienaruszone.

Metoda LASEK (ang. *LASer Epithelial Keratomileusis*) jest modyfikacją metody PRK. W metodzie LASEK również działa się promieniowaniem lasera na powierzchnię rogówki, zmieniając jej krzywiznę. Jednak, w przeciwieństwie do tradycyjnego PRK, nabłonek nie jest trwale usuwany, ale odpreparowywany przy pomocy 15–20% roztworu alkoholu, zmniejszającego adhezję komórek nabłonka. Po dokonaniu fotoablastacji komórki nabłonka są ponownie rozścielane na powierzchni rogówki i wraz z miękką soczewką kontaktową tworzą opatrunek. Pozwala to zmniejszyć dolegliwości pozabiegowe.

LASIK (ang. *LASer In situ Keratomileusis*) jest obecnie najczęściej stosowaną i najbardziej efektywną metodą leczenia zarówno dużych, jak i małych wad wzroku. W przeciwieństwie do poprzednich metod, LASIK opiera się na modelowaniu laserem wewnętrznych struktur rogówki (obszaru istoty właściwej), nie zaś powierzchni. Podczas zabiegu LASIK używa się mikrokeratomu (automatycznego przyrządu mikrochirurgicznego) do obcięcia płataka rogówki (patrz rys. 16.5). Wytworzony płatek odchyła się, a następnie przeprowadza laserowe modelowanie środkowych warstw rogówki. Na koniec przykrywa się miejsce zabiegu wcześniej odchylonym płakiem, który przyrasta samoczynnie po zabiegu. Powierzchnia rogówki w trakcie zabiegu pozostaje nienaruszona, co znacznie przyspiesza gojenie i stabilizację ostrości widzenia.



Rys. 16.5. Schematyczne przedstawienie zabiegu LASIK. A – oko przed zabiegiem, B – obcięcie płatką rogówki, C – modelowanie rogówki za pomocą lasera, D – rogówka po zabiegu, E – nałożenie płatką po zabiegu

Unowocześnieniem tej metody jest tak zwany FemtoLASIK (lub *All-Laser LASIK*), gdzie nie tylko sam zabieg zmiany krzywizny rogówki jest wykonywany przy użyciu lasera, ale również odseparowanie płatką rogówki odbywa się techniką laserową [37]. Do wykonania nacięcia w tkance stosowany jest laser femtosekundowy np. $\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$ o długości fali z zakresu bliskiej podczerwieni ($\lambda = 1040 \text{ nm}$), powodujący efekt fotorozrywania [38].

Dodatkowo, w przypadku wszystkich powyższych metod możliwe jest wykorzystanie systemów komputerowych w celu zwiększenia precyzji zabiegu [36]. Pomiarowe urządzenia optoelektroniczne mogą zapisywać dane dotyczące rozkładu krzywizny rogówki, a następnie przesyłać je do komputera sterującego laserem ekscymerowym. Poza zwiększeniem dokładności zabiegu, automatyzacja oznacza skrócenie czasu jego trwania. Zakres wad korygowanych za pomocą poszczególnych metod przedstawia tab. 1.

W chirurgii refrakcyjnej najczęściej stosowanym laserem ekscymerowym jest laser ArF, emitujący promieniowanie o długości fali $\lambda = 193 \text{ nm}$ i pracujący w zakresie częstotliwości 50–200 Hz. Energia pojedynczego impulsu tego lasera zawiera się w przedziale 0,2–0,3 J, a czas trwania impulsu nie przekracza 20 ns [2, 39, 40].

Tabela 1. Zakres wad korygowanych rutynowo za pomocą poszczególnych metod (na podstawie [3, 36])

Wada	PRK/LASEK	LASIK
Krótkowzroczność	od -1 D do -8 D	od -1 D do -10 D
Nadwzroczność	od +1 D do +3 D	od +1 D do +6 D
Astygmatyzm	do 2,5 D	do 6 D

16.2.6. Lasery w dermatologii

Leon Goldman pierwszy opublikował dane na temat oddziaływania lasera rubinowego na skórę [41]. W 1964 roku skonstruowano nowe typy laserów: argonowy

i CO₂, które do tej pory są często stosowane w leczeniu chorób skóry. W pierwszych latach laseroterapii w dermatologii najpoważniejszym powikłaniem było bliznowacenie po zabiegu, ostatnie postępy w konstrukcji laserów doprowadziły do zminimalizowania tego typu powikłań.

Intensywna reakcja cieplna powoduje zniszczenie tkanek, które zaabsorbowały promieniowanie laserowe. Takie zniszczenie tkanek docelowych nazwane zostało w 1983 r., przez Andersona i Parrisha selektywną fototermolizą [42]. Ponieważ selektywna absorpcja światła laserowego powoduje wybiórcze zniszczenie tkanki, może być to wykorzystane do selektywnego usuwania zmian skórnych poprzez odpowiedni dobór promieniowania laserowego [43].

Dermatologia jest dziedziną, w której po raz pierwszy użyto do leczenia lasera. Również dzisiaj lasery wciąż są używane, a wraz z rozwojem technologii, pojawiły się nowe możliwości.

16.2.6.1. Terapia laserowa w zmianach naczyniowych

Rozwój technologii laserowych wywarł duży wpływ na leczenie nabytych oraz wrodzonych zmian naczyniowych. Jak wiadomo, hemoglobina dobrze absorbuje promieniowanie o długości fali 418, 542 i 577 nm, a także w zakresie od 800 do 1100 nm. Energia promieniowania laserowego może wywołać koagulację. Powoduje to zamykanie naczyń krwionośnych. Do leczenia zmian naczyniowych stosuje się impulsowy laser barwnikowy (ang. *Pulse Dye Laser* PDL) o długości fali 585 nm lub 595 nm, o czasie trwania impulsu od 0,45 do 40 ms. Przy stosowaniu większych dawek energii lasera konieczne jest chłodzenie skóry. Krótsze impulsy wykorzystuje się przy małych naczyniach, takich jak naczyniaki płaskie, natomiast dłuższe impulsy stosowane są do leczenia rozszerzonych naczyń, teleangiektazji o większych rozmiarach. Czynnikiem ograniczającym zastosowanie laserów barwnikowych jest głębokość penetracji promieniowania (nadają się do zmian powierzchniowych).

Teleangiektazje są to znaczne rozszerzenia naczyń krwionośnych w skórze. Zmiany te dobrze poddają się leczeniu za pomocą lasera KTP (druga harmoniczna lasera Nd:YAG). Emitowane promieniowanie o długości fali 532 nm jest w zakresie bliskim maksimum absorpcji hemoglobiny (542 nm). Można też stosować leczenie za pomocą lasera Nd:YAG (1064 nm) [44].

Zastosowanie w leczeniu zmian naczyniowych mają także inne lasery; np. laser diodowy 800 nm, laser aleksandrytowy 755 nm, laser Nd:YAG – 1064 nm. Promieniowanie laserowe o większej długości fali może wnikać do głębiej położonych naczyń krwionośnych, jednak wiąże się to z mniejszą absorpcją hemoglobiny.

W dermatologii stosuje się też nielaserowe źródła światła. Systemy IPL (ang. *Intense Pulsed Light*) są źródłami światła polichromatycznego, generują promieniowanie o długościach fali od 420 do 1400 nm.

16.2.6.2. Usuwanie tatuaży i zmian barwnikowych

W procesie usuwania tatuaży chromoforem absorbującym światło lasera są drobne cząstki tuszu, który został użyty do wykonania tatuażu. Cząstki te znajdują się wewnątrz makrofagów lub są rozprzestrzenione pozakomórkowo w obrębie skóry właściwej. Promieniowanie laserowe powoduje, że cząsteczki tuszu rozpadają się na mniejsze drobiny, które są usuwane przez makrofagi skóry. W celu zminimalizowania efektów termicznych w sąsiadujących tkankach stosowane są impulsy o wysokiej energii; o czasie trwania impulsu rzędu nanosekund. Takie promieniowanie wytwarzane jest w laserach *Q-switched*, czyli takich, w których emisja światła następuje tylko wtedy, kiedy promieniowane osiągnie wystarczająco wysoką energię.

U osób z jasną karnacją do usuwania tatuaży ciemnoniebieskich oraz czarnych stosuje się laser aleksandrytowy tzw. *Q-switched* (755 nm), *Q-switched* laser rubinowy (694 nm) lub *Q-switched* laser Nd:YAG (1064 nm). U osób z ciemną karnacją stosuje się lasery emitujące promieniowanie o większej długości fali, głównie jest wykorzystywany laser Nd:YAG *Q-switched* (1064 nm). Do usuwania tatuaży czerwonych najlepiej nadaje się *Q-switched* laser Nd:YAG o podwojonej częstotliwości (532 nm). Tatuaże o kolorze zielonym usuwa się za pomocą lasera rubinowego *Q-switched* (694 nm) [45].

W leczeniu łagodnych zmian barwnikowych absorberem jest melanina. Promieniowanie laserowe jest pochłaniane przez cząsteczki melaniny. Zastosowanie znajdują tu lasery *Q-switched*: Nd:YAG (532 nm), rubinowy (694 nm), laser aleksandrytowy (755 nm) [46].

16.2.6.3. Leczenie łuszczycy

Nie ma obecnie laserowej metody leczenia łuszczycy stosowanej rutynowo w klinice, aczkolwiek podejmowane są różne próby. Działanie przeciwluszczycowe wykazuje promieniowanie z zakresu UVB. Laser ekscymerowy (308 nm) i inne źródła światła w zakresie UVB powodują apoptozę komórek zapalnych typu T, uszkodzenie DNA, zmniejszenie liczby komórek Langerhansa, co może spowodować zmniejszenie ognisk łuszczycy [47]. Za pomocą promieniowania laserowego podczerwonego z lasera CO₂ lub Er:YAG można dokonać ablacji blaszek łuszczycowych [48].

W leczeniu łuszczycy próbuje się też stosować terapię fotodynamiczną. Na ten temat istnieje wiele doniesień [49].

16.2.6.4. Laserowe usuwanie owłosienia

Promieniowanie laserowe może być wykorzystane do niszczenia mieszków włosowych [50]. Proces fotoepilacji polega na pochłonięciu przez melaninę zawartą w łodydze włosa, promieniowania oraz rozproszeniu uzyskanego ciepła do tkanek sąsiadują-

cych (zjawisko fototermolizy selektywnej). Ciepło to powoduje uszkodzenie mieszka włosowego oraz komórek macierzystych, biorących udział w procesie tworzenia nowego włosa. Fotoepilacji ulegają jedynie włosy, które mają wystarczającą ilość melaniminy. Włos musi być w fazie wzrostu (anagen). Niszczenie fototermiczne można zrealizować za pomocą lasera rubinowego (694 nm), lasera aleksandrytowego (755 nm), impulsowych laserów diodowych (800 nm), lasera Nd:YAG (1064 nm) oraz wykorzystując system IPL w zakresie 500–1200 nm.

Inną metodą jest usuwanie owłosienia poprzez fale uderzeniowe lub gwałtowną kawitację. Destrukcja spowodowana jest małymi miejscowymi eksplozjami pod wpływem impulsów lasera np. *Q-switched* Nd:YAG. Stosuje się tu laser *Q-switched*.

Trzecim mechanizmem jest destrukcja fotochemiczna polegająca na wytworzeniu toksycznego tlenu singletowego lub wolnych rodników za pomocą terapii fotodynamicznej [51].

16.2.6.5. Fotoodmładzanie

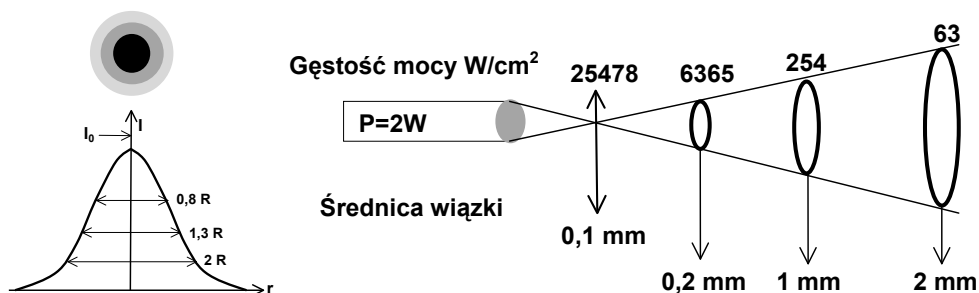
Z wiekiem fibroblasty produkują coraz mniej kolagenu i elastyny, które odpowiadają za jędrność skóry oraz wolniej odnawiają się komórki naskórka. Skóra staje się mniej sprężysta i powstają zmarszczki. Lasery coraz częściej znajdują zastosowanie w zabiegach fotoodmładzania.

Pod wpływem promieniowania wytwarzanego przez laser CO₂ (10600 nm) następują efekty fototermiczne, powodujące regenerację włókien kolagenowych; skrócenie prawie o 1/3 długości. To z kolei powoduje pogrubienie skóry oraz jej wygładzenie. Laser ten stosowany jest do bezpośredniego usuwania zmarszczek oraz blizn potrądzikowych (ang. *laser resurfacing*), a remodelowanie kolagenu jest późniejszym efektem zabiegu [52].

Do usuwania zmarszczek nadaje się też laser Er:YAG, za pomocą którego można również usunąć łagodne zmiany pigmentacyjne i blizny po trądziku. Długość fali 2940 nm jest bardzo dobrze absorbowana przez wodę zawartą w tkankach. Energia impulsu dochodzi do 0,8 J, a częstotliwość wynosi 0,5–2,0 Hz. Laser ten umożliwia precyzyjne usuwanie cienkich warstw skóry, również w przypadku ciemnej karnacji. Zabieg laserem Er:YAG w połączeniu z laserem CO₂ umożliwia precyzyjne usunięcie naskórka i wywołanie efektu regeneracji kolagenu (ang. *collagen remodeling*) [53].

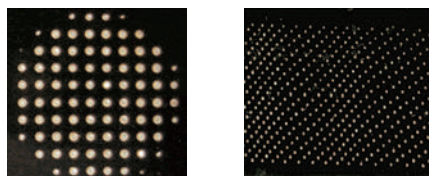
W laserowej chirurgii kosmetycznej problem stanowi dostarczenie światła do tkanek w taki sposób, aby osiągnąć jak najlepszy efekt, który jest zależny m.in. dawki czyli od gęstości (mocy) energii. W zabiegach fotoodmładzania konieczne jest utrzymanie stałej kontrolowanej dawki na powierzchni skóry. Jak wiadomo, promień laserowy nie ma stałego przekroju (patrz rozdział 5. *Podstawy działania laserów* i rozdział 6. *Przeгляд laserów*). Wynika z tego, że energia dostarczana do tkanki docelowej może być różna w zależności od odległości od przewężenia wiązki (lub ogniska, jeżeli w biegu

wiązki znajduje się soczewka). Ponadto energia wiązki gaussowskiej nie jest stała na przekroju wiązki (patrz rys. 16.6).



Rys. 16.6. Rozkład natężenia w wiązce gaussowskiej (po lewej). Gęstość mocy zogniskowanej wiązki laserowej w zależności od odległości od ogniska (po prawej)

Lasery najnowszej generacji zapewniają dostarczenie do skóry energii w sposób kontrolowany we frakcjonowanych wiązkach. Działanie laserów frakcyjnych polega na wywołaniu fragmentarycznych, mikroskopijnych uszkodzeń (ang. *microthermal treatment zones* MTZ) spowodowanych podgrzaniem tkanek. Powstanie takich mikrouszkodzeń (150–250 na cm^2) stymuluje naturalne procesy naprawcze tkanek. Te strefy mikroszkodzeń mogą dochodzić do 1 mm w głąb skóry. Pacjent o wiele szybciej wraca do normalnego funkcjonowania, a sam prawie zabieg nie powoduje efektów ubocznych. Lasery frakcyjne wykorzystuje się do usuwania blizn potrądzikowych, odmładzania skóry szyi, dekoltu oraz dłoni, usuwania drobnych zmarszczek twarzy, szczególnie wokół oczu, zamykania rozszerzonych porów, odnowy uszkodzonej przez słońce skóry, usuwania przebarwień i blizn [54, 55]. Czasami łączy się zabiegi laserem frakcyjnym z klasyczną techniką ablacji.



Rys. 16.7. Równomierny rozkład identycznych mikrosplotów wykonanych laserem frakcyjnym (po prawej) w porównaniu do rozkładu mikrosplotów uzyskanych z pomocą lasera wyposażonego w matrycę soczewek (po lewej)

Laser Fraxel SR1550 zbudowany na włóknach światłowodowych domieszkowanych erbem, emituje światło o długości fali 1550 nm. Wyposażony jest w inteligentny system optycznego skanowania (ang. *Intelligent Optical Tracking™ System* IOTS), który zapewnia równomierny rozkład stref MTZ na skórze (patrz rys. 16.7) [56].

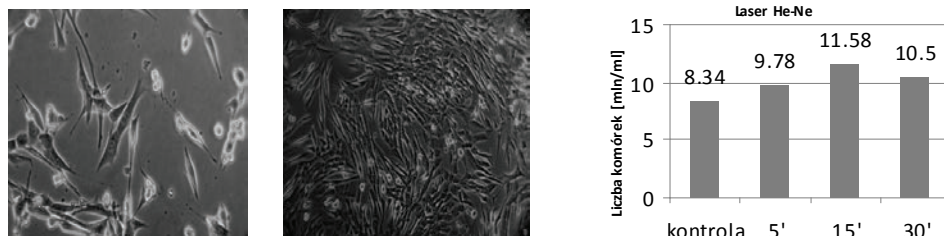
16.3. Zastosowanie laserów średnio- i niskoenergetycznych

16.3.1. Lasery w biostymulacji

W medycynie fizykalnej wykorzystuje się różne bodźce fizykalne, aby wywołać reakcje w tkankach, prowadzące w efekcie do regeneracji, zmniejszenia bólu, ustąpienia stanów zapalnych. Czynnikiem fizykalnym może być promieniowanie laserowe o energii niepowodującej zmian destrukcyjnych w tkance. Tę dziedzinę fizjoterapii nazywamy laseroterapią niskoenergetyczną LLLT (ang. *Low Level Laser Therapy*) bądź biostymulacją laserową. Miejsca zmienione chorobowo naświetla się wiązką laserową o długości fal przypadających na tzw. okienko optyczne skóry 600–1100 nm. W biostymulacji wykorzystywano kiedyś najczęściej He-Ne. Obecnie stosuje się głównie lasery półprzewodnikowe: galowo-aluminiowo-arsenowe (GaAlAs) o długości fali 820 nm i 830 nm oraz galowo-arsenowe (GaAs) o długości fali 904 nm [57]. Najkorzystniej działa biostymulująco promieniowanie laserowe o gęstościach energii od 1 do 12 J/cm².

Dawki energii dostarczane do organizmu nie powodują efektów fototermicznych, ale przemiany fotobiochemiczne, a następnie reakcje biologiczne. Światło działa na cytochromy w mitochondriach, aktywując zmiany energetyczne w komórce, zmiany poziomów niektórych enzymów, szczególnie odpowiedzialnych za działania przeciwnadcienne [58].

Efektom działania promieniowania jest wzrost aktywności i zwiększenie liczby fibroblastów oraz przyspieszenie syntezy kolagenu. Rezultatem jest szybsze gojenie tkanki łącznej (patrz rys. 16.8).



Rys. 16.8. Naświetlanie przez 5 dni laserem He-Ne hodowli fibroblastów.

Po lewej: hodowla przed naświetlaniem, w środku po naświetlaniu przez 15 minut codziennie.

Kontrola: hodowle nienaświetlane (badania Grupy Bio-Optyki)

Promieniowanie laserowe wpływa także na osteoblasty, przyspieszając regenerację tkanki kostnej. Pod wpływem światła laserowego zwiększa się zawartość wapnia i gęstość beleczek kostnych. Notuje się wzrost aktywności i liczebności limfocytów T, co powoduje podniesienie bariery immunologicznej. Efektem naświetlania jest także

wzrost poziomu endorfin, które mają działanie przeciwbólowe. Miejscowe uwalnianie serotoniny z płytek krwi powoduje obkurczenie naczyń krwionośnych, a zmiana stężenia histaminy i heparyny umożliwia poprawę krążenia i zmniejszenie obrzęków pourazowych. Biostymulacyjne promieniowanie laserowe ma działanie przeciwbólowe, przeciwzapalne oraz stymulujące.

Do wykonywania zabiegów biostymulacji laserowej stosuje się sondy punktowe, pryzmnicowe lub sondy wyposażone w skaner. Stosuje się dwie techniki naświetlania promieniowaniem laserowym: kontaktową i bezkontaktową [59]. Ostatnio pojawiły się doniesienia na temat biostymulacji wysokoenergetycznej HILT (ang. *High Intensity Laser Therapy*) [60]. Stosuje się podobne dawki, ale moc wyjściowa laserów jest wyższa (ponad 1 W) niż w przypadku LLLT (mniej niż 0,5 W).

16.3.2. Lasery w medycynie fotodynamicznej

Tematyka medycyny fotodynamicznej została szerzej omówiona w rozdziale 13. *Fotodiagnostyka medyczna w czasie rzeczywistym. Aparatura i aplikacje kliniczne* i w rozdziale 17. *Terapia fotodynamiczna*.

Idea medycyny fotodynamicznej opiera się na interakcji światła i światłoczułacza [61]. Zaaplikowany miejscowo lub ogólnoustrojowo światłoczułacz gromadzi się selektywnie w chorych tkankach. Następnie aktywowany jest światłem o długości fali dopasowanej do widma absorpcji. Mechanizmy oddziaływania fotodynamicznego na tkankę należą do efektów fotochemicznych [2, 3].

Światłoczułacze to najczęściej pochodne porfiryn [61]. Oznacza to, że posiadają one dwa charakterystyczne obszary absorpcji: pasmo Soreta oraz pasma Q [62, 63]. Pasma Soreta leżące w zakresie 390–425 nm wykorzystywane jest do diagnostyki fotodynamicznej. Pasma Q zaś, przypadające na zakres światła widzialnego z przedziału 480–700 nm, wykorzystywane są w terapii fotodynamicznej.

Diagnostyka fotodynamiczna PDD (ang. *Photodynamic Diagnosis*) jest metodą lokalizacji zmian patologicznych oraz określania stopnia ich zaawansowania [61, 64]. Najczęściej dotyczy to zmian nowotworowych. Zgromadzony w tkankach barwnik oświetla się światłem dostrojonym do jego pasma Soreta. Molekuły światłoczułacza są w ten sposób wzbudzone bez wytwarzania ciepła. Wzbudzone cząstki relaksują do stanu podstawowego, emitując foton. Obserwuje się zatem fluorescencję obszarów, w których zgromadził się barwnik. Do laserów wykorzystywanych jako źródła światła w PDD należą laser Kr^+ ($\lambda = 406,7\text{--}422,6$ nm) oraz laser N_2 ($\lambda = 337$ nm) [1]. Za ich pomocą można wzbudzić np. czerwoną fluorescencję protoporfiryny PpIX (Kr^+) lub pochodnych hematoporfiryny HpD (N_2 i Kr^+) [61].

Terapia fotodynamiczna PDT (ang. *Photodynamic Therapy*) jest metodą leczenia zmian patologicznych [61, 65]. W tym przypadku aktywacja światłoczułacza daje początek reakcjom fotocytotoksycznym. Wzbudzone cząsteczki światłoczułacza

oddają nadmiar energii cząstkom tlenu w stanie trypletowym. Prowadzi to do powstania reaktywnych form tlenu (tlenu singletowego i wolnych rodników tlenowych), które powodują destrukcję struktur komórkowych w oświetlanym obszarze. Metoda ta pozwala na selektywne niszczenie zmian chorobowych.

W terapii fotodynamicznej lasery są ważnym źródłem promieniowania ze względu na dobrze określoną długość fali i kontrolowane parametry energetyczne. W PDT najczęściej wykorzystuje się lasery barwnikowe [66]. Ponieważ lasery te są przestrajalne, istnieje możliwość wzbudzania za ich pomocą różnych światłouczulaczy. Przykładowo, laser barwnikowy pompowany laserem Ar^+ może generować promieniowanie do wzbudzania HpD przy 630 nm, PpIX przy 635 nm oraz m-THCP³ przy 652 nm. Przy pomocy lasera barwnikowego pompowanego laserem KTP można wzbudzić HpD i ALA⁴ (635 nm). Niestety takie systemy laserowe są dość rozbudowane, wymagają zewnętrznego chłodzenia oraz osobnego źródła zasilania. Są także kosztowne.

Od niedawna do wzbudzania fotouczulaczy wykorzystuje się lasery półprzewodnikowe [66]. W roku 2000 laser emitujący falę $\lambda = 630$ nm, wyprodukowany przez firmę Diomed został zatwierdzony przez Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków (ang. *Food and Drug Administration*) jako źródło światła do aktywowania Photofrinu w leczeniu nowotworów przełyku i płuc. W Europie natomiast zatwierdzono stosowanie diody laserowej firmy Biolitec o $\lambda = 652$ nm do wzbudzania Foscanu. Systemy półprzewodnikowe są tańsze, łatwiejsze w obsłudze i zajmują mniej miejsca. Nie wymagają także specjalnych zasilaczy ani dodatkowego systemu chłodzenia. Jednak każda dioda laserowa emituje określoną długość fali, co oznacza, że może ona wzbudzać tylko jeden rodzaj fotouczulacza.

16.3.3. Terapia fototermalna

Lasery generujące promieniowanie z zakresu bliskiej podczerwieni stosuje się jako źródła światła w terapii fototermalnej [67]. Polega ona na podaniu pacjentowi nanocząstek metali np. nanocząstek złota, a następnie podgrzewaniu ich za pomocą światła laserowego. Do powierzchni nanocząstek przyłącza się odpowiednie ligandy np. przeciwciała, dzięki czemu akumulacja materiału zachodzi tylko w tkance chorobowo zmienionej. Długość fali promieniowania laserowego musi być dopasowana do maksimum absorpcji nanocząstek. Nanocząstki nagrzewając się pod wpływem promieniowania laserowego, niszczą otaczającą patologiczną tkankę. Jako źródła promieniowania stosuje się lasery półprzewodnikowe ($\lambda = 800$ nm) lub laser szafirowy $\text{Ti}:\text{Al}_2\text{O}_3$ ($\lambda = 800$ nm).

³ m-THCP – meta-tetrahydroksyfenyl-chlorin (FoscanTM).

⁴ ALA – kwas amino lewulinowy (5-aminolevulinic acid).

Tabela 2. Przykłady laserów stosowanych w medycynie (na podstawie [2, 4, 27])

Laser	Długość fali	Parametry	Dział medycyny	Zastosowanie
1	2	3	4	5
ArF (ekscymerowy)	193 nm	praca impulsowa $E_{imp} = 0,2-0,3$ J $t_{imp} < 20$ ns $f_{imp} = 200$ Hz	okulistyka	chirurgia refrakcyjna rogówki
XeCl (ekscymerowy)	308 nm	praca impulsowa $E_{imp} = 0,2-0,3$ J $t_{imp} < 20$ ns $f_{imp} = 200$ Hz	angioplastyka	usuwanie skrzepów i blaszek miażdżycowych, leczenie łuszczycy
Ar ⁺ (argonowy)	488 nm 514 nm (podstawowe linie)	praca ciągła $P = 1-20$ W	okulistyka angioplastyka neurologia dermatologia stomatologia rehabilitacja	fotokoagulacja siatkówki trabekuloplastyka spawanie naczyń krwionośnych spawanie włókien nerwowych usuwanie znamion wybielanie zębów biostymulacja
KTP/Nd:YAG	532 nm	praca impulsowa $E_{imp} = 0,2-0,3$ J $t_{imp} < 250$ μ s $f_{imp} = 20$ kHz praca ciągła $P = 1-10$ W	okulistyka chirurgia ogólna stomatologia dermatologia	fotokoagulacja siatkówki trabekuloplastyka koagulacja wybielanie zębów usuwanie znamion i tatuaży
He-Ne	632,8 nm	praca ciągła $P = 1-20$ mW	reumatologia jak laser wskaźnikowy	biostymulacja
Barwnikowe (np. rodaminowe)	400-800 nm przestrzajalne	praca ciągła $P = 1-100$ W	PDT angioplastyka dermatologia	wzbudzenie światłoczułaczy udrażnianie naczyń usuwanie znamion naczyniowych
Półprzewodnikowe np. GALAs	630-980 nm	praca impulsowa $P = 10-30$ W $t_{imp} = 100-200$ ns $f_{imp} = 10$ Hz-10 kHz praca ciągła typowa moc $P = 1-40$ mW	chirurgia ogólna neurochirurgia stomatologia rehabilitacja PDT stomatologia biostymulacja terapia fototermalna	LITT spawanie włókien nerwowych diagnostyka próchnicy wybielanie zębów wzbudzenie światłoczułaczy wybielanie zębów usuwanie znamion naczyniowych usuwanie guzów
Cr:BeAl ₂ O ₄ (aleksandrytowy)	700-830 nm (głównie 750 nm)	praca impulsowa $E_{imp} < 0,2$ J $t_{imp} = 0,3$ μ s $f_{imp} = 10$ Hz	urologia dermatologia	litotrypsja usuwanie owłosienia i tatuaży

1	2	3	4	5
Nd:YAG (neodymowy)	1064 nm 1320 nm	praca impulsowa $E_{\text{imp}} < 100 \text{ mJ}$ $t_{\text{imp}} < 10 \text{ ns}$ $f_{\text{imp}} = 1 \text{ Hz}$ praca ciągła $P < 100 \text{ W}$	chirurgia ogólna angioplastyka urologia stomatologia ortopedia okulistyka dermatologia	koagulacja naczyń krwionośnych i zmian patologicznych LITT udrażnianie naczyń krwionośnych litotrypsja koagulacja tkanek miękkich dyscektomia irydotomia laserowa kapsulotomia laserowa chirurgia refrakcyjna rogówki usuwanie owłosienia i tatuaży
Ho:YAG (holmowy)	2100 nm	praca impulsowa $E_{\text{imp}} < 2 \text{ J}$ $t_{\text{imp}} = 250 \text{ }\mu\text{s}$ $f_{\text{imp}} = 10 \text{ kHz}$	angioplastyka ortopedia okulistyka urologia	usuwanie skrzepów i blaszek miażdżycowych osteotomia i dyscektomia termo keratoplastyka litotrypsja
Er:YAG (erbowy)	2940 nm	praca impulsowa $E_{\text{imp}} < 1 \text{ J}$ $t_{\text{imp}} = 250 \text{ }\mu\text{s}$ $f_{\text{imp}} = 5 \text{ kHz}$	stomatologia dermatologia	wiertło laserowe fotoodmładzanie
CO ₂ (na dwutlenku węgla)	10,6 μm	praca impulsowa $E_{\text{imp}} = 0,25 \text{ J}$ $t_{\text{imp}} = 10\text{--}600 \text{ }\mu\text{s}$ $f_{\text{imp}} = 1\text{--}1000 \text{ Hz}$ praca ciągła $P = 30\text{--}50 \text{ W}$	chirurgia ogólna angioplastyka neurochirurgia ortopedia dermatologia	koagulacja zmian patologicznych lancet laserowy spawanie naczyń krwionośnych i włókien nerwowych dyscektomia fotopdmładzanie, leczenie łuszczycy

Literatura

- [1] GAWLIK W., *Zastosowanie światła laserowego w diagnostyce i terapii*, [w:] Fizyczne metody diagnostyki medycznej i terapii, pod red. A.Z. Hrynkiwicz, E. Rokity, PWN, Warszawa 2000.
- [2] PODBIELSKA H., *Metody optyczne w fizyce środowiska*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1996.
- [3] BEDNARKIEWICZ A., STRĘK W., *Oddziaływanie światła laserowego z tkanką*, [w:] Diagnostyka i terapia fotodynamiczna, pod red. H. Podbielskiej, A. Sieronia, W. Stręka, Wydawnictwo medyczne Urban i Partner, Wrocław 2004.
- [4] *Zarys klinicznych zastosowań laserów*, pod red. P. Fiedora, T. Kęcika, Z. Niechody, W. Nowakowskiego, M. Nowickiego, W. Otto, M. Pirożyńskiego, E. Stanowskiego, Dom Wydawniczy Ankar, Warszawa 1995.
- [5] NIEMZ M.H., *Laser-Tissue Interactions. Fundamentals and Applications*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg 1996.
- [6] TEMELKURAN B., HART S.D., BEOIT G., JOANNOPOULUS J.D., FINK Y., *Wavelength-scalable hollow optical fibres with large photonic bandgaps for CO₂ laser transmission*, Nature, 2002, Vol. 420, 650–653.

- [7] SHALEM S., KATZIR A., *Core-clad silver halide fibers with few modes and a broad transmission in the mid-infrared*, Opt. Lett., 2005, Vol. 30, 1929–1931.
- [8] GRILLE R., MARTIN G., LABADIE L., AREZKI B., KERN P., LEWI T., TSUN A., KATZIR A., *Single mode mid-infrared silver halide asymmetric flat waveguide obtained from crystal extrusion*, Opt. Express, 2009, Vol. 17, 12516–12522.
- [9] <http://www.tau.ac.il/~applphys/>
- [10] http://www.ceramoptec.com/products/sub_content.asp?SubnavID=13&ThirdNavID=10
- [11] MÜLLER G., ROGGAN A., *Laser-induced interstitial thermotherapy*, SPIE Press, 1995.
- [12] WONG B., MILNER T., ANVARI B., SVIRIDOV A., OMEL'CHENKO A., AGRATASHVILI V., SOBOL E., NELSON J., *Measurement of radiometric surface temperature and integrated back-scattered light intensity during feedback-controlled laser-assisted cartilage reshaping*, Lasers in Medical Science, 1998, Vol. 13, 66–72.
- [13] JÓŻWICKI R., *Technika laserowa i jej zastosowanie*, Oficyna Wydawnicza Politechniki Warszawskiej, Warszawa 2009.
- [14] MENKOVSKY T., BEEK J.F., THOMSEN S.L., *Laser(-assisted) nerve repair. A review*, Neurosurgical Review, 1995, Vol. 18, No. 4, 225–235.
- [15] EL-KHARBOTLY A., EL-WAKIL T.F., *In-Vivo Experimental Study of Facial Nerve Repair by Diode Laser (980 nm) Welding Vs Microstructuring: Functional and Histopathological Evaluations*, Egyptian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery, 2003, Vol. 27, No. 2, 239–247.
- [16] ABERGEL A., GABAY I., FLISS D.M., KATZIR A., GIL Z., *A Multi-wavelength Fiber-Optic Temperature-Controlled Laser Soldering System for Upper Aerodigestive Tract Reconstruction: An Animal Model*, Otolaryngol. Head Neck Surg., 2011, Vol. 144, No. 6, 872–876.
- [17] http://www.tau.ac.il/~applphys/research_welding.htm
- [18] SIMHON D., HALPERN M., BROSH T., VASILYEV T., RAVID A., TENNENBAUM T., NEVO Z., KATZIR A., *Immediate tight sealing of skin incisions using an innovative temperature controlled laser soldering device: in-vivo study in porcine skin*, Ann. Surg., 2007, Vol. 245, No. 2, 206–213.
- [19] WHITE R.A., *Technical frontiers for the vascular surgeon: laser anastomotic welding and angioscopy-assisted intraluminal instrumentation*, Journal of Vascular Surgery, 1987, Vol. 5, No. 4, 673–680.
- [20] <http://www.stonelightlaser.com/technicalspecifications/>
- [21] <http://www.oxford-electronics.com>
- [22] BITTL J.A., SANBORN T.A., *Excimer Laser-Facilitated Coronary Angioplasty Relative Risk Analysis of Acute and Follow-up Results in 200 Patients*, Circulation, 1992, Vol. 86, No. 1, 71–80.
- [23] <http://omlc.ogi.edu/projects/lt/#Pulsedlaserthrombolysis>
- [24] SHANGGUAN H., GREGORY K.W., CASPERSON L.W., PHRAL S.A., *Enhanced Laser Thrombolysis With Photomechanical Drug Delivery: An In Vitro Study*, Lasers in Surgery and Medicine, 1998, Vol. 23, 151–160.
- [25] DERKACZ A., PROTASIEWICZ M., KIPSHIDZE N., BIAŁY D., PORĘBA R., BERES-PAWLIK E., ABRAMSKI K., MAZUREK W.: *Endoluminal photo-therapy for prevention of restenosis. Preliminary result at 6-month follow-up*, Photomed Laser Surg., 2005, Vol. 23, 536–542.
- [26] <http://www.surgical.lumenis.com/orthopedics>
- [27] PENG Q., JUZENIENE A., CHEN J., O SVAASAND L., WARLOE T., GIERCHSKY K.-E., MOAN J., *Lasers in medicine*, Reports on Progress in Physics, 2008, Vol. 71, 1–28.
- [28] <http://emedicine.medscape.com/article/1145539-overview>
- [29] MOON SUH PARK, HUN KI MIN, *Laser Soldering and Welding for Ossicular Reconstruction: An in Vitro Test*, Otolaryngol Head Neck Surg, 2000, Vol. 122, No. 6, 803–807.
- [30] <http://www.surgical.lumenis.com/versapulse>
- [31] http://www.sharonalbrightdds.com/dental_facts/tooth-cavity-detection.html
- [32] <http://www.kavo.pl>

- [33] JAMROZY-WITKOWSKA A., GRABSKA-LIBEREK I., *Laseroterapia w retinopatii cukrzycowej*, Postępy Nauk Medycznych, 2009, Vol. 6, 433–437.
- [34] http://www.visionrx.com/Library/enc/enc_ltkeratoplasty.asp
- [35] <http://www.oko.info.pl>
- [36] <http://www.lexum.cz>
- [37] <http://www.nowywzrok.pl>
- [38] <http://okulistyka.consultronix.pl/>
- [39] <http://www.wavelight.com>
- [40] <http://www.bausch.com>
- [41] GOLDMAN L. et al., *Effect of the laser beam on the skin: preliminary report*, J. Invest. Dermatol., 1963, Vol. 40, 121–122.
- [42] ANDERSON R.R., PARRISH J.A., *Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation*, Science, 1983, Vol. 220, No. 4596, 524–527.
- [43] GIBSON K., KERNOHAN W., *Laser in Medicine*, Journal of Medical Engineering, 1993, Vol. 17, 51–57.
- [44] ROHRER T., GERONEMUS R., BERLIN A., *Zmiany naczyniowe, Lasery i światło*, Tom 1, pod red. Goldberg D. Rohrer T., 1–16, wyd. I polskie, red. A. Kaszuba, Elsevier Urban & Partner Wrocław 2010.
- [45] ADRIAN R.M., GRIFFIN L., *Laser tattoo removal*, Clinics In Plastic Surgery, 2000, Vol. 27, 181–192.
- [46] WHEELAND R., MARMUR E., *Zmiany barwnikowe i tatuaże, Lasery i światło*, pod red. Goldberg D., Elsevier Urban & Partner Wrocław 2010, 29–52.
- [47] ASAWANONDA P., ANDERSON R., CHANG Y., TAYLOR C.H., *308-nm Excimer Laser for the Treatment of Psoriasis A Dose-Response Study*, Arch Dermatol., 2000, Vol. 136, 619–624.
- [48] ALORA M.B., ANDERSON R.R., QUINN T.R., TAYLOR C.R., *CO₂ laser resurfacing of psoriatic plaques: a pilot study*, Lasers-Surg-Med, 1998, Vol. 22, No. 3, 165–70.
- [49] ZYCHOWICZ J., PODBIELSKA H., KANIOWSKA E., *Możliwości wykorzystania oddziaływania fotodynamicznego w leczeniu łuszczycy*, W: Diagnostyka i terapia fotodynamiczna, Red. H. Podbielska, A. Sieroń, W. Stręć, Wrocław: Urban & Partner 2004, 355–374.
- [50] AMIN S.P., GOLDBERG D.J., *Clinical comparasion of four hair removal lasers and light sources*, Journal of Cosmetic and Laser Therapy, 2006, Vol. 8, 65–68.
- [51] TUDAJ A., PODBIELSKA H., GAWLIK J., *Fotodynamiczne usuwanie włosów*, W: Diagnostyka i terapia fotodynamiczna, Red. H. Podbielska, A. Sieroń, W. Stręć, Wrocław: Urban & Partner 2004, 339–354.
- [52] BORZĘCKI A., CIELICA W., *Zastosowanie lasera CO₂ w praktyce dermatologicznej*, Nowa Medycyna 2000, Zeszyt 107.
- [53] FITZPATRICK R., GOLDMAN M., *Laserowa chirurgia kosmetyczna*, red. Andrzej Kaszuba, Elsevier Urban & Partner, Wrocław 2004.
- [54] <http://www.fraxel.com>
- [55] GERONEMUS R.G., *Fractional photothermolysis: current and future applications*, Lasers Surg Med., 2006, Vol. 38, 169–176.
- [56] <http://www.einneuesgesicht.com/test/downloads/il%20trattamento%20laser%20fraxel.pdf>
- [57] SIEROŃ A., CIEŚLAR G., ADAMEK M., *Magnetoterapia i laseroterapia*, Śl. AM, Katowice 1994, 33–91.
- [58] KARU T.I., LUBART R., (Eds.) *Effects of Low Power Light on Biological Systems V*, SPIE, Vol. 4159, 2000.
- [59] KASPRZAK W., MAŃKOWSKA A., *Fizykoterapia, medycyna uzdrowiskowa i SPA*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2008.

- [60] ŁUKOWICZ M., PAWLAK A., PAWLIKOWSKI J., WEBER-ZIMMERMANN M., ZALEWSKI P., *Laseroterapia wysokoenergetyczna (HILT) – zastosowania kliniczne*, *Inżynieria Biomedyczna*, Acta Bio-Optica et Informatica Medica, 2007, Vol. 13, 326–330.
- [61] TUDAJ A., PODBIELSKA H., ZYCHOWICZ J., STRĘK W., *Światło leczy – wprowadzenie do terapii i diagnostyki fotodynamicznej*, [w:] *Diagnostyka i terapia fotodynamiczna*, pod red. H. Podbielskiej, A. Sieronia, W. Stręka, Wydawnictwo medyczne Urban i Partner, Wrocław 2004.
- [62] MILGROM L., *The Colours of Life: An Introduction to the Chemistry of Porphyrins and Related Compounds*, Oxford University Press 1997.
- [63] ŻAK I., *Porfiryny i pochodne*, [w:] *Chemia medyczna* pod red. I. Żak, Śląska Akademia Medyczna, Katowice 2001.
- [64] LADNER D., STEINER R., ALLEMANN J., HALLER U., WALT H., *Photodynamic diagnosis of breast tumours after oral application of aminolevulinic acid*, *British Journal of Cancer*, 2001, Vol. 84, No. 1, 33–37.
- [65] MACCORMACK M., *Photodynamic Therapy*, *Advances in Dermatology*, 2006, Vol. 22, 219–258.
- [66] MANG T., *Lasers and light sources for PDT: past, present and future*, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004, Vol. 1, 43–48.
- [67] HUANG X., EL-SAYED I.H. QIAN W., EL-SAYED M.A., *Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods*, *Journal of American Chemical Society*, 2006, Vol. 128, 2115–2120.

IV. Zastosowania terapeutyczne

ROZDZIAŁ 17 TERAPIA FOTODYNAMICZNA

Aleksander Sieroń, Grzegorz Cieślak

Spis treści

17.1. Charakterystyka i mechanizmy terapii fotodynamicznej	411
17.2. Metodyka terapii fotodynamicznej	414
17.2.1. Fotoczułaczki stosowane w terapii fotodynamicznej	414
17.2.2. Aparatura stosowana w terapii fotodynamicznej	415
17.2.3. Procedura wykonywania zabiegów terapii fotodynamicznej	418
17.3. Zastosowania kliniczne terapii fotodynamicznej	419
17.3.1. Choroby skóry	419
17.3.2. Choroby błony śluzowej jamy ustnej i górnych dróg oddechowych	422
17.3.3. Choroby naczyń	424
17.3.4. Choroby płuc	424
17.3.5. Choroby narządu wzroku	425
17.3.6. Choroby przewodu pokarmowego	425
17.3.7. Choroby dróg moczowych	425
17.3.8. Choroby żeńskiego narządu rodowego	426
17.3.9. Choroby układu kostnego	426
17.4. Ograniczenia i perspektywy terapii fotodynamicznej	427

17.1. Charakterystyka i mechanizmy terapii fotodynamicznej

Podstawowym problemem w onkologii jest opracowanie metody leczniczej, która umożliwiałaby skuteczne i selektywne niszczenie komórek nowotworowych, bez uszkodzenia zdrowych tkanek organizmu. Stosowane dotychczas metody operacyjne nie zawsze pozwalają na doszczętne usunięcie całej masy komórek nowotworowych, a jednocześnie związane są z dużym ryzykiem powikłań (krwotoki śródoperacyjne, znieczulenie). Z kolei chemio- i radioterapia są metodami cytotoksycznymi o relatyw-

nie niespecyficznym charakterze odpowiedzi tkanek, co może powodować uszkodzenia nie tylko zmienionych patologicznie tkanek guza, ale także tkanek zdrowych.

Próbie rozwiązania tego problemu stanowi prowadzone od ponad 30 lat wdrażanie do praktyki klinicznej małoinwazyjnej metody leczenia nowotworów opartej na wzbudzeniu pod wpływem absorbowanego światła o określonej długości fali fotouczulacza (głównie pochodnych hematoporfiryn), selektywnie gromadzącego się w zmienionych nowotworowo tkankach, co w obecności tlenu prowadzi do nasilonej destrukcji tych tkanek na drodze kilku dobrze udokumentowanych mechanizmów. Metoda ta nazywana jest terapią fotodynamiczną (PDT).

Wyniki badań klinicznych z ostatnich kilkunastu lat wskazują, że w niektórych typach nowotworów efektywność terapii fotodynamicznej jest porównywalna z obecnie stosowanymi konwencjonalnymi metodami leczenia onkologicznego (chirurgia, chemioterapia, radioterapia), szczególnie we wczesnych stadiach rozwoju powierzchownie zlokalizowanych zmian nowotworowych o niewielkich rozmiarach. Terapia fotodynamiczna jest również z powodzeniem stosowana w paliatywnym leczeniu nowotworów o wyższym stopniu zaawansowania, często w połączeniu z innymi metodami terapeutycznymi [1, 2, 3].

Istotne znaczenie dla efektywności i bezpieczeństwa terapii fotodynamicznej ma fakt, że dzięki poprzedzającej procedurę terapeutyczną diagnostyce fotodynamicznej możliwe jest dokładne zlokalizowanie nawet niewielkich ognisk nowotworowych (a tym samym precyzyjne ich naświetlanie), co uwzględniając dodatkowo fakt wybiórczego gromadzenia się fotouczulacza w zmienionych patologicznie tkankach, pozwala na selektywne niszczenie tkanek neoplastycznych, bez uszkodzenia otaczających tkanek zdrowych.

Fotouczulacze gromadzą się w guzach nowotworowych w stężeniu kilkunastokrotnie większym niż w tkance zdrowej, co wynika z właściwości tkanki nowotworowej, w tym m.in. [1–3]:

- odmiennego składu fosfolipidowego błony komórkowej,
- dużej liczby błonowych receptorów dla lipoprotein niskiej gęstości (LDL),
- nietypowego unaczynienia guza,
- mikrośrodowisko guza charakteryzującego się niskim pH i hipoksją (niedotlenieniem).

Hydrofobowy charakter roztworów wodnych cząsteczek o wysokim stopniu agregacji (do których należą oligomery hematoporfiryn) powoduje, że mają one tendencję do gromadzenia się w obszarach o podwyższonej koncentracji lipoprotein niskiej gęstości (LDL) i cholesterolu, a takie właśnie obszary występują w komórkach nowotworowych, których komórki wykazują wzmożone zapotrzebowanie na materiał do budowy błon komórkowych. Ponadto w komórkach nowotworowych dochodzi do intensyfikacji procesu czynnego przenoszenia pochodnych hematoporfiryny przez białka błon komórkowych [1, 2]. Wykazano przy tym, że poszczególne pochodne hematoporfiryn wykazują powinowactwo do różnych typów histologicznych nowotworów – w zależności od rodzaju przyłączonego łańcucha aminokwasowego. Zwięk-

szeniu stężenia fotouczulacza we wnętrzu guza nowotworowego sprzyja również fakt, że upośledzenie krążenia wokół guza utrudnia proces eliminacji pochłoniętych agregatów fotouczulacza, a jego nasiloną retencją potęgowana jest przez występującą we wnętrzu guza hipoksję, niskie pH, dużą liczbę infiltrujących makrofagów oraz dużą zawartość nowo syntetyzowanego kolagenu [4].

Zgodnie z aktualnym stanem wiedzy do podstawowych mechanizmów leczniczego działania terapii fotodynamicznej należą m.in. [1, 2, 5, 6, 7, 8]:

- bezpośrednia reakcja fotouczulacza ze składnikami komórek, prowadząca do powstania aktywnych rodników nadtlenkowych lub hydroksyloowych, inicjujących proces martwicy lub apoptozy (bezpośredni efekt cytotoksyczny),
- reakcja pośrednia związana z wytwarzaniem wolnych rodników nadtlenkowych i tlenu singletowego z następowym utlenianiem substratów prowadzącym do uszkodzenia głównie błony komórkowej oraz błon organelli komórkowych (szczególnie mitochondriów i lizosomów),
- okluzja naczyń zaopatrujących naświetlaną tkankę guza,
- modulacja aktywności układu immunologicznego wywołana zmianą antygenowości komórek nowotworowych, pozwalająca na ich identyfikację i niszczenie przez komórki immunokompetentne,
- zmiany strukturalno-receptorowe błony komórkowej powodujące osłabienie właściwości adhezyjnych komórek neoplastycznych, a tym samym ich zdolności do przerzutów.

Fotouczulacz po absorpcji światła o określonej długości fali odpowiadającej jego pasmu pochłaniania promieniowania, przechodzi do wzbudzonego stanu elektronowego o znacznie wyższej niż stan podstawowy reaktywności. Powstający początkowo singletowy stan wzbudzony (o wszystkich spinach elektronowych sparowanych) ulega następnie konwersji do stanu trypletowego (forma wzbudzona o 2 spinach niesparowanych), który charakteryzuje się znacznie dłuższym czasem życia [1, 2].

Występujące w tkankach w stanie trypletowym cząsteczki fotouczulacza biorą udział w procesie fotodynamicznego utleniania. W początkowej fazie proces fotodynamiczny może przebiegać dwutorowo: poprzez bezpośrednie oddziaływanie wzbudzonego światłem fotouczulacza (tzw. I typ reakcji) lub poprzez transfer energii pomiędzy wzbudzonym fotouczulaczem a rozpuszczonym w tkankach tlenem (tzw. II typ reakcji) [1, 2].

W reakcjach typu I przebiegających głównie w warunkach niedoboru tlenu, fotouczulacz we wzbudzonym stanie trypletowym oddziałuje bezpośrednio z substratem, powodując powstanie aktywnych rodników nadtlenkowych (O_2^- i O_2^{2-}) i hydroksyloowych (OH^*). Rodniki te są utleniaczami i reagują ze związkami posiadającymi wiązania podwójne (aminy aromatyczne, fenole, nienasycone kwasy tłuszczowe), inicjując proces niszczenia komórek nowotworowych.

W zdarzających się znacznie częściej reakcjach typu II, w wyniku transferu energii pomiędzy fotouczulaczem we wzbudzonym stanie trypletowym a tlenem w trypletowym stanie podstawowym dochodzi do generacji wzbudzonego tlenu singletowego, który jest

aktywnym utleniaczem, inicjującym cykl reakcji prowadzących do destrukcji tkanek. Punktem uchwytu tlenu singletowego są błony komórkowe, w których wywołuje on reakcje utleniania cholesterolu i nienasyconych kwasów tłuszczowych do wodorotlenków, utleniania siarczków do sulfotlenków oraz utleniania aminokwasów aromatycznych (histrydyna i tryptofan). Ostatecznym efektem reakcji fotodynamicznego utleniania jest uszkodzenie białek, kwasów nukleinowych i lipidowych, struktur błon komórkowych i organelli komórkowych, co powoduje nadmierną ich przepuszczalność i depolaryzację potencjału błonowego, a w konsekwencji zaburzenia gradientów stężeń jonowych i zaburzenia metabolizmu, prowadzące w konsekwencji do śmierci komórek.

W dotychczasowych badaniach nie wykazano oporności tkanek na terapię fotodynamiczną, co pozwala na utrzymanie wysokiej skuteczności leczenia nawet przy wielokrotnym powtarzaniu zabiegów (np. w przypadku wznowy procesu nowotworowego) [8]. Terapia fotodynamiczna nie ma działania mutagennego i nie powoduje powstawania nowotworów wtórnych, co istotnie różni ją od niektórych metod leczenia, np. radioterapii [9].

Podczas stosowania zabiegów PDT nie obserwuje się istotnych działań ubocznych, wpływających na obniżenie efektywności i bezpieczeństwa stosowania tej metody. Jedynymi objawami niepożądanymi terapii fotodynamicznej może być w niektórych przypadkach bolesność w okolicy naświetlanej zmiany chorobowej (zwykle dobrze reagująca na podawane miejscowo lub ogólnie środki znieczulające) oraz nadwrażliwość skóry i narządu wzroku na światło będąca po kumulacji fotouczulacza, która w różnym stopniu może utrzymywać się przez kilka tygodni po jego podaniu. Stosowanie zabezpieczeń pod postacią unikania ekspozycji na światło oraz osłaniania skóry i używania okularów przeciwsłonecznych z odpowiednimi filtrami powoduje, że nie istnieją istotne ograniczenia możliwości stosowania tej metody. Ponadto stosowanie fotouczulaczy nowszej generacji charakteryzujących się krótkim czasem klirensu osocznego (usuwania z osocza) i półtrwania w tkankach umożliwia skrócenie czasu nadwrażliwości skóry do kilku dni [10].

17.2. Metodyka terapii fotodynamicznej

17.2.1. Fotouczulacze stosowane w terapii fotodynamicznej

Fotouczulacze stosowane obecnie w terapii fotodynamicznej to barwniki, które z biochemicznego punktu widzenia należą do [1, 2, 8, 11]:

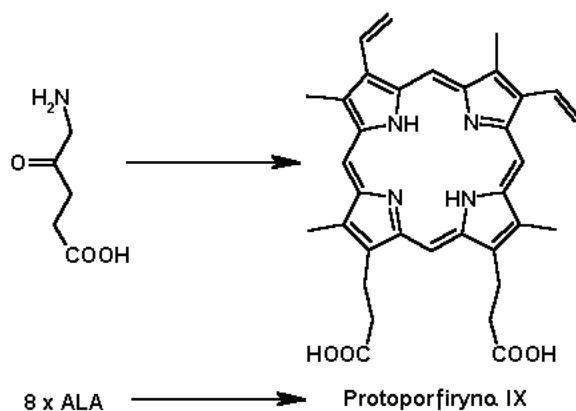
- pochodnych hematoporfiryny
- pochodnych rodaminy,
- pochodnych ftalocjanin,
- pochodnych chlorofilu.

Spośród licznych fotouczulaczy egzogennych w terapii fotodynamicznej najczęściej wykorzystywane są pochodne hematoporfiryny (*hematoporphyrin derivatives* – HpD) stanowiące mieszaninę hematoporfiryny, hydroksyetylowinylodeuteroporfiryny i protoporfiryny, a także wyizolowane związki o charakterze dimerów lub wyższych oligomerów hematoporfiryn, w tym m.in. następujące preparaty:

- kwas delta-aminolewulinowy (ALA), ulegający konwersji do protoporfiryny IX,
- Photofrin[®] I i II (Axcan Pharma Inc., Kanada),
- Photosan[®] (Seelab, Niemcy),
- Photochlorin[®] (Rada Pharma, Rosja),
- Toocad[®] (Steba Laboratories Ltd., Izrael).

Fotouczulacze stosowane w PDT aplikowane są w formie preparatów doustnych oraz parenteralnie w postaci iniekcji dożylnych, roztworów wodnych do podawania dopecherzowego, a także maści i past nakładanych bezpośrednio na zmiany chorobowe zlokalizowane na powierzchni skóry lub błon śluzowych.

Na rysunku 17.1 przedstawiona została konwersja kwasu delta-aminolewulinowego (ALA) do substancji czynnej – protoporfiryny IX, stanowiąca podstawę terapeutycznego wykorzystania tego fotouczulacza.



Rys. 17.1. Konwersja kwasu delta-aminolewulinowego (ALA) do protoporfiryny IX

17.2.2. Aparatura stosowana w terapii fotodynamicznej

W jest praktyce klinicznej do terapii fotodynamicznej używane są różne zestawy aparaturowe, m.in. wymienione poniżej:

- Coherent Lambda PDL Plus (laser barwnikowy: długość fali 630–690 nm; moc 1,5 W) (Coherent Inc., USA),
- Diomed 630 PDT (laser diodowy: długość fali 630 nm; moc 1,5 W) (Diomed Ltd., USA),

- Ceram Optec (laser diodowy: długość fali 633 nm; moc 2,0 W) (CeramOptec® Industries, Inc., USA),
- Laser Secura (laser diodowy: długość fali 662 nm; moc 1,5 W) (Laser Secura Systems sp. z o.o., Polska).

Na rysunkach 17.2 i 17.3 zostały przedstawione przykładowe zestawy aparaturowe do terapii fotodynamicznej, wykorzystywane w Pracowni Diagnostyki i Terapii Laserowej Oddziału Klinicznego Chorób Wewnętrznych Angiologii i Medycyny Fizykalnej Śląskiego Uniwersytetu Medycznego w Bytomiu.

W zestawach do terapii fotodynamicznej wykorzystywane są źródła światła różnego typu, w tym m.in.:

- lasery barwnikowe, w tym działające na rodaminie i parach złota,
- lasery diodowe,
- lasery helowo-neonowe,
- lasery argonowe,
- źródła światła generowanego przez półprzewodnikowe diody LED,
- lampy ksenonowe i rtęciowe z odpowiednimi filtrami.

W zależności od spektrum pasma absorpcji stosowanego fotouczulacza stosowane są odpowiednie źródła światła. Przykładowo w przypadku pochodnych hematoporfiryn (będących obecnie podstawowym barwnikiem wykorzystywanym w terapii fotodynamicznej), których największa głębokość penetracji światła (5–15 mm) występuje w paśmie absorpcji pochłaniania dla fali o długości 630 nm, jako źródło światła stosowane są lampy ksenonowe i rtęciowe z odpowiednimi filtrami lub lasery generujące promieniowanie o długości fali w zakresie 625–640 nm [2].



Rys. 17.2. Aparatura do terapii fotodynamicznej firmy Ceram Optec



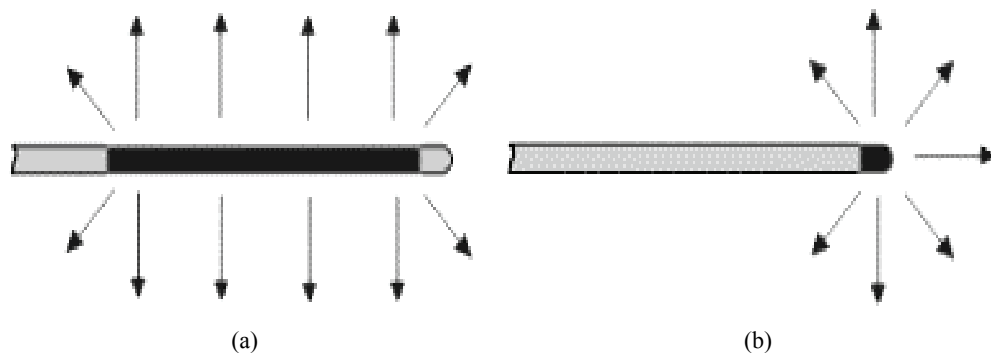
Rys. 17.3. Aparatura do terapii fotodynamicznej firmy Laser Secura

W ostatnich latach jako źródło światła najczęściej wykorzystywane jest promieniowanie laserowe pozwalające na uzyskiwanie powtarzalnych i mierzalnych dawek promieniowania o ściśle określonej długości fali i stosunkowo wysokiej gęstości energii [1, 2]. Promieniowanie laserowe łatwo prowadzić przez światłowody do wnętrza organizmu, za pomocą światłowodu umieszczonego w endoskopie lub nawet w igle prowadzącej. Metody terapii fotodynamicznej można podzielić na:

- terapię skóry i błon śluzowych dostępnych bezpośrednio, bez konieczności wykorzystywania technik endoskopowych,
- terapię jam ciała z wykorzystaniem technik endoskopowych (aplikacja światła do zmian chorobowych za pośrednictwem światłowodów),
- terapię śródmiąższową (interstycjalną) – z wykorzystaniem lub bez wykorzystania dodatkowego obrazowania zmian chorobowych (aplikacja światła za pośrednictwem światłowodów wprowadzanych bezpośrednio do zmienionych chorobowo tkanek).

W dwóch ostatnich metodach w zestawach aparaturowych, niezależnie od źródła światła, wykorzystywany jest dodatkowy osprzęt w postaci endoskopów, światłowodów oraz specjalnych aplikatorów – dyfuzorów umożliwiających równomierne naświetlanie tkanek np. w obrębie ściany narządów wewnętrznych (np. żołądek, jelito, pęcherz moczowy).

Na rysunku 17.4 przedstawione zostały schematycznie dyfuzory stosowane do naświetlania ściany jelita (po stronie lewej) oraz pęcherza moczowego (po stronie prawej).



Rys. 17.4. Schemat dyfuzorów stosowanych do naświetlania jelita grubego (a) oraz pęcherza moczowego (b)

17.2.3. Procedura wykonywania zabiegów terapii fotodynamicznej

Leczenie metodą fotodynamiczną rozpoczyna się zwykle od dożylnego podania wodnego roztworu fotouczulacza, obecnie najczęściej pochodnych hematoporfiryny w dawce 2,5–5 mg/kg masy ciała, który jest rozprawdany drogą krwionośną po całym organizmie i po 24–72 godzinach gromadzi się głównie w tkance nowotworowej. Należy pamiętać, że zwiększoną retencją (czyli pochłanianie) fotouczulacza stwierdza się także w skórze oraz niektórych narządach wewnętrznych, charakteryzujących się szczególnym powinowactwem do barwników hematoporfirynowych, np. w takich jak: wątroba, nerki i śledziona [2, 12, 13, 14].

Naświetlania prowadzone są zwykle 24–72 godziny po dożylnym podaniu fotouczulacza, po uprzedniej precyzyjnej lokalizacji zmian chorobowych i określeniu ich rozległości za pomocą diagnostyki fotodynamicznej.

Typowe dawki energii pozwalające na uzyskanie efektu cytotoksycznego w tkance nowotworowej mieszczą się w przedziale 10–250 J/cm² (najczęściej 25–100 J/cm²), średnia gęstość mocy wynosi zwykle 15–300 mW/cm², a przeciętny czas naświetlania 15–30 minut. W przypadku użycia jako fotouczulacza pochodnych hematoporfiryny stosowane jest promieniowanie o długości fali 625–640 nm [2, 12–14].

W przypadku użycia promieniowania o większej mocy (200–300 mW), w stosunkowo krótkim czasie uzyskuje się wzrost temperatury wewnątrz guza do około 45–50 °C, co powoduje nakładanie się na efekt fotodynamiczny dodatkowego czynnika hipertermicznego. Z powyższego powodu, w przypadku guzów o dużej objętości stosowanie odpowiedniej procedury naświetlań pozwala na niszczenie powierzchniowej warstwy guza w wyniku działania fotodynamicznego, a jego głębszych warstw w następstwie działania termicznego [1, 2].

Zabiegi powtarzane są zwykle w odstępach 7–14-dniowych, przy czym ich całkowita liczba zależy od postaci histologicznej nowotworu, rozmiarów zmiany chorobowej, stopnia ukrwienia tkanki i stężenia tlenu cząsteczkowego w naświetlanej tkance, a także głębokości penetracji promieniowania świetlnego [1, 2].

W specyficznych lokalizacjach zmian chorobowych, w których istnieje możliwość miejscowej aplikacji fotouczulacza bezpośrednio na zmianę chorobową, terapia wygląda nieco inaczej [2, 12–14]. W przypadku chorób skóry stosowana jest najczęściej miejscowa aplikacja ALA (w postaci 10% pasty) na zmianę chorobową i okolice z marginesem ok. 2 mm. Po 5–12 (maksymalnie 24) godzinach zmiana skórna naświetlana jest światłem laserowym o długości fali 635 nm aż do osiągnięcia łącznej dawki 100–200 J/cm².

Z kolei w przypadku leukoplakii i paliatywnego leczenia nowotworów błony śluzowej górnych dróg oddechowych stosowana jest zarówno parenteralna aplikacja fotouczulacza, jak i miejscowa aplikacja ALA (w postaci 20% pasty). Naświetlanie prowadzone jest zwykle w sposób frakcjonowany w znieczuleniu miejscowym, 5–7 razy w odstępach 10–14-dniowych.

W przypadku nowotworów pęcherza moczowego roztwór np. kwasu delta-aminolewulinowego zwykle o stężeniu nie większym niż 3% (powyżej tego stężenia terapia fotodynamiczna może być odczuwana przez niektórych pacjentów jako bolesna, a ponadto może prowadzić do obkurczenia pęcherza moczowego, a co za tym idzie mniejszej penetracji światła w głąb zmiany nowotworowej) podawany jest dopecherzowo. Po około godzinnej instilacji (wlewce dopecherzowej) zmiana naświetlana jest przy użyciu światłowodu wprowadzonego do pęcherza za pomocą cystoskopu. Zmniejszenie nasilenia dolegliwości bólowych można uzyskać poprzez miejscowe podanie 2% roztworu lignokainy około 40 minut przed rozpoczęciem zabiegu.

Ze względu na nadwrażliwość skóry i narządu wzroku na działanie światła słonecznego po doustnym i parenteralnym podaniu światła uczulaczy, w trakcie procedury terapii fotodynamicznej, po wykonaniu zabiegu wymagane jest zwykle przebywanie pacjentów przez kilka dni w zacienionych pomieszczeniach [1–3, 8].

17.3. Zastosowania kliniczne terapii fotodynamicznej

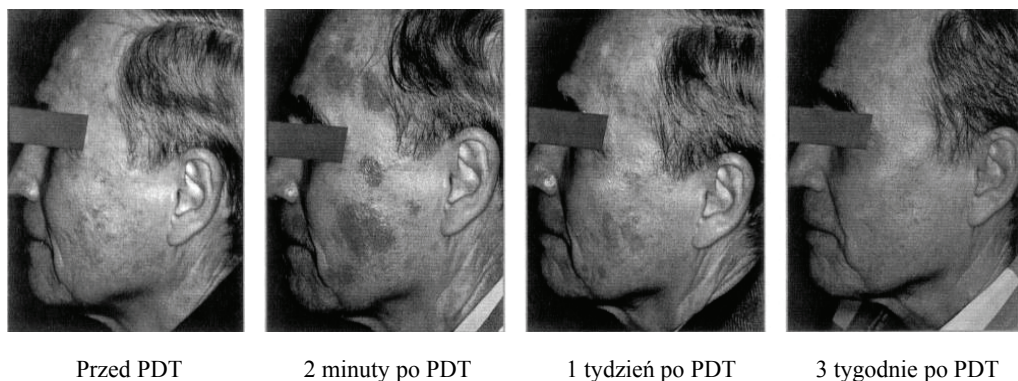
17.3.1. Choroby skóry

Aktualne wskazania do stosowania terapii fotodynamicznej w dermatologii obejmują m.in. następujące schorzenia [12, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22]:

- stany przednowotworowe skóry – rogowacenie słoneczne (*actinic keratosis*), choroba Bowena,

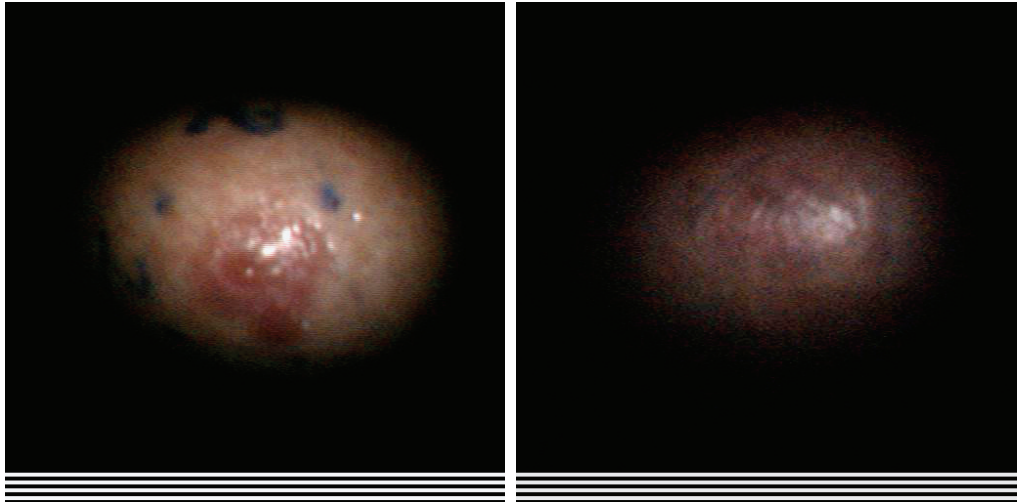
- rak podstawnokomórkowy skóry – postać powierzchniowa i wrzodziejąca oraz postać guzkowa po wcześniejszym „wyluszczeniu” chirurgicznym zmiany („curettage”) i następnym naświetlaniu łoży, a także postać powierzchniowa raka kolczystokomórkowego skóry (leczenie adiuwantowe),
- wszystkie postaci nowotworów skóry, które nie kwalifikują się do alternatywnych metod leczenia ze względu na stopień zaawansowania, inwazyjność, lokalizację (okolice narządów zmysłów), rozmiary lub wieloogniskowość (leczenie neoadiuwantowe, paliatywne),
- mięsak Kaposi’ego,
- keloidy,
- tłuszczowe obumieranie skóry (*necrobiosis lipoidica*),
- kłykciny kończyste (*condylomata acuminata*),
- łuszczyca,
- świetlne zapalenie czerwieni wargowej (*cheilitis actinica*),
- trądzik młodzieńczy u pacjentów z zaawansowanymi zmianami opornymi na tradycyjne metody leczenia,
- łysienie plackowate,
- ziarniniak grzybiasty (*mycosis fungoides*).

Na rysunku 17.5 przedstawiono efekt terapii fotodynamicznej u chorego z rogowaceniem słonecznym (*actinic keratosis*).



Rys. 17.5. Efekt terapii fotodynamicznej u pacjenta z rogowaceniem słonecznym

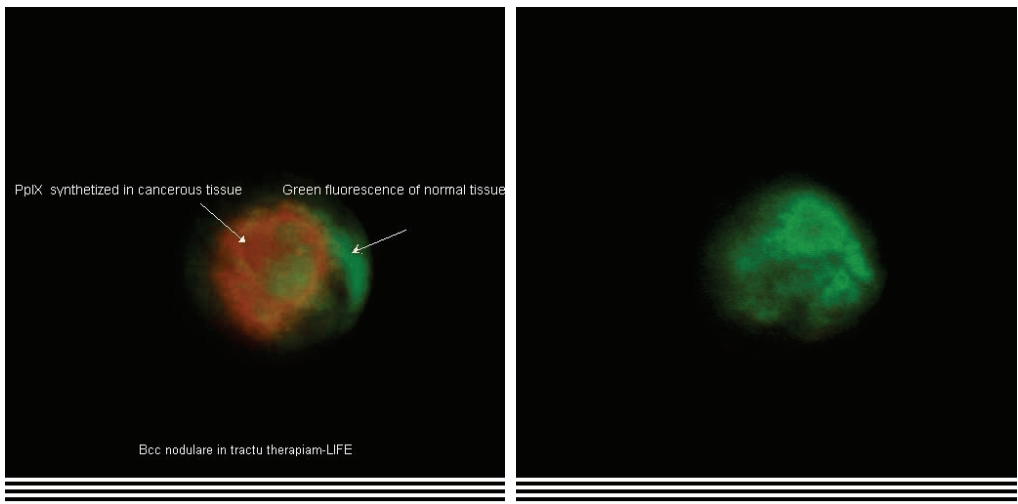
Na kolejnych fotografiach przedstawione zostały efekty terapii fotodynamicznej w przypadku raka podstawno-komórkowego skóry, weryfikowane poprzez obserwację w świetle białym (patrz rys. 17.6) oraz za pomocą diagnostyki fotodynamicznej (patrz rys. 17.7).



Stan przed PDT

Stan po PDT

Rys. 17.6. Efekty terapii fotodynamicznej w przypadku raka podstawno-komórkowego skóry (obserwacja w świetle białym)

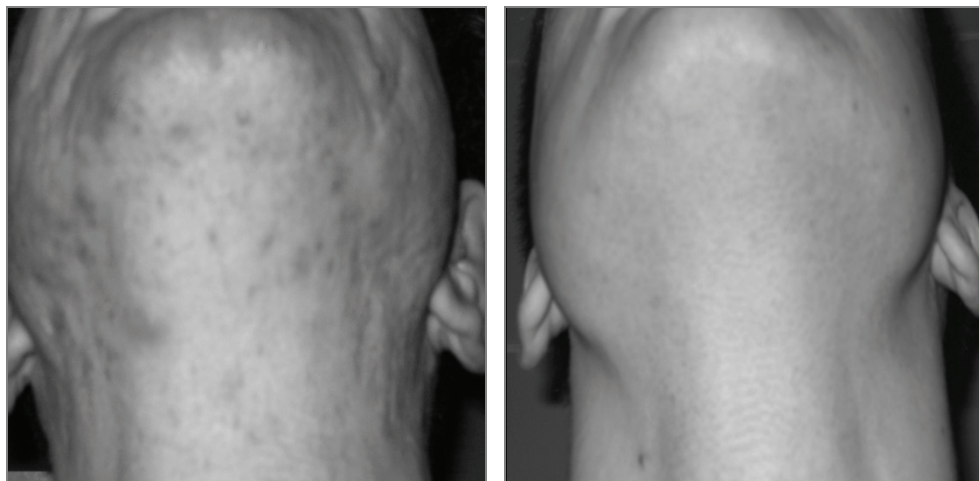


Stan przed PDT

Stan po PDT

Rys. 17.7. Efekty terapii fotodynamicznej w przypadku raka podstawno-komórkowego skóry (weryfikacja za pomocą diagnostyki fotodynamicznej)

Na rysunku 17.8 przedstawiony został efekt terapii fotodynamicznej u pacjenta z trądzikiem młodzieńczym (*acne vulgaris*) po 9 sesjach naświetlań lampą ksenonową generującą światło niebieskie o długości fali ok. 425 nm.



Stan przed PDT

Stan po PDT

Rys. 17.8. Efekt terapii fotodynamicznej u pacjenta z trądzikiem młodzieńczym

Najważniejsze zalety terapii fotodynamicznej chorób skóry to przede wszystkim:

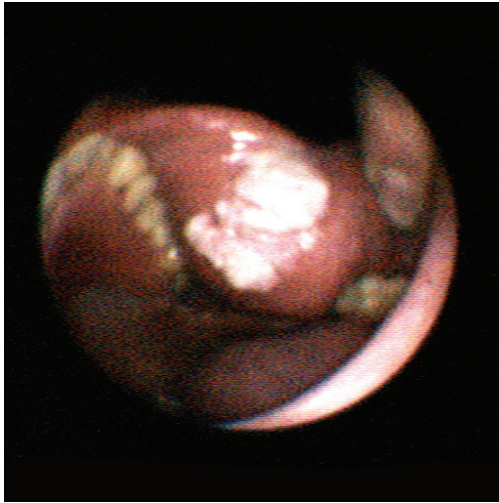
- wysoki wskaźnik wyleczalności,
- wybiórcze niszczenie ognisk nowotworowych,
- brak tendencji do nawrotu nawet po pojedynczym zabiegu,
- doskonały efekt kosmetyczny,
- nieznaczne obciążenie chorego związane z jedynie z bolesnością zabiegu.

17.3.2. Choroby błony śluzowej jamy ustnej i górnych dróg oddechowych

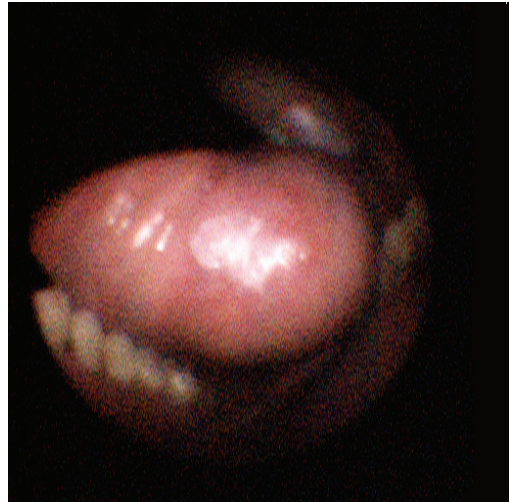
Aktualne wskazania do stosowania terapii fotodynamicznej w laryngologii obejmują m.in. [2, 12–14, 23, 24, 25]:

- leukoplakie,
- paliatywne leczenie nowotworów błony śluzowej górnych dróg oddechowych.

Na kolejnych fotografiach przedstawione zostały efekty terapii fotodynamicznej u pacjentów z leukoplakią jamy ustnej (patrz rys. 17.9) oraz krytycznym zwężeniem tchawicy spowodowanym rakiem płaskonabłonkowym dolnego gardła (patrz rys. 17.10).



Stan przed PDT

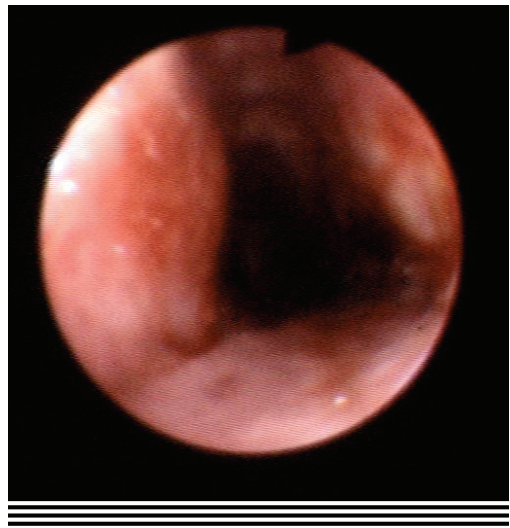


Stan po PDT

Rys. 17.9. Efekt terapii fotodynamicznej w leczeniu leukoplakii jamy ustnej



Stan przed PDT



Stan po PDT

Rys. 17.10. Efekt terapii fotodynamicznej u pacjenta z krytycznym zwężeniem tchawicy spowodowanym rakiem płaskonabłonkowym dolnego gardła

17.3.3. Choroby naczyń

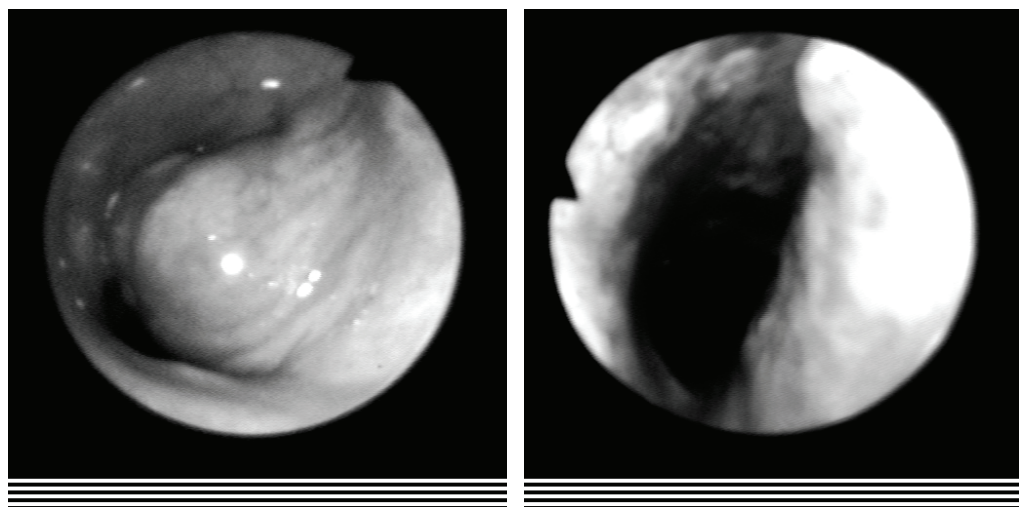
Aktualne wskazania do stosowania terapii fotodynamicznej w angiologii obejmują wewnątrznaczyniowe leczenie zmian miażdżycowych tętnic obwodowych, określane mianem fotoangioplastyki [26, 27].

17.3.4. Choroby płuc

Aktualne wskazania do stosowania terapii fotodynamicznej w pulmonologii obejmują m.in. następujące schorzenia [2, 12–14, 28, 29]:

- wieloogniskowa dysplazja dużego stopnia,
- rak odoskrzelowy *in situ* u pacjentów, u których istnieją bezwzględne przeciwwskazania do zabiegu chirurgicznego i/lub radioterapii,
- leczenie paliatywne raka odoskrzelowego obturującego oskrzela główne i/lub tchawicę.

Na rysunku 17.11 przedstawiony został efekt terapii fotodynamicznej w leczeniu wznowy gruczolakoraka obturującej oskrzele główne.



Stan przed PDT

Stan po PDT

Rys. 17.11. Efekt terapii fotodynamicznej w leczeniu wznowy gruczolakoraka obturującej oskrzele główne

17.3.5. Choroby narządu wzroku

Aktualne wskazania do stosowania terapii fotodynamicznej w okulistyce obejmują m.in. [2, 30, 31]:

- leczenie neowaskularyzacji naczyń krwionośnych (powstawania nowych naczyń) naczyniówki oka (*choroidal neovascularization*, CNV),
- leczenie zwyrodnienia plamki żółtej (*age-related macular degeneration*, AMD).

17.3.6. Choroby przewodu pokarmowego

Terapia fotodynamiczna w gastroenterologii znalazła zastosowanie m.in. [2, 12–14, 32, 33, 34, 35]:

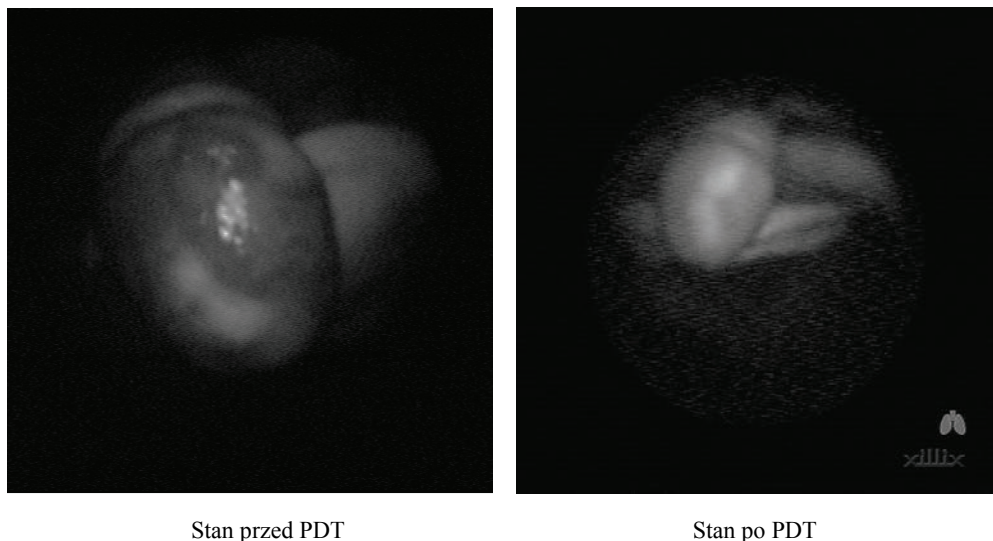
- do całkowitego usunięcia (eradykacji) dysplazji u pacjentów z przełykiem Barretta,
- w leczeniu raka przełyku, niekwalifikującego się do leczenia operacyjnego i/lub radioterapii,
- w leczeniu wczesnych raków żołądka u pacjentów niekwalifikujących się do operacji,
- w leczeniu gruczolakoraków, raka okrężnicy i odbytnicy – leczenie przygotowawcze, któremu towarzyszy następowy zabieg chirurgiczny.

17.3.7. Choroby dróg moczowych

Aktualne wskazania do stosowania terapii fotodynamicznej w urologii obejmują m.in. takie schorzenia, jak [2, 12–14, 36, 37, 38, 39, 40]:

- rak przejściowokomórkowy (*transitional cell carcinoma* – TCC) pęcherza moczowego, nieinwazyjny, niezależnie od stopnia zróżnicowania histologicznego,
- dysplazja i inne stany przednowotworowe u pacjentów po zakończonym leczeniu TCC pęcherza moczowego,
- zapalenie żołądki prącia i napletka z cechami dysplazji nabłonkowej odporne na leczenie konwencjonalne.

Na rysunku 17.12 przedstawiony został efekt terapii fotodynamicznej u pacjenta z zapaleniem żołądki prącia i napletka na podłożu infekcji *Acinetobacterium Baumannii* po uprzednim nieskutecznym leczeniu za pomocą miejscowej antybiotyko- i sterydoterapii oraz zabiegów krioterapii.



Stan przed PDT

Stan po PDT

Rys. 17.12. Efekt terapii fotodynamicznej w leczeniu zapalenia żołądki prącia i napletka

17.3.8. Choroby żeńskiego narządu rodneho

W ginekologii za pomocą terapii fotodynamicznej leczy się m.in. takie schorzenia, jak [2, 12–14, 41, 42, 43]:

- liszaj twardzinowy sromu (*lichen sclerosus*),
- śródnabłonkowa neoplazja sromu w stadium VIN 1,
- kłykciny kończyste sromu,
- wznowy miejscowe nowotworu sromu niekwalifikujące się do ponownego zabiegu (zły ogólny stan zdrowia pacjentki lub lokalizacja zmiany np. w pachwinie czy cewce moczowej) lub brak zgody pacjentki na leczenie operacyjne.

17.3.9. Choroby układu kostnego

Terapie fotodynamiczną próbuje się też stosować w ortopedii do leczenia pierwotnych nowotworów kości (mięsaków) [44, 45]. Podejmowane są także pionierskie próby terapii fotodynamicznej zmian przerzutowych do kości.

Na rysunku 17.13 przedstawiony został opracowany w Oddziale Klinicznym Chorzów Wewnętrznych, Angiologii i Medycyny Fizykalnej w Bytomiu sposób śródoperacyjnej aplikacji promieniowania laserowego na łożę pooperacyjną u pacjenta po wyłuszczeniu litego przerzutu szpiczaka mnogiego do kości piszczelowej.



Rys. 17.13. Sposób śródoperacyjnej aplikacji promieniowania laserowego podczas terapii fotodynamicznej przerzutu szpiczaka mnogiego do kości piszczelowej

17.4. Ograniczenia i perspektywy terapii fotodynamicznej

Jak każda metoda, również terapia fotodynamiczna ma pewne ograniczenia. Aktualnie lista ograniczeń obejmuje przede wszystkim takie zagadnienia, jak:

- synteza fotouczulaczy o odpowiednich właściwościach (maksimum absorpcji w zakresie światła czerwonego i bliskiej podczerwieni, dopasowanie pasma absorpcji do pasma wzbudzenia, trwałość fotooptyczna, równomierna kumulacja w tkankach, wysoki współczynnik klirensu osoczowego i tkankowego, wysokie powinowactwo do tkanki nowotworowej),
- dostępności leczonych narządów dla fotouczulacza i aplikowanego światła (istotne znaczenie fotoimmunoterapii polegającej na przyłączeniu cząsteczek fotouczulacza do przeciwciała monoklonalnego skierowanego przeciw antygenom powierzchniowym guza nowotworowego [46] oraz konieczność opracowania nowych sposobów naświetlania tkanek, zwłaszcza przy śródmiąższowej aplikacji światła),
- optyczne właściwości naświetlanych tkanek (zawartość wody, hemoglobiny, barwników endogennych, melaniny),

- odpowiednie wysycenie tkanek tlenem (możliwość zwiększenia prężności tkankowej tlenu poprzez łączenie terapii fotodynamicznej z hiperbaryczną terapią tlenową),
- ograniczona wydajność dotychczasowych źródeł światła w stosunku do fotouczulaczy II i III generacji (celowość konstrukcji dostrajalnych laserów pracujących na ciele stałym, np. takich jak tytanowo-szafirowy lub aleksandrytowy, które generują promieniowanie o długości fali z zakresu 690–1100 nm) [8],
- ograniczona skuteczność terapeutyczna w przypadku guzów nowotworowych o dużych rozmiarach (możliwość poprawy poprzez uzupełnienie terapii fotodynamicznej za pomocą hipertermii stosowanej w trakcie lub bezpośrednio po zakończeniu naświetlania),
- działania uboczne terapii wynikające z długotrwałej nadwrażliwości organizmu na światło słoneczne po parenteralnym (pozażołądkowym) podaniu fotouczulacza oraz odczucia bólowe podczas naświetlania skóry,
- relatywnie wysokie koszty aktualnie dostępnej aparatury i fotouczulaczy.

Zgodnie z opinią specjalistycznych towarzystw naukowych zajmujących się zagadnieniami terapii fotodynamicznej warunkiem dalszego rozwoju tej metody leczniczej jest m.in.:

- prowadzenie wielośrodkowych, międzynarodowych, randomizowanych (kontrolowanych) badań III fazy opartych na dużym materiale klinicznym,
- wdrażanie standardów PDT do zestawu procedur finansowanych przez odpowiednie dla danego kraju Fundusze Zdrowotne,
- obniżenie kosztów terapii,
- systematyczne podnoszenie kwalifikacji lekarzy i personelu (fizyków, inżynierów biomedycznych, etc.) pracującego w ośrodkach prowadzących terapię fotodynamiczną,
- systematyczne i szerokie informowanie społeczności lekarskiej o możliwościach terapii fotodynamicznej w zakresie poszczególnych specjalności medycznych,
- prowadzenie akcji informacyjnej na poziomie ogólnodostępnych dla pacjenta mediów: prasa, radio, telewizja.

Literatura

- [1] SIENKIEWICZ A., GRACZYK A., STANOWSKI E., *Fotodynamiczna metoda rozpoznawania i terapii nowotworów*, Problemy Biocybernetyki i Inżynierii Medycznej, 1990, Vol. 2, 377–395.
- [2] SIEROŃ A., CIEŚLAR G., ADAMEK M., LAITL-KOBIERSKA A., SZYGUŁA M., KAWCZYK-KRUPKA A., *Zarys fotodynamicznej diagnostyki i terapii nowotworów*, a-medica press, Bielsko-Biała 1997, 42–79.
- [3] SIEROŃ A., SZYGUŁA M., CIEŚLAR G., *Zastosowanie światła laserowego w rozpoznawaniu zmian nowotworowych*, [w:] *Diagnostyka i terapia fotodynamiczna*, pod red. H. Podbielskiej, A. Sieronia i W. Stręka, Wydawnictwo Medyczne Urban & Partner, Wrocław 2004, 99–102.

- [4] MOAN J., BERG K., *Photochemotherapy of cancer: experimental research*, Photochemistry and Photobiology, 1992, Vol. 55, No. 6, 931–948.
- [5] VONARX V., FOULTIER M.T., DE BRITO X.L., ANASAGASTI L., MORLET L., PATRICE T., *Photodynamic therapy decreases cancer colonic cell adhesiveness and metastatic potential*, Research in Experimental Medicine, 1995, Vol. 195, No. 2, 101–116.
- [6] KAWCZYK-KRUPKA A., WICZKOWSKI A., ADAMEK M., SIEROŃ A., *Terapia fotodynamiczna i jej znaczenia immunomodulujące w leczeniu chorób skóry i leukoplakii jamy ustnej*, Acta Bio-Optica Informatica Medica, 2001, Vol. 7, No. 1–2, 67–72.
- [7] MOSTOWY A., CIEŚLAR G., STANEK A., MACIASZEK-LÓJ B., KUBACKA M., SIEROŃ A., *Wpływ terapii fotodynamicznej na układ immunologiczny*, Balneologia Polska, 2003, Vol. 45, No. 1–2, 29–33.
- [8] FISHER A.M.R., MURPHREE A.L., GOMER C.J., *Clinical and preclinical photodynamic therapy*, Lasers in Surgery and Medicine, 1995, Vol. 17, No. 1, 2–31.
- [9] GOMER C.J., RUCKER N., MURPHREE A.L., *Transformation and mutagenic potential of porphyrin photodynamic therapy in mammalian cells*, International Journal of Radiation Biology and Related Studies in Physics, Chemistry and Medicine, 1988, Vol. 53, No. 4, 651–659.
- [10] RICHTER A.M., JAINA A.K., CANAAN A.J., WATERFIELD E., STERNBERG E.D., LEVY J.G., *Photosensitizing efficiency of two regioisomers of the benzoporphyrin derivate monoacid ring A (BPD-MA)*, Biochemical Pharmacology, 1992, Vol. 43, No. 11, 2349–2358.
- [11] LEDWON A., KAWCZYK-KRUPKA A., MISIAK A., LATOS W., SIEROŃ A., *Nowe możliwości terapii fotodynamicznej – nowe fotouczulacze. Przegląd*, Acta Bio-Optica et Informatica Medica, 2007, Vol. 13, No. 3, 11–14.
- [12] SIEROŃ A., ADAMEK M., BINISZKIEWICZ T., CEBULA W., DUDA B., GRUK M., KAWCZYK-KRUPKA A., KOZAK I., MAŁYSZEK J., MISIOŁEK M., NIEPSUJ G., NIEPSUJ K., PIETRUSA A., SZYGUŁA M., WOJCIECHOWSKI B., ZIELEŹNIK W., HUŃKA-ŻURAWIŃSKA W., *Diagnostyka fluorescencyjna i terapia fotodynamiczna w ośrodku wielospecjalistycznym – sześćoletnie doświadczenia własne*, Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej, 2004, Vol. 112, Supl. Materiały XXXV Zjazdu TIP, 339–346.
- [13] SIEROŃ A., ADAMEK M., BINISZKIEWICZ T., CEBULA W., GRUK M., KAWCZYK-KRUPKA A., KOZAK-DARMAS I., MAZUR S., NIEPSUJ G., NIEPSUJ K., NOWACKI T., SZYGUŁA M., WOJCIECHOWSKI B., ZIELEŹNIK W., *Proponowane standardy diagnostyki autofluorescencyjnej i fotodynamicznej oraz terapii fotodynamicznej*, Acta Bio-Optica et Informatica Medica, 2002, Vol. 8, No. 3, 135–137.
- [14] SIEROŃ A., KWIATEK S., *Twenty years of experience with PDD and PDT in Poland – Review*, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2009, Vol. 6, No. 2, 73–78.
- [15] SALIM A., LEMAN J.A., MCCOLL J.H., CHAPMAN R., MORTON C.A., *Randomized comparison of photodynamic therapy with topical 5-fluorouracil in Bowen's disease*, British Journal of Dermatology, 2003, Vol. 148, No. 3, 539–543.
- [16] CHLEBDA M., SIEROŃ A., ADAMEK M., KWAŚNY M., DRZAZGA Z., KAWCZYK-KRUPKA A., *Zastosowanie spektroskopii fluorescencyjnej w diagnostyce i terapii fotodynamicznej pacjentów ze zmianami nowotworowymi skóry*, Acta Bio-Optica et Informatica Medica, 2002, Vol. 8, No. 1–2, 29–34.
- [17] KAWCZYK-KRUPKA A., SIEROŃ A., SUWAŁA-JURCZYK B., ADAMEK M., *Terapia fotodynamiczna z zastosowaniem kwasu 5-delta-aminolewulinowego w leczeniu chorób nowotworowych skóry*, Przegląd Dermatologiczny, 2000, Vol. 87, No. 3, 235–240.
- [18] SIEROŃ A., KAWCZYK-KRUPKA A., ADAMEK M., CEBULA W., SZYPUŁA M., ZIELEŹNIK W., GRUK M., SUWAŁA-JURCZYK B., *Photodynamic therapy (PDT) using topically applied δ -aminolevulinic acid (ALA) for the treatment of malignant skin tumors*, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2004, Vol. 1, No. 3, 311–317.

- [19] SIEROŃ A., KAWCZYK-KRUPKA A., ADAMEK M., CEBULA W., ZIELEŹNIK W., NIEPSUJ K., NIEPSUJ G., PIETRUSA A., SZYGUŁA M., BINISZKIEWICZ T., MAZUR S., MAŁYSZEK J., ROMAŃCZYK A., LEDWOŃ A., FRANKIEWICZ A., ZYBURA A., KOCZY E., BIRKNER B., *Photodynamic diagnosis (PDD) and photodynamic therapy (PDT) in dermatology: "How we do it"*, Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 2006, Vol. 3, No. 2, 132–133.
- [20] SIEROŃ A., KAWCZYK-KRUPKA A., MAŁYSZEK J., KOWALSKI G., TROMPETA J., KOZIOŁEK H., GAWRYCHOWSKI J., *Zastosowanie metody łyżeczkowania (curretage) i terapii fotodynamicznej w leczeniu raków podstawnkomórkowych skóry*, Annales Academiae Medicae Silesiensis, 2006, Vol. 60, No. 4, 330–333.
- [21] RADAKOVIC-FIJAN S., BLECHA-THALHAMMER U., SCHLEYER V., SZEIMIES R.M., ZWINGERS T., HONIGSMANN H., TANEW A., *Topical aminolaevulinic acid-based photodynamic therapy as a treatment option for psoriasis? Results of a randomized, observer-blinded study*, British Journal of Dermatology, 2005, Vol. 152, No. 2, 279–283.
- [22] ITOH Y., NINOMIYA Y., TAJIMA S., ISHIBASHI A., *Photodynamic therapy of acne vulgaris with topical delta-aminolaevulinic acid and incoherent light in Japanese patients*, British Journal of Dermatology, 2001, Vol. 144, No. 3, 575–579.
- [23] CHEN H.M., YU C.H., TU P.C., YEH C.Y., TSAI T., CHIANG C.P., *Successful treatment of oral verrucous hyperplasia and oral leukoplakia with topical 5-aminolaevulinic acid-mediated photodynamic therapy*, Lasers in Surgery and Medicine, 2005, Vol. 37, No. 2, 114–122.
- [24] SIEROŃ A., NAMYSŁOWSKI G., MISIOŁEK M., ADAMEK M., KAWCZYK-KRUPKA A., *Photodynamic therapy (PDT) of premalignant lesions and local recurrences of laryngeal and hypopharyngeal cancers*, European Archives of Otorhinolaryngology, 2001, Vol. 258, No. 7, 349–352.
- [25] SIEROŃ A., ADAMEK M., KAWCZYK-KRUPKA A., MAZUR S., ILEWICZ L., *Photodynamic therapy (PDT) using topically applied δ -aminolaevulinic acid (ALA) for the treatment of oral leukoplakia*, Journal of Oral Pathology and Medicine, 2003, Vol. 32, No. 6, 330–336.
- [26] CHOU T.M., WOODBURN K.W., CHEONG W.F., LACY S.A., SUDHIR K., ADELMAN D.C., WAHR D., *Photodynamic therapy: applications in atherosclerotic vascular disease with metaxafin lutetium*, Catheterization and Cardiovascular Interventions, 2002, Vol. 53, No. 3, 37–394.
- [27] ROCKSON S.G., KRAMER P., RAZAVI M., SZUBA A., FILARDO S., FITZGERALD P., COOKE J.P., YOUSUF S., DE VAULT A.R., RENSCHLER M.F., ADELMAN D.C., *Photoangioplasty for human peripheral atherosclerosis: results of a phase I trial of photodynamic therapy with metaxafin lutetium (Antrin)*, Circulation, 2002, Vol. 102, No. 19, 2322–2324.
- [28] MOGHISSI K., DIXON K., *Is bronchoscopic photodynamic therapy a therapeutic option in lung cancer?*, European Respiratory Journal, 2003, Vol. 22, No. 3, 535–541.
- [29] SIEROŃ A., NIEPSUJ G., ADAMEK M., NIEPSUJ K., KOZIELSKI J., *Terapia fotodynamiczna z zastosowaniem preparatu Photofrin® 75 w leczeniu brodawczakowatości tchawicy i oskrzeli – opis przypadku*, Balneologia Polska, 2001, Vol. 43, No. 3–4, 36–42.
- [30] SCHMIDT-ERFURTH U., MILLER J.W., SICKENBERG M., LAQUA H., BARBAZETTO I., GRAGODAS E.S., ZOGRAFOS L., PIGUET B., POURNARAS C.J., DONATI G., LANE A.M., BIRNGRUBER R., VAN DEN BERG H., STRONG H.A., MANJURIS U., GRAY T., FSADNI M., BRESSLER N.M., *Photodynamic therapy with verteporfin for choroidal neovascularization caused by age-related macular degeneration: results of retreatments in a phase 1 and 2 study*, Archives of Ophthalmology, 1999, Vol. 117, No. 9, 1177–1187.
- [31] KEAM S.J., SCOTT L.J., CURRAN M.P., *Verteporfin: a review of its use in the management of subfoveal choroidal neovascularisation*, Drugs, 2003, Vol. 63, No. 22, 2521–2554.
- [32] KELTY C.J., ACKROYD R., BROWN N.J., BROWN S.B., REED M.W., *Comparison of high- vs. low-dose 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy of Barrett's esophagus*, Surgical Endoscopy, 2004, Vol. 18, No. 3, 452–458.

- [33] KWIATEK S., ADAMEK M., SIEROŃ A., *Diagnostyka i terapia fotodynamiczna w schorzeniach przełyku*, Gabinet Prywatny, 2004, Vol. 4, No. 126, 79–85.
- [34] LOVAT L.B., JAMIESON N.F., NOVELLI M.R., MOSSE C.A., SELVASEKAR C., MACKENZIE G.D., THORPE S.M., BOWN S.G., *Photodynamic therapy with m-tetrahydroxyphenyl chlorin for high-grade dysplasia and early cancer in Barrett's columnar lined esophagus*, *Gastrointestinal Endoscopy*, 2005, Vol. 62, No. 4, 617–623.
- [35] WEBBER J., FROMM D., *Photodynamic therapy for carcinoma in situ of the anus*, *Archives of Surgery*, 2004, Vol. 139, No. 3, 259–261.
- [36] BERGER A.P., STEINER H., STENZL A., AKKAD T., BARTSCH G., HOLTL L., *Photodynamic therapy with intravesical instillation of 5-aminolaevulinic acid for patients with recurrent superficial bladder cancer: a single-center study*, *Urology*, 2003, Vol. 61, No. 2, 338–341.
- [37] SHACKLEY D.C., BRIGGS C., GILHOOLEY A., WHITEHURST C., O'FLYNN K.J., BETTS C.D., MOORE J.V., CLARKE N.W., *Photodynamic therapy for superficial bladder cancer under local anaesthetic*, *BJU International*, 2002, Vol. 89, No. 7, 665–670.
- [38] SZYGUŁA M., PIETRUSA A., ADAMEK M., WOJCIECHOWSKI B., KAWCZYK-KRUPKA A., CEBULA W., DUDA W., SIEROŃ A., *Combined treatment of urinary bladder cancer with use of photodynamic therapy (PDT) and subsequent BCG-therapy: a pilot study*, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2004, Vol. 1, No. 4, 241–246.
- [39] WOJCIECHOWSKI B., SIEROŃ A., SZYGUŁA M., *Wczesne wyniki terapii fotodynamicznej guzów pęcherza moczowego – doniesienie wstępne*, *Urologia Polska*, 2000, Vol. 53, No. 2, 204–211.
- [40] KAWCZYK-KRUPKA A., LEDWON A., MAŁYSZEK J., SIEROŃ A., *Balanoposthitis with epithelial dysplasia treated by topical aminolaevulinic acid photodynamic therapy*, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2007, Vol. 4, No. 1, 76–78.
- [41] BINISZKIEWICZ T., OLEJEK A., KOZAK-DARMAS I., SIEROŃ A., *Therapeutic effects of 5-ALA-induced photodynamic therapy in vulvar lichen sclerosus*, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 2005, Vol. 2, No. 2, 157–160.
- [42] FEHR M.K., HORNUNG R., DEGEN A., SCHWARZ V.A., FINK D., HALLER U., WYSS P., *Photodynamic therapy of vulvar and vaginal condyloma and intraepithelial neoplasia using topically applied 5-aminolevulinic acid*, *Lasers in Surgery and Medicine*, 2002, Vol. 30, No. 4, 273–279.
- [43] OLEJEK A., KOZAK-DARMAS I., BINISZKIEWICZ T., KELLAS-ŚLĘCZKA S., SIEROŃ A., *Terapia fotodynamiczna w leczeniu śródnamionkowej neoplazji sromu*, *Ginekologia Polska*, 2008, Vol. 79, No. 4, 276–280.
- [44] KUSUZAKI K., MURATA H., MUTSUBARA T., MIYAZAKI S., OKAMURA A., SETO M., MATSUMINE A., HOSOI H., SUGIMOTOT, UCHIDA A., *Clinical trial of photodynamic therapy using acridine orange with/without low dose radiation as a New limb salvage modality in musculo-skeletal sarcoma*, *Anticancer Research*, 2005, Vol. 25, No. 2B, 1225–1235.
- [45] YOSHIDA K., KSUZAKI K., MATSUBARA T., MATSUMINE A., KUMAMOTO T., KOMADA Y., NAKA N., UCHIDA A., *Periosteal Ewing's sarkoma treated by photodynamic therapy with acridine orange*, *Oncological Reports*, 2005, Vol. 13, No. 2, 279–282.
- [46] YARMUSH M.L., THORPE W.P., RAKESZEW S.L., TONER M., TOMPKINS R.G., *Antibody-targeted photolysis*, *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 1993, Vol. 10, No. 3, 197–252.



Instytut Inżynierii Biomedycznej
i Pomiarowej

www.ibp.pwr.wroc.pl



Politechnika Wrocławska

Wydział Podstawowych Problemów Techniki

Inżynieria Biomedyczna to prawdziwie interdyscyplinarna dziedzina, która łączy fizykę, chemię, biologię, medycynę, informatykę, zastosowania komputerów, elektronikę i wiele innych.



Badanie właściwości elektrycznych tkanek

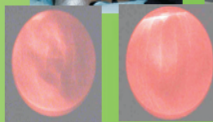


Laserowe niszczenie bakterii

<http://www.inzynieria-biomedyczna.com/>



Koagulacja tkanki laserowym aplikatorem światłowodowym



chory zdrowy

Badanie właściwości optycznych stawów międzywalczkowych



Badanie potencjałów słuchowych



Zdjęcia pochodzą z badań prowadzonych w naszym Instytucie.

Nasi pracownicy redagują również jedyny w Polsce kwartalnik Inżynieria Biomedyczna.

INŻYNIERIA BIOMEDYCZNA

NA

WYDZIALE PODSTAWOWYCH PROBLEMÓW TECHNIKI
POLITECHNIKI WROCŁAWSKIEJ

STUDIA 1. i 2. STOPNIA

ELEKTRONIKA MEDYCZNA I OPTYKA BIOMEDYCZNA

[http:// www.ibp.pwr.wroc.pl/IB-studia/](http://www.ibp.pwr.wroc.pl/IB-studia/)

Wybierając **Inżynierię Biomedyczną**, zdobędziesz prawdziwie interdyscyplinarną wiedzę. Dowiesz się, jak działa ludzki organizm i jak wspomagać jego funkcje, poznasz zagadnienia informatyki, elektroniki, medycyny laserowej i współczesnej diagnostyki. Będziesz studiować na kierunku, który należy do priorytetowych dziedzin na całym świecie. Zdobędziesz kwalifikacje, które są poszukiwane na ogólnosięciowym rynku pracy.

Działając w Kołach Naukowych: Biomedica, Bio-Nanopor, Micella, możesz prowadzić własne badania w zakresie biofizyki agregatów molekularnych i błon komórkowych, optyki biomedycznej i nanomedycyny, symulacji komputerowych układów biologicznych, analizy sygnałów biologicznych i czujników medycznych.

ROZDZIAŁ 18

PROMIENIOWANIE LASEROWE W MEDYCYNIE. PRZYKŁADOWE ZADANIA RACHUNKOWE

**Igor Buzalewicz, Katarzyna Wysocka-Król,
Katarzyna Kowal**

Spis treści	
18.1. Wstęp	433
18.2. Przykładowe zadania z rozwiązaniami	435
18.3. Zadania do samodzielnego rozwiązywania	446
18.4. Odpowiedzi	454

18.1. Wstęp

Ze względu na interdyscyplinarny charakter badań prowadzonych w zakresie biomedycyny laserowej, zapoznanie się z przykładowymi zagadnieniami rachunkowymi, pomoże zrozumieć niektóre aspekty związane z zastosowaniem laserów w medycynie. Praktyczne rozwiązywanie problemów związanych z biomedycyną laserową, z którymi lekarz, fizyk lub inżynier może się spotkać w życiu zawodowym, jest niezmiernie istotne. W niniejszym rozdziale przedstawione zostaną przykładowe zadania dotyczące tej tematyki.

W celu ujednoczenia oznaczeń wielkości fizycznych, stosowanych w analizowanych zadaniach, poniżej zamieszczono wykaz symboli wraz z objaśnieniami:

- λ – długość fali;
- c – prędkość światła w próżni;
- n – współczynnik załamania światła;
- η – wydajność emisyjna, sprawność;
- V_i – prędkość światła w ośrodku;
- ν_i – częstotliwość światła;
- P – moc znamionowa źródła światła;

- P_{szczyt} – moc szczytowa promieniowania laserowego;
 P_{sr} – moc średnia promieniowania laserowego;
 GP – gęstość mocy promieniowania laserowego;
 α – kąt padania światła na powierzchnię ośrodka;
 β – kąt załamania wiązki świetlnej w ośrodku;
 S – pole powierzchni plamki laserowej;
 f_{rep} – częstotliwość repetycji impulsów laserowych;
 t_{imp} – czas trwania impulsu laserowego;
 E_{imp} – energia pojedynczego impulsu laserowego;
 T – okres impulsu laserowego;
 w_0 – promień wiązki gaussowskiej w przewężeniu;
 $w(z)$ – promień wiązki gaussowskiej w odległości z od przewężenia;
 z_R – odległość Rayleigha;
 z_i – odległość odbiornika od przewężenia wiązki w_0 ;
 θ – rozbieżność dwupołówkowa wiązki gaussowskiej;
 I – natężenie wiązki świetlnej;
 $I(r, z)$ – średnie natężenie wiązki gaussowskiej w odległości r od osi optycznej na powierzchni detektora oddalonego o z od przewężenia;
 r – odległość detektora od osi optycznej;
 K – wzmocnienie wiązki laserowej;
 H – napromienienie;
 E – natężenie napromienienia (termin stosowany w normach BHP, wielkość równoznaczna gęstości mocy);
 t_{eksp} – czas ekspozycji na promieniowanie świetlne;
 Φ – zdolność zbierająca oka osoby normowzrocznej;
 f' – odległość ogniskowa obrazowa;
 $\Delta f'$ – zmiana odległości ogniskowej oka osoby z wadą refrakcji w stosunku do odległości ogniskowej oka osoby normowzrocznej;
 d – średnica plamki laserowej;
 d_{zr} – średnica źrenicy oka;
 MDE – maksymalna wartość napromienienia;
 OD – gęstość optyczna okularów ochronnych;
 T_{trans} – współczynnik transmisji;
 ξ_S – moc optyczna soczewki skupiającej;
 L – długość komory rezonansowej lasera;
 θ_{dyf} – rozbieżność wiązki ograniczonej dyfrakcyjnie przez aperturę;
 A_i, A^m – wartość absorbancji;
 C_{fi} – stężenie procentowe;
 c_m – stężenie molowe;
 μ_a – liniowy współczynnik absorpcji;

μ_s	–	współczynnik rozpraszania;
μ'_s	–	zredukowany współczynnik rozpraszania;
μ_T	–	całkowity współczynnik tłumienia;
μ_{eff}	–	efektywny współczynnik tłumienia;
g	–	bezwymiarowy współczynnik anizotropii rozpraszania;
k_s	–	bezwymiarowy współczynnik rozpraszania;
δ	–	głębokość penetracji;
a	–	albedo;
\bar{x}	–	średnia droga swobodna pomiędzy aktami absorpcji lub rozpraszania;
Z_{term}	–	głębokość penetracji termicznej;
τ_{term}	–	czas relaksacji termicznej;
D	–	dawka dostarczonej energii świetlnej;
$D^*_{powierzchniowa}$	–	dawka fotodynamiczna powierzchniowa;
ε	–	współczynnik ekstynkcji fotouczulacza;
b	–	współczynnik konwersji;
h	–	stała Plancka;
ρ	–	gęstość tkanki;
$z_{martwicy}$	–	głębokość martwicy tkanki nowotworowej.

18.2. Przykładowe zadania z rozwiązaniami

Zadanie1

Laser He-Ne o mocy znamionowej P równej 200 mW emituje promieniowanie o długości fali 632,8 nm. Skolimowana wiązka laserowa o średnicy d równej 3 mm, rozchodząca się w powietrzu, pada na ośrodek o współczynniku załamania światła n równy 1,35. Laser charakteryzuje się 85% wydajnością emisyjną η . Jaka jest wartość prędkości V_2 , długości fali λ_2 oraz częstotliwości światła ν_2 laserowego w tym ośrodku? Wyznacz natężenie wiązki laserowej wyrażone poprzez gęstość mocy GP [W/m²]. Jakim rodzajem lasera ze względu na rodzaj ośrodka aktywnego jest rozważane źródło światła? Jakiego rodzaju jeszcze źródła laserowe tego samego typu? Wyznacz kąt załamania wiązki β , gdy pada ona na ośrodek pod kątem $\alpha = 34^\circ$.

Rozwiązanie

Dane:

$\lambda = 632,8$ nm; $P = 200$ mW; $d = 3$ mm; $\alpha = 34^\circ$; $n_1 = 1$; $n_2 = 1,35$; $c = 3 \cdot 10^8$ m/s; $\eta = 85\%$.

Szukane: A) V_2 ; B) ν ; C) λ_2 ; D) GP ; E) rodzaj lasera; F) β .

A) Prędkość światła w ośrodku.

Zgodnie z prawem załamania

$$\frac{V_1}{V_2} = \frac{n_2}{n_1},$$

gdzie V_1 , V_2 oznaczają prędkości światła w ośrodku o współczynniku załamania odpowiednio n_1 , n_2 . Zatem

$$n_1 = 1, \quad n_2 = 1,35, \quad \text{stad} \quad V_2 = V_1 \frac{n_1}{n_2},$$

$$V_2 = \frac{c}{n_2} \quad (\text{gdzy} \quad V_1 = c),$$

$$V_2 = \frac{3 \cdot 10^8 \frac{\text{m}}{\text{s}}}{1,35} = 2,2 \cdot 10^8 \frac{\text{m}}{\text{s}}.$$

B) Częstotliwość światła laserowego w ośrodku.

Drgania wzbudzone mają tę samą częstotliwość, jak źródło wzbudzające, częstotliwość światła nie ulega zmianie $\nu_1 = \nu_2$.

C) Długość fali w ośrodku o współczynniku załamania n_2 ulegnie zmianie i będzie wynosić:

$$\lambda_2 = \frac{\lambda_1 \cdot n_1}{n_2},$$

$$\lambda_2 = \frac{632,8 \text{ nm}}{1,35} = 468,7 \text{ nm}.$$

D) Gęstość mocy GP . Aby wyznaczyć tę wielkość, w pierwszej kolejności należy obliczyć pole powierzchni S przekroju płamki laserowej o średnicy d :

$$S = \pi \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^2,$$

zatem

$$S = 4,71 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2.$$

Gęstość mocy GP , czyli moc przypadająca na jednostkę powierzchni S wynosi:

$$GP = \frac{\eta \cdot P}{S},$$

$$GP = \frac{0,85 \cdot 200 \text{ mW}}{4,71 \cdot 10^{-3} \text{ m}^2} = 3609 \frac{\text{mW}}{\text{m}^2},$$

$$GP = 3,61 \frac{\text{W}}{\text{m}^2}.$$

E) Klasyfikacja lasera ze względu na ośrodek aktywny.
Laser He-Ne jest laserem gazowym.

F) Kąt załamania wiązki β możemy wyznaczyć bezpośrednio z prawa załamania światła w następujący sposób:

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \beta} = \frac{n_2}{n_1},$$

stąd

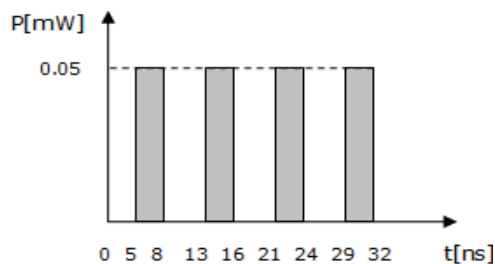
$$\sin \beta = \frac{n_1}{n_2} \cdot \sin \alpha.$$

Zatem kąt załamania skolimowanej wiązki świetlnej wynosi:

$$\beta = \arcsin\left(\frac{n_1}{n_2} \sin \alpha\right) = 24,47^\circ.$$

Zadanie 2

Laser Nd:YAG o długości fali 1064 nm o impulsowym trybie pracy generuje promieniowanie o następującej charakterystyce (patrz rys. 18.1):



Rys. 18.1. Charakterystyka promieniowania lasera

Wyznacz moc szczytową P_{szczyt} , moc średnią $P_{\text{śr}}$, częstotliwość repetycji impulsów f_{rep} , czas trwania impulsu t_{imp} oraz energię pojedynczego impulsu E_{imp} .

Rozwiązanie

Szukane: A) P_{szczyt} , B) t_{imp} , C) f_{rep} , D) $P_{\text{śr}}$, E) E_{imp} .

Na podstawie rysunku możemy bezpośrednio wyznaczyć następujące wielkości:

A) moc szczytową $P_{\text{szczyt}} = 0,05 \text{ mW}$;

B) czas trwania impulsu $t_{\text{imp}} = 3 \text{ ns}$ oraz okres $T = 5 \text{ ns}$.

Korzystając z tych wielkości możemy wyznaczyć kolejne: $P_{\text{śr}}$, f_{rep} , t_{imp} , E_{imp} , w następujący sposób.

C) częstotliwość repetycji:

$$f_{\text{rep}} = \frac{1}{T} = 0,125 \cdot 10^9 \text{ Hz} .$$

D) moc średnia:

$$P_{\text{śr}} = P_{\text{szczyt}} \cdot f_{\text{rep}} \cdot t_{\text{imp}} ,$$

$$P_{\text{śr}} = 0,05 \cdot 10^{-3} \text{ W} \cdot 0,125 \cdot 10^9 \text{ Hz} \cdot 3 \cdot 10^{-9} \text{ s} ,$$

$$P_{\text{śr}} = 1,875 \cdot 10^{-5} \text{ W} = 18,75 \text{ mW} .$$

E) energia pojedynczego impulsu:

Wielkość ta jest opisana następującą zależnością $E_{\text{imp}} = \int_{t_0}^{t_1} P(t) dt$, zatem jest ona równa polu powierzchni pod krzywą, opisującą przebieg czasowy pojedynczego impulsu:

$$E_{\text{imp}} = P_{\text{szczyt}} \cdot t_{\text{imp}} ,$$

$$E_{\text{imp}} = 0,05 \text{ mW} \cdot 3 \text{ ns} = 1,5 \cdot 10^{-13} \text{ J} .$$

Zadanie 3

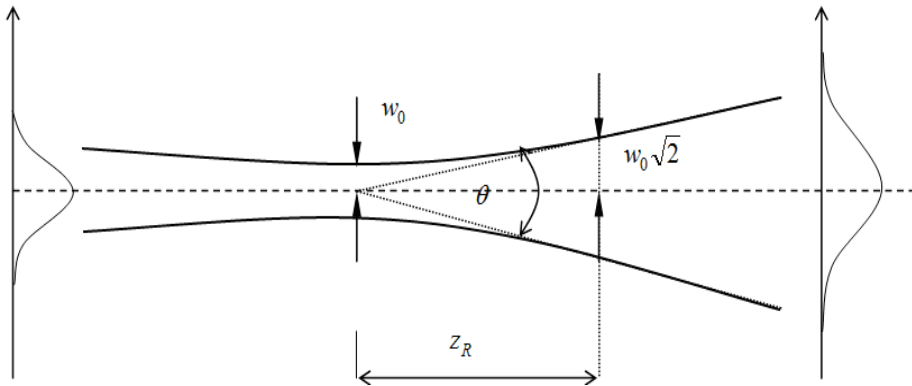
Źródło laserowe generuje promieniowanie o długości fali λ równej 534 nm, które jest wiązką gaussowską. W przewężeniu w_0 wiązka ma promień przekroju poprzecznego równy 0,8 mm. Jakie są podstawowe właściwości tego rodzaju wiązek? Wyznacz:

(A) odległość z_R , w jakiej promień wiązki $w(z_R)$ będzie równy $w_0 \sqrt{2}$,

(B) dwupółkową rozbieżność wiązki θ ,

(C) biorąc pod uwagę fakt, iż odbiornik znajduje się w odległości $z_1 = 0,7$ m od przewężenia wiązki w_0 , wyznacz promień wiązki $w(z_1)$ w płaszczyźnie detektora, rozbieżność wiązki, średnie natężenie $I(r_i, z_1)$ na powierzchni detektora w odległości $r_1 = 0$ oraz $r_2 = 0,5$ cm od osi optycznej,

(D) rozbieżność wiązki ograniczonej dyfrakcyjnie przez aperturę o średnicy 4 cm.



Rys. 18.2. Schematyczne przedstawienie wiązki gaussowskiej, zmian rozkładu energii propagującej wiązki oraz podstawowych parametrów ją opisujących: w_0 – przewężenie wiązki, z_R – odległość Rayleigha, θ – rozbieżność dwupołwkowa wiązki

Rozwiązanie

Dane:

$w_0 = 0,8$ mm; $\lambda = 534$ nm; $w(z_R) = w_0 \sqrt{2} = 1,13$ mm; $z_1 = 0,7$ m; $r_1 = 0$ cm, $r_2 = 0,5$ cm.

Szukane: A) $z_R = ?$; B) $w(z_1) = ?$; C) $\theta = ?$; D) $I(r_1; z_1) = ?$ oraz $I(r_2; z_1) = ?$.

A) Korzystając z zależności $w(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{\lambda \cdot z}{\pi \cdot w_0}\right)^2}$, możemy wyznaczyć odległość, w której promień wiązki $w(z_R)$ będzie wynosił $w_0 \sqrt{2} = 1,13$ mm.

$$z = \frac{\left(\sqrt{\left(\frac{w(z)}{w_0}\right)^2 - 1} \right) \cdot w_0^2 \cdot \pi}{\lambda},$$

$$z = 3,76 \text{ m}.$$

Odległość tę nazywamy odległością Rayleigha. W przypadku, gdy $w(z_R) = w_0 \sqrt{2}$, wyrażenie $\left(\frac{w(z)}{w_0}\right)^2 = 2$, więc odległość z_R można wyznaczyć bezpośrednio za pomocą równania:

$$z_R = \frac{\pi \cdot w_0^2}{\lambda}.$$

B) Jeżeli odbiornik znajduje się w odległości z_1 , wówczas promień wiązki $w(z_1)$ jest równy:

$$w(z_1) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{\lambda \cdot z_1}{\pi \cdot w_0^2}\right)^2},$$

$$w(z_1) = 0,814 \text{ mm.}$$

C) Dwupołówkowa rozbieżność wiązki:

$$\theta = \frac{2 \cdot \lambda}{\pi \cdot w_0},$$

$$\theta = \frac{2 \cdot 534 \cdot 10^{-9} \text{ m}}{\pi \cdot 0,8 \cdot 10^{-3} \text{ m}} = 4,25 \cdot 10^{-4} \text{ rad},$$

$$\theta = 0,425 \text{ mrad.}$$

D) Średnie natężenie światła na powierzchni detektora w odległości r od osi optycznej może być wyznaczone na podstawie poniższej zależności:

$$I(r, z) = \left(\frac{w_0}{w(z)}\right)^2 \exp\left(-2 \frac{r^2}{w^2(z)}\right) \left[\frac{\text{W}}{\text{m}^2}\right],$$

$$I(r, z) = \left(\frac{w_0}{w(z_1)}\right)^2 \exp\left(-2 \frac{r_1^2}{w^2(z_1)}\right),$$

zatem

$$I(r_1, z_1) = \left(\frac{w_0}{w(z)}\right)^2 = 0,966 \frac{\text{W}}{\text{m}^2},$$

$$I(r_2, z_1) = \left(\frac{0,8 \cdot 10^{-3} \text{ m}}{0,814 \cdot 10^{-3} \text{ m}} \right)^2 \exp \left(-2 \frac{(0,5 \cdot 10^{-2} \text{ m})^2}{(0,814 \cdot 10^{-3} \text{ m})^2} \right),$$

$$I(r_2, z_1) = 0,966 \cdot \exp(-75,5) = 1,57 \cdot 10^{-33} \frac{\text{W}}{\text{m}^2}.$$

Na podstawie uzyskanych wartości średniego natężenia światła na powierzchni detektora widzimy, iż mamy do czynienia ze znacznym spadkiem wartości natężenia wraz ze wzrostem odległości r od osi optycznej.

Zadanie 4

Laser He-Ne o mocy 3 mW generuje wiązkę o rozbieżności 0,8 mrad i oświetla oczy obserwatora, który jest krótkowidzem o wadzie refrakcji 2D. Przyjmując uproszczony model oka – model Gullstranda–Emsleya, zakładamy, że współczynnik załamania n wewnątrz oka wynosi $4/3$, a długość gałki ocznej jest równa 22,2 mm. Zdolność zbierająca oka osoby normowzrocznej wynosi 60 dioptrii. Średnica źrenicy wynosi 5 mm. Wyznacz:

- (A) odległość ogniskową obrazową układu optycznego oka krótkowidza f' ,
- (B) przesunięcie $\Delta f'$ płaszczyzny ogniskowej obrazowej oka w stosunku do położenia siatkówki,
- (C) średnicę S wiązki laserowej na powierzchni siatkówki,
- (D) wzmocnienie wiązki K wywołane zdolnością skupiającą oka,
- (E) napromienienie H ,
- (F) natężenie napromienienia E przy ekspozycji t_{eksp} trwającej 0,2 s.

Rozwiązanie

Dane:

$P = 3 \text{ mW}$; $t_{\text{eksp}} = 0,2 \text{ s}$; $\lambda = 632,4 \text{ nm}$; $\theta = 0,8 \text{ mrad}$; $\Delta \xi_{\text{OK}} = 5\text{D}$; $n = 4/3$;
 $f'_o = 2,22 \text{ cm}$; $d_{\text{sr}} = 5 \text{ mm}$.

Szukane: A) $f' = ?$; B) $\Delta f' = ?$; C) $d = ?$; D) $K = ?$; E) $H = ?$; F) $E = ?$.

A) Zdolność zbierająca oka osoby normowzrocznej wynosi $\phi = 60 \text{ D}$. U krótkowidza zdolność zbierająca ϕ_{ok}^K jest większa o $\Delta \xi_{\text{OK}}$, czyli w analizowanym przypadku wynosi 65 dioptrii. Stąd odległość ogniskową f' możemy wyznaczyć w następujący sposób:

$$f' = \frac{n}{\phi_{\text{ok}}^K},$$

$$f' = 0,0205 \text{ m} = 2,05 \text{ cm}.$$

B) Zmiana odległości ogniskowej oka krótkowidza w stosunku do odległości ogniskowej oka osoby normowzrocznej wynosi:

$$\Delta f' = |f'_0 - f'|,$$

$$\Delta f' = 0,28 \text{ cm}.$$

C) W celu wyznaczenia średnicy plamki laserowej na siatkówce konieczne jest określenie jej średnicy w płaszczyźnie ogniskowej oka. U osoby krótkowzrocznej wejściowa wiązka świetlna jest ogniskowana przed siatkówką. Średnica plamki laserowej w płaszczyźnie ogniskowej wynosi:

$$d = f' \cdot \theta,$$

$$d = 2,05 \text{ cm} \cdot 0,8 \cdot 10^{-3} \text{ rad} = 1,64 \cdot 10^{-3} \text{ cm}.$$

Średnica plamki na powierzchni siatkówki wynosi natomiast:

$$d_{\text{siatk}} = \sqrt{d^2 + (\theta' \Delta f')^2},$$

$$d_{\text{siatk}} = \sqrt{d^2 + \left(\frac{2\lambda}{\pi d} \cdot \Delta f'\right)^2},$$

$$d_{\text{siatk}} = 7,07 \cdot 10^{-3} \text{ cm}.$$

Powierzchnia plamki na siatkówce:

$$S = \pi \left(\frac{d_{\text{siatk}}}{2}\right)^2,$$

$$S = 3,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2.$$

D) Wzmocnienie wiązki laserowej w wyniku jej zogniskowania przez układ optyczny oka jest równe stosunkowi pola powierzchni źrenicy oka do pola powierzchni obrazu plamki na siatkówce:

$$K = \frac{P_{\text{zr}}}{P_{\text{siatk}}},$$

$$K = \frac{0,19625 \text{ cm}^2}{3,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2} = 5,03 \cdot 10^3.$$

E) Wartość napromienienia:

$$H = \frac{P}{S} \cdot t_{\text{eksp}},$$

$$H = \frac{3 \cdot 10^{-3} \text{ W}}{3,9 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2} \cdot 0,2 = 15,38 \frac{\text{J}}{\text{cm}^2}.$$

F) Natężenie napromienienia:

$$E = \frac{P}{S},$$

$$E = 76,9 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}.$$

Zadanie 5

Pewien laser o mocy P równej 20 W generuje promieniowanie, na które ekspozycja jest oko ludzkie przez czas t równy $0,5 \cdot 10^{-3}$ s. Średnica d przekroju wiązki laserowej jest równa 6 mm. Wyznacz minimalną gęstość optyczną OD okularów ochronnych, które zapewnią bezpieczną pracę z tym laserem oraz zabezpieczą oczy. Korzystając z prawa Lamberta–Beera, zdefiniuj gęstość optyczną. Określ współczynnik transmisji okularów dla tego źródła światła, skoro zgodnie z normą BHP PN-EN 60825-1:2010 maksymalna wartość natężenia napromienienia MDE wynosi $24,5 \text{ W/cm}^2$.

Rozwiązanie

Dane:

$$P = 10 \text{ W}; t = 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ s}; d_{\text{zr}} = 6 \text{ mm}; MDE = 24,5 \text{ W/cm}^2.$$

Szukane: A) $OD = ?$; B) $T_{\text{trans}} = ?$.

A) W celu wyznaczenia gęstości optycznej okularów niezbędnych do zabezpieczenia oka obserwatora przed uszkodzeniem przez światło laserowe, konieczne jest wyznaczenie wartości natężenia napromienienia analizowanego promieniowania. Pole powierzchni przekroju poprzecznego wiązki laserowej padającej na oko wynosi:

$$S = \pi \cdot \left(\frac{d}{2} \right)^2,$$

$$S = 0,2896 \text{ cm}^2,$$

zatem natężenie napromienienia wynosi:

$$E = \frac{20 \text{ W}}{0,2896 \text{ cm}^2} = 69,1 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}.$$

Wartość gęstości optycznej okularów ochronnych wynosi zatem:

$$OD = \log_{10} \left[\frac{E}{MDE} \right],$$

$$OD = \log_{10} \left[\frac{69,1}{24,5} \right] = 1,68.$$

B) Ponieważ filtr o gęstości optycznej OD został oświetlony przez wiązkę świetlną o natężeniu I_0 , zatem natężenie I wiązki po przejściu przez ten filtr można opisać zależnością:

$$I = I_0 \cdot 10^{-OD}.$$

Zatem współczynnik transmisji wynosi:

$$T_{\text{trans}} = \frac{I}{I_0} = 10^{-OD} = 0,02.$$

Zadanie 6

Wycinek tkanki wątroby o wymiarach $3 \text{ cm} \times 2,5 \text{ cm} \times 1,54 \text{ cm}$ (*dł.* \times *szer.* \times *grub.*) jest oświetlony przez wiązkę lasera o długości fali $514,5 \text{ nm}$ i mocy nominalnej P równej 20 mW . Wydajność energetyczna η tego źródła wynosi 62% . Wiązka laserowa o średnicy d równej $2,5 \text{ cm}$ i przewężeniu w_0 równym 3 mm pada na soczewkę skupiającą o współczynniku załamania światła n_S równym $1,5$ oraz mocy optycznej równej $6D$, która skupia wiązkę na powierzchni tkanki znajdującej się w płaszczyźnie ogniskowej obrazowej tej soczewki. Zakładamy, iż powierzchnia tkanki jest idealnie płaska. Wyznacz gęstość mocy GP_0 wiązki na powierzchni tkanki. Wiedząc, że gęstość mocy GP_{wyj} wiązki po przejściu przez tkankę wynosi $1,02 \times 10^{-9} \text{ W/cm}^2$, określ wartość liniowego współczynnika absorpcji μ_a promieniowania dla rozważanej długości fali przez tkankę wątroby.

Rozwiązanie

Dane:

Wymiary tkanki $3 \text{ cm} \times 2,5 \text{ cm} \times 1,54 \text{ cm}$; $\lambda = 514 \text{ nm}$; $P = 20 \text{ mW}$; $\eta = 62\%$;
 $d = 2,5 \text{ cm}$; $n_S = 1,5$; $w_0 = 3 \text{ mm}$; $\xi_S = 6D$; $GP_{\text{wyj}} = 1,02 \cdot 10^{-9} \text{ W/cm}^2$.

Szukane: A) $GP_0 = ?$; B) $\mu_a = ?$.

A) W celu określenia pola powierzchni przekroju wiązki laserowej zogniskowanej przez soczewkę skupiającą na powierzchni tkanki, w pierwszej kolejności należy wyznaczyć rozbieżność wiązki laserowej θ :

$$\theta = \frac{2\lambda}{\pi w_0},$$

$$\theta = 0,11 \text{ mrad}.$$

Ponieważ powierzchnia tkanki zlokalizowana jest w płaszczyźnie ogniskowej soczewki, więc średnicę d przekroju poprzecznego wiązki na powierzchni tkanki można wyznaczyć za pomocą zależności:

$$d_f = \theta \cdot f'.$$

Konieczne jest zatem określenie odległości ogniskowej obrazowej soczewki na podstawie znajomości jest jej zdolności zbierającej, jak również współczynnika załamania światła materiału, z jakiego jest ona wykonana, według poniższego wzoru:

$$\Phi_s = \frac{1}{f'}.$$

Odległość ogniskowa obrazowa wynosi:

$$f' = \frac{1}{\Phi_s} = 16,6 \text{ cm}.$$

Zatem średnica przekroju poprzecznego wiązki na powierzchni tkanki jest równa:

$$d_f = 16,6 \text{ cm} \cdot 0,11 \cdot 10^{-3} \text{ rad} = 1,83 \cdot 10^{-3} \text{ cm}$$

a pole powierzchni przekroju tej wiązki

$$S = \pi \left(\frac{d}{2} \right)^2,$$

$$S = 2,62 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2.$$

Znając powyższe wielkości, jesteśmy w stanie wyznaczyć wartość gęstości mocy (natężenia napromienienia) na powierzchni tkanki:

$$GP_0 = \frac{\eta P}{S},$$

$$GP_0 = \frac{0,62 \cdot 20 \cdot 10^{-3} \text{ W}}{2,62 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2} = 4732,8 \frac{\text{W}}{\text{cm}^2}.$$

B) Aby wyznaczyć liniowy współczynnik absorpcji tkanki, należy skorzystać z prawa Lamberta–Beera w następującej postaci:

$$GP_{wyj} = GP_o \exp\{-\mu_a x\}.$$

Grubość tkanki x wynosi 1,5 cm, zatem:

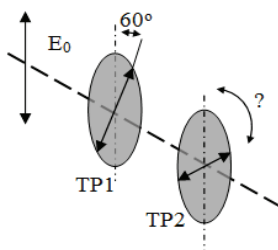
$$\mu_a = -\frac{1}{x} \ln\left(\frac{GP_{wyj}}{GP_o}\right),$$

$$\mu_a = -\frac{1}{1,54 \text{ cm}} \ln\left(\frac{1,02 \cdot 10^{-9} \text{ W/cm}^2}{4732,8 \text{ W/cm}^2}\right) = 18,9 \text{ cm}^{-1}.$$

18.3. Zadania do samodzielnego rozwiązywania

Zadanie 1

Liniowo spolaryzowana wiązka światła laserowego (kierunek drgań wektora pola elektrycznego E_0 prostopadły do osi optycznej) o gęstości mocy $GP_0 = 22,5 \text{ mW/cm}^2$ pada kolejno na dwa polaryzatory. Oś transmisji pierwszego z nich jest zlokalizowana pod kątem 60° w stosunku do początkowego kierunku drgań wektora pola elektrycznego wiązki wejściowej (patrz rys. 18.3).



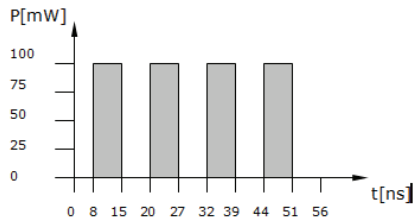
Rys. 18.3. Schematyczne przedstawienie układu złożonego z polaryzatorów

- (A) Określ gęstość mocy GP_1 wiązki po przejściu przez pierwszy polaryzator (TP1).
- (B) Jaka jest gęstość mocy wiązki wyjściowej GP_2 po przejściu przez oba polaryzatory, wiedząc, że stosunek kwadratu wartości amplitudy pola elektrycznego wiązki po przejściu przez drugi polaryzator (TP2) do kwadratu wartości amplitudy pola elektrycznego po przejściu przez pierwszy polaryzator (TP1) wynosi 0,75.

- (C) Pod jakim kątem α zlokalizowana jest oś transmisji drugiego polaryzatora w stosunku do osi poprzedniego polaryzatora?

Zadanie 2

Laser He-Ne o długości fali 632,8 nm o przerywanym trybie pracy generuje promieniowanie o następującej charakterystyce (patrz rys. 18.4):



Rys. 18.4. Charakterystyka promieniowania lasera

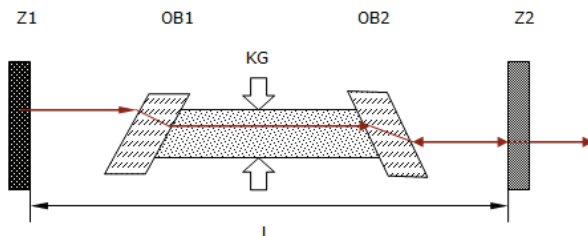
Wyznacz lub określ:

- (A) Moc szczytową P_{szczyt} .
- (B) Moc średnią P_{sr} .
- (C) Częstotliwość repetycji impulsów f_{rep} .
- (D) Czas trwania impulsu t_{imp} .
- (E) Energię pojedynczego impulsu E_{imp} .

Zadanie 3

Rysunek 18.5 obrazuje schemat komory rezonansowej pewnego lasera gazowego, gdzie KG oznacza komorę rezonansową wypełnioną mieszaniną gazów; $Z1$ – płaskie zwierciadło nieprzepuszczalne, $Z2$ – zwierciadło półprzepuszczalne. W celu uzyskania odpowiedniego stopnia polaryzacji światła generowanego przez laser w wyniku selektywnego odbicia zazwyczaj stosuje się dwa (wejściowe i wyjściowe) okna polaryzacyjne (OB1, OB2). Na jakiej zasadzie opiera się działanie okien polaryzacyjnych? Zakładamy, że dla długości fali 632,8 nm, współczynnik załamania światła okien polaryzacyjnych wynosi 1,5. Dodatkowo zakładamy, iż współczynnik załamania światła mieszanki gazowej wypełniającej komorę rezonatora wynosi w przybliżeniu 1.

- (A) Wyznacz minimalną długość L komory rezonansowej w przypadku światła o długości fali 632,8 nm oraz 1,5355 μm .
- (B) Wyznacz, pod jakim kątem α względem osi komory rezonansowej wypełnionej powietrzem, powinny być zlokalizowane okna, aby zapewnić maksymalną polaryzację wyjściowej wiązki laserowej.
- (C) Określ kąt α' , jakie tworzą z normalną do powierzchni okien promienie wiązki laserowej wejściowej i wyjściowej.



Rys. 18.5. Schemat komory rezonansowej

Zadanie 4

Światło generowane przez laser He-Ne jest wiązką gaussowską, która w przewężeniu w_0 ma promień przekroju równy 3 mm. Biorąc pod uwagę fakt, iż odbiornik znajduje się w odległości $z = 1200$ m od przewężenia wiązki, wyznacz:

- Promień wiązki w płaszczyźnie detektora $w(z)$.
- Odległość Rayleigha z_R .
- Rozbieżność wiązki θ .
- Średnie natężenie wiązki na powierzchni detektora wzdłuż osi optycznej $I(0, z)$.
- Średnie natężenie wiązki świetlnej $I(r, z)$ na powierzchni detektora w odległości $r = 0,5$ cm od osi optycznej.
- Jaka będzie rozbieżność θ_{dyf} wiązki ograniczonej dyfrakcyjnie przez aperturę o średnicy 4 cm?

Zadanie 5

Dioda laserowa o mocy 5 mW oświetla oko tak, że na rogówkę pada wiązka promieni równoległych. Wiązka ta jest następnie ogniskowana przez układ optyczny oka, w wyniku czego na siatkówce osoby bez wad refrakcji powstaje plamka rozmycia o średnicy 15 μm .

- Wyznacz gęstość mocy GP_1 wiązki świetlnej na powierzchni siatkówki.
- U osoby krótkowzrocznej średnica plamki laserowej na powierzchni siatkówki wynosi 25 μm . Jaka będzie wartość gęstości mocy GP_2 wiązki świetlnej na powierzchni siatkówki w tym przypadku. Jaki jest związek pomiędzy gęstością mocy a wielkością plamki.

Zadanie 6

Dioda laserowa o mocy 2 mW generuje promieniowanie o długości fali 405 nm i rozbieżności wiązki θ równej 0,6 mrad. Przez 30 s oświetla ona oko osoby normowzrocznej. Wiedząc, że odległość ogniskowa oka ludzkiego, czyli odległość pomiędzy rogówką a siatkówką, wynosi 1,7 cm, określ:

- Natężenie napromienienia E .
- Napromienienie powierzchni H siatkówki.

Zadanie 7

Laser kryptonowy o mocy 40 W oświetla źrenicę oka o średnicy 5 mm przez 0,25 s. Przyjmij, iż maksymalne dopuszczalne napromienienie oka eksponowanego na ten rodzaj promieniowania wynosi $2,5 \times 10^{-3} \text{ W/cm}^2$. Wyznacz minimalną gęstość optyczną OD okularów ochronnych w celu ochrony struktur anatomicznych oka przed uszkodzeniem.

Zadanie 8

Laser argonowy generuje promieniowanie o długości fali 514 nm i mocy 30 W, na które eksponowane jest przez 9 μs oko ludzkie o średnicy źrenicy równej 8 mm. Rozbieżność wiązki wynosi 20 mrad. Zgodnie z normą BHP PN-EN 60825-1:2010 maksymalna wartość napromienienia dla analizowanej długości fali oraz warunków ekspozycji wynosi $0,791 \text{ W/cm}^2$.

- (A) Wyznacz minimalną gęstość optyczną OD_1 okularów ochronnych, które zapewnią bezpieczną pracę z tym laserem oraz zabezpieczą oczy.
- (B) Jakim rodzajem filtra: amplitudowym czy fazowym są okulary ochronne?
- (C) Czy na potencjalne uszkodzenie oka może wpływać stan oświetlenia pomieszczenia, w którym się znajdujemy?
- (D) Wyznacz wartość OD_2 dla źrenicy oka ludzkiego o średnicy 3 mm.
- (E) Korzystając z prawa Lamberta zdefiniuj gęstość optyczną. Dla obu przypadków wyznacz współczynnik absorpcji materiału, z jakiego wykonane zostały filtry, jeżeli grubość filtrów wynosi 15 mm. W jaki sposób można zwiększyć wartość gęstości optycznej okularów ochronnych?
- (F) Określ współczynniki transmisji T okularów dla rozważanej długości fali.

Zadanie 9

Dane są trzy próbki roztworów tego samego fotouczulacza (f_1, f_2, f_3) – używanego w PDT i PDD, rozpuszczone w rozpuszczalniku (R), próbka z samego rozpuszczalnika (R) oraz mieszanina roztworów tych fotouczulaczy ($m(f_1, f_2, f_3)$). Próbki umieszczono w kuwetach o wymiarach $2 \text{ cm} \times 2 \text{ cm} \times 3 \text{ cm}$. Każdą z nich oświetlono promieniowaniem o długości fali $\lambda = 475 \text{ nm}$. W celu poszerzenia wiązki gaussowskiej, której przewężenie wynosi 0,15 mm, jest ona skierowana na soczewkę rozpraszającą (soczewka cienka) o mocy (-23D), a następnie oświetla kuwetę, której powierzchnia wejściowa leży w odległości 30 cm od tylnej powierzchni soczewki. Moc nominalna źródła światła wynosi 20 mW. Wykonano serię pomiarów gęstości mocy wiązki świetlnej po przejściu przez kuwetę za badaną substancją: $GP_{f_1} = 0,75GP_0$; $GP_{f_2} = 0,33GP_0$; $GP_{f_3} = 0,47GP_0$; $GP_R = 0,98GP_0$; $GP_m(f_1, f_2, f_3) = 0,25GP_0$. Liniowy współczynnik absorpcji omawianego fotouczulacza wynosi $21,6 \text{ cm}^{-1}$, a rozpuszczalnika odpowiednio $0,1 \text{ cm}^{-1}$. Następnie do mieszaniny różnych stężeń fotouczulacza $m(f_1, f_2, f_3)$ dodano roztwór innego fotouczulacza o linio-

wym współczynnika absorpcji równym $\mu_a = 12 \text{ cm}^{-1}$ tak, że gęstość mocy wiązki wyjściowej wynosi $GP_w = 0,14GP_0$.

- Wyznacz wartość gęstości mocy wiązki wejściowej GP_0 padającej na pierwszą powierzchnię kuwety.
- Wykorzystując wyniki pomiarów gęstości mocy, określ wartość absorbancji A_i wszystkich próbek.
- Znając wartości liniowych współczynników absorpcji, określ stężenie procentowe C_i fotouczulaczy we wszystkich próbkach zakładając, że stężenie jest jednorodne w całej objętości.
- Sporządź wykres zależności absorbancji od stężenia fotouczulacza znajdującego się w roztworze.
- Wyznacz liniowy współczynnik absorpcji μ_a^m uzyskanej w ten sposób mieszaniny $m(f_1, f_2, f_3)$ dwóch fotouczulaczy oraz jej absorbancję A^m .

Zadanie 10

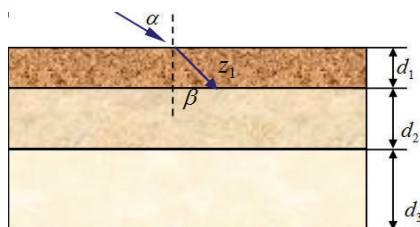
Przyjmujemy warstwowy model tkanki, w którym powierzchnie poszczególnych warstw są idealnie płaskie (patrz rys. 18.6). Każda warstwa tkanki jest scharakteryzowana przez współczynnik załamania światła n_i , liniowy współczynnik absorpcji μ_a^i oraz współczynnik rozpraszania μ_s^i . Bezwymiarowy współczynnik anizotropii wyrażony jest przez g^i . Skolimowana wiązka światła laserowego $\lambda = 635 \text{ nm}$ generowana przez źródło o mocy nominalnej 300 mW pada na pierwszą warstwę pod kątem $\alpha = 25^\circ$ względem normalnej do jej powierzchni. Oświetlona powierzchnia tkanki została ograniczona przez aperturę do obszaru o średnicy 2,5 cm. Kąt β_i opisuje kąt załamania wiązki świetlnej w i -tej warstwie, a GP_0 wejściową gęstość mocy. Przyjmij, że bezwymiarowy współczynnik rozpraszania $k_s = 1,05$.

Dane parametry:

1 warstwa: $n_1, \mu_a^1, \mu_s^1, g^1, d_1$
 $n_1 = 1,36; \mu_a^1 = 2,3 \text{ cm}^{-1}; \mu_s^1 = 58 \text{ cm}^{-1}; g^1 = 0,99; d_1 = 2 \text{ mm}$,

2 warstwa: $n_2, \mu_a^2, \mu_s^2, g^2, d_2$
 $n_2 = 1,39; \mu_a^2 = 1,2 \text{ cm}^{-1}; \mu_s^2 = 46 \text{ cm}^{-1}; g^2 = 0,89; d_2 = 4 \text{ mm}$,

3 warstwa: $n_3, \mu_a^3, \mu_s^3, g^3, d_3$
 $n_3 = 1,41; \mu_a^3 = 3,2 \text{ cm}^{-1}; \mu_s^3 = 87 \text{ cm}^{-1}; g^3 = 0,84; d_3 = 8 \text{ mm}$.



Rys. 18.6. Model tkanki z podziałem na warstwy

- (A) Na podstawie danych stwierdź, jakie zjawiska przeważają w oddziaływaniu światła z tkanką?
- (B) Jaki jest sens fizyczny współczynnika g ?
- (C) Wyznacz kąty β_i , załamania każdej warstwy oraz drogę geometryczną z_i , jaką przebędzie wiązka w każdej warstwie.
- (D) Określ głębokość penetracji δ_i każdej warstwy tkanki.
- (E) Korzystając z zależności $GP_i = k_s GP_o \exp([-z_i / \delta_i] \cos \beta_i)$ wyznacz gęstość mocy w każdej z warstw.

Zadanie 11

Mamy dane dwa rodzaje tkanek: (a) płuc świni, (b) mózgu człowieka – substancja biała, które zostały oświetlone normalną do ich powierzchni wiązką świetlną o długości fali $\lambda = 632,8$ nm i średnicy 4 cm. Źródło światła ma moc 450 mW, lecz rzeczywista sprawność jest o 15% mniejsza. Z uwagi na konieczność wykorzystania światła spolaryzowanego zastosowano polaryzator liniowy, którego oś transmisji jest zlokalizowana pod kątem 15° względem wektora elektrycznego wiązki świetlnej. Wykorzystując poniższe parametry optyczne:

- (1) $\mu_a = 2,0 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 301 \text{ cm}^{-1}$, $g = 0,93$;
 (2) $\mu_a = 22 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 532 \text{ cm}^{-1}$, $g = 0,82$.

Określ:

- (A) Całkowity współczynnik tłumienia μ_T .
- (B) Efektywny współczynnik tłumienia μ_{eff} .
- (C) Głębokość penetracji δ .
- (D) Średnią drogę swobodną \bar{x} między aktami absorpcji lub rozpraszania każdej tkanki.
- (E) Gęstość mocy wiązki padającej normalnie na powierzchnię tkanki GP_0 .
- (F) Dawkę D dostarczonej energii świetlnej, jeśli ekspozycja trwała 30 s.
- (G) Odpowiedz, jakie zjawisko dominuje w rozpatrywanych tkankach: absorpcja czy rozpraszanie?

Zadanie 12

Tkanka nowotworowa i zdrowa (patrz tab. 1) były ekspozowane na promieniowanie lasera Nd:YAG o długości fali 1064 nm. Wyznacz głębokość penetracji termicznej Z_{term} obu tkanek, jeśli czas ekspozycji wynosił 1 s, 3 s, 5 s, 10 s, 30 s, 60 s. Przedstaw graficznie zależność głębokości penetracji termicznej od czasów ekspozycji.

Tabela 1. Charakterystyka wybranych tkanek

Rodzaj tkanki	Gęstość tkanki	Ciepło właściwe
	kg/m^3	kJ/kg K
Tkanka nowotworowa	1000	3,5
Tkanka tłuszczowa zdrowa	920	3,0

Zadanie 13

Wycinki tkanek ludzkich o wymiarach $3 \text{ cm} \times 2,5 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$ (*dl.* \times *szer.* \times *grub.*) były oświetlone promieniowaniem laserowym o różnej długości fali w zależności od oświetlanej tkanki. Źródła światła o mocy 350 mW posiadały rzeczywistą sprawność o 18% mniejszą.

Tabela 2. Parametry optyczne tkanek

Rodzaj tkanki	λ [nm]	μ_a [cm^{-1}]	μ_s [cm^{-1}]	g
aorta	580	8,90	183	0,81
nowotwór	632,8	0,49	270	0,97

Wykorzystując parametry optyczne przedstawione w tabeli 2, określ:

- (A) Całkowity współczynnik tłumienia μ_T .
- (B) Efektywny współczynnik tłumienia μ_{eff} .
- (C) Głębokość penetracji δ .
- (D) Średnią drogę swobodną \bar{x} między aktami absorpcji lub rozpraszania dla każdej z tkanek.

Czas relaksacji termicznej τ_{term} podanych tkanek i wybranych długości fali promieniowania laserowego, zakładając że termiczna stała dyfuzji wynosi $1,4 \cdot 10^{-7} \text{ m}^2/\text{s}$.

Zadanie 14

Pacjent z wykrytą skórą zmianą nowotworową o wymiarach $1,6 \text{ cm} \times 1,5 \text{ cm}$ (*dl.* \times *szer.*), został poddany terapii fotodynamicznej (PDT), polegającej na podaniu fotouczulacza, który po wzbudzeniu optycznym powoduje zniszczenie zmian chorobowych poprzez zachodzące reakcje fotocytotoksyczne. Zaaplikowano dożylnie fotouczulacz w dawce $5 \text{ mg}/\text{kg}$ masy ciała, jednak dawka fotouczulacza w tkance docelowej wyniosła $3 \text{ }\mu\text{g}/\text{g}$ tkanki. Masa molowa fotouczulacza wynosi $600 \text{ g}/\text{mol}$ oraz gęstość tkanki nowotworowej wynosi $1 \text{ g}/\text{cm}^3$. Następnie ta zmiana była eksponowana przez 10 minut na promieniowanie laserowe o długości fali 630 nm i mocy 480 mW. W początkowej fazie rozwoju zmiany nowotworowej, można ją traktować jako zmianę powierzchniową, zatem dawka progowa (lub inaczej próg fotodynamiczny) D_{th}^* wynosi $10^{18} \text{ fotonów}/\text{g}$ (lub 18 mmol/L). Współczynniki absorpcji, rozpraszania i anizotropii tkanki nowotworowej wynoszą odpowiednio $\mu_a = 0,3 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_s = 40 \text{ cm}^{-1}$ oraz $g = 0,9$.

- (A) Wyznacz dawkę promieniowania H .
- (B) Oblicz głębokość penetracji δ .
- (C) Wyznacz stężenie molowe c_m fotouczulacza w tkance nowotworowej.
- (D) Wyznacz dawkę fotodynamiczną na powierzchni, korzystając ze wzoru:

$$D_{\text{powierzchniowa}}^* = \frac{\varepsilon \cdot c_m \cdot t_{\text{ekspozycji}} \cdot E \cdot k_s \cdot b}{\rho} \left[\frac{\text{mol}}{\text{l}} \right],$$

wiedząc, że współczynnik ekstynkcji fotouczulacza wynosi $\varepsilon = 10^4 \left[\frac{1}{\text{cm} \cdot \text{mol}} \right]$, gdzie bezwymiarowy współczynnik rozpraszania $k_s = 4,4$. Współczynnik konwersji $b = \frac{\lambda}{hc} \left[\frac{\text{fotonów}}{\text{J}} \right]$, ρ to gęstość tkanki, natomiast c_m to stężenie molowe fotouczulacza, a E to natężenie napromieniowania.

(E) Wyznacz głębokość martwicy tkanki nowotworowej, wykorzystując:

$$z_{\text{martwicy}} = \delta \cdot \ln \left(\frac{D_{\text{powierzchniowa}}^*}{D_{\text{th}}^*} \right) \quad [\text{cm}].$$

Zadanie 15

Pewien rodzaj tkanki, scharakteryzowany jest w zależności od długości fali, przez następujące parametry optyczne:

- (1) $\lambda = 600 \text{ nm}$, $\mu_s = 211 \text{ cm}^{-1}$, $\mu'_s = 46,4 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_a = 6,1 \text{ cm}^{-1}$,
- (2) $\lambda = 633 \text{ nm}$, $\mu_s = 195 \text{ cm}^{-1}$, $\mu'_s = 37,1 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_a = 5,8 \text{ cm}^{-1}$,
- (3) $\lambda = 650 \text{ nm}$, $\mu_s = 45 \text{ cm}^{-1}$, $\mu'_s = 32,3 \text{ cm}^{-1}$, $\mu_a = 4,7 \text{ cm}^{-1}$.

Tkanka została oświetlona kolejno przez wiązki laserowe o długości fali: 600 nm, 633 nm i 650 nm. Na podstawie parametrów optycznych dla danych długości fal:

- (A) Wyznacz współczynnik anizotropii rozpraszania g .
- (B) Wyznacz całkowity współczynnik tłumienia μ_T .
- (C) Wyznacz albedo a .
- (D) Odpowiedz na pytanie w jakim kierunku rozpraszanie światła przez tkankę jest dominujące?
- (E) Jaki jest związek pomiędzy długością fali, rozmiarami centrum rozpraszającego oraz rozkładem przestrzennym światła rozproszonego (rodzaje rozpraszania)?

Zadanie 16

Wycinek błony wewnętrznej aorty o wymiarach $3 \text{ cm} \times 3 \text{ cm} \times 0,5 \text{ cm}$ (*dł.* \times *szer.* \times *grub.*) był eksponowany przez 10 s na promieniowanie laserowe o długości fali $\lambda = 580 \text{ nm}$. Skolimowana wiązka świetlna o promieniu przekroju poprzecznego 0,8 cm pada na powierzchnię tkanki pod kątem 25 stopni w stosunku do normalnej do powierzchni. Nominalna moc źródła światła wynosiła 20 mW, lecz rzeczywista sprawność była o 30% mniejsza. Liniowy współczynnik absorpcji analizowanej tkanki jest odpowiednio równy $\mu_a = 8,9 \text{ cm}^{-1}$. Wyznacz:

- (A) Natężenie napromienienia na powierzchni tkanki.
- (B) Wartość intensywności wiązki transmitowanej przez tkankę.
- (C) Wartość dostarczonej tkance dawki promieniowania.

18.4. Odpowiedzi

Zadanie 1

- (A) $GP_1 = 5,625 \text{ mW/cm}^2$.
- (B) $GP_2 = 4,871 \text{ mW/cm}^2$.
- (C) pod kątem $\alpha = 30^\circ$.

Zadanie 2

- (A) $P_{\text{szczyt}} = 100 \text{ mW}$.
- (B) $P_{\text{śr}} = 0,581 \text{ W}$.
- (C) $f_{\text{rep}} = 0,83 \times 10^{-9} \text{ Hz}$.
- (D) $t_{\text{imp}} = 7 \text{ ns}$.
- (E) $E_{\text{imp}} = 7 \times 10^{-10} \text{ J}$.

Zadanie 3

- (A) $L_1 = 316,4 \text{ nm}$; $L_2 = 0,77 \text{ }\mu\text{m}$.
- (B) $\alpha = 146^\circ$.
- (C) $\alpha' = 56,3^\circ$.

Zadanie 4

- (A) $w(z) = 0,08 \text{ m}$.
- (B) $z_R = 44,68 \text{ m}$.
- (C) $\theta = 1,34 \times 10^{-4} \text{ rad}$.
- (D) $I(0, z) = 0,0375 \text{ W/m}^2$.
- (E) $I(r_1, z) = 0,0014 \text{ W/m}^2$.
- (F) $\theta_{\text{dyf}} = 38,6 \times 10^{-6} \text{ rad}$.

Zadanie 5

- (A) $GP_1 = 2829,4 \text{ W/cm}^2$.
- (B) $GP_2 = 1018,59 \text{ W/cm}^2$.

Wraz ze wzrostem pola powierzchni plamki laserowej maleje wartość natężenia napromienienia (gęstości mocy) promieniowania laserowego oświetlającego daną powierzchnię.

Zadanie 6

- (A) $E = 183\,662 \text{ J/cm}^2$.
- (B) $H = 6122 \text{ W/cm}^2$.

Zadanie 7

$$OD \geq 4.9.$$

Zadanie 8

(A) $OD_1 \geq 1,91.$

(B) amplitudowym.

(C) tak.

(D) $OD_2 \geq 2,76.$

(E) $\mu_1 = 0,29 \text{ mm}^{-1}; \mu_2 = 0,29 \text{ mm}^{-1}.$

Gęstość optyczna okularów ochronnych może być zwiększona poprzez zastosowanie materiału o większym współczynniku absorpcji lub o większej grubości.

(F) $T_1 = 0,0123; T_2 = 0,00174.$

Zadanie 9

(A) $GP_0 = 307,7 \text{ W/cm}^2.$

(B) $A_{f_1} = 0,29; A_{f_2} = 1,11; A_{f_3} = 0,76; A_m = 1,39; A_R = 0,02.$

(C) $C_{f_1} = 0,67\%; C_{f_2} = 2,57\%; C_{f_3} = 1,76\%; C_m = 3,22\%.$

(E) $\mu_a^m = 33,7 \text{ cm}^{-1}; A^m = 1,95.$

Zadanie 10

(A) przeważają zjawiska rozpraszania.

(B) określa średni kosinus kąta rozproszenia.

(C) $\beta_1 = 18,1^\circ; \beta_2 = 17,696^\circ; \beta_3 = 17,45^\circ; z_1 = 2,104 \text{ mm}; z_2 = 4,199 \text{ mm}; z_3 = 8,385 \text{ mm}.$

(D) $\delta_1 = 2,24 \text{ cm}; \delta_2 = 2,106 \text{ cm}; \delta_3 = 0,78 \text{ cm}.$

(E) $GP_1 = 26,28 \text{ mW/cm}^2; GP_2 = 4,129 \text{ mW/cm}^2; GP_3 = 0,152 \times 10^{-3} \text{ mW/cm}^2.$

Zadanie 111) *pluco świni:*

(A) $GP_0 = 28,4 \text{ mW/cm}^2.$

(B) $D = 852 \text{ mJ/cm}^2.$

(C) $\mu_T = 303 \text{ cm}^{-1}.$

(D) $\delta = 0,06 \text{ cm}.$

(E) $\bar{x} = 3,3 \times 10^{-3} \text{ cm}.$

(F) $\mu_{\text{eff}} = 16,67 \text{ cm}^{-1}.$

(G) dominuje rozpraszanie.

2) *mózg człowieka – substancja biała:*

(A) $GP_0 = 28,4 \text{ mW/cm}^2$.

(B) $D = 852 \text{ mJ/cm}^2$.

(C) $\mu_T = 554 \text{ cm}^{-1}$.

(D) $\delta = 0,01 \text{ cm}$.

(E) $\bar{x} = 1,8 \times 10^{-3} \text{ cm}$.

(F) $\mu_{\text{eff}} = 100 \text{ cm}^{-1}$.

(G) dominuje rozpraszanie.

Zadanie 12

dla tkanki nowotworowej:

$Z_{\text{term}}(1 \text{ s}) = 8,48 \times 10^{-4} \text{ m}$.

$Z_{\text{term}}(3 \text{ s}) = 1,47 \times 10^{-3} \text{ m}$.

$Z_{\text{term}}(5 \text{ s}) = 1,89 \times 10^{-3} \text{ m}$.

$Z_{\text{term}}(10 \text{ s}) = 2,68 \times 10^{-3} \text{ m}$.

$Z_{\text{term}}(30 \text{ s}) = 4,64 \times 10^{-3} \text{ m}$.

$Z_{\text{term}}(60 \text{ s}) = 6,57 \times 10^{-3} \text{ m}$.

dla tkanki tłuszczowej:

$Z_{\text{term}}(1 \text{ s}) = 9,92 \times 10^{-4} \text{ m}$.

$Z_{\text{term}}(3 \text{ s}) = 1,7 \times 10^{-3} \text{ m}$.

$Z_{\text{term}}(5 \text{ s}) = 2,22 \times 10^{-3} \text{ m}$.

$Z_{\text{term}}(10 \text{ s}) = 3,14 \times 10^{-3} \text{ m}$.

$Z_{\text{term}}(30 \text{ s}) = 5,43 \times 10^{-3} \text{ m}$.

$Z_{\text{term}}(60 \text{ s}) = 4,68 \times 10^{-3} \text{ m}$.

Zadanie 13

aorta:

(A) $\mu_T = 191,9 \text{ cm}^{-1}$.

(B) $\delta = 29,29 \times 10^{-3} \text{ cm}$.

(C) $\bar{x} = 5,21 \times 10^{-3} \text{ cm}$.

(D) $\mu_{\text{eff}} = 34,15 \text{ cm}^{-1}$.

(E) $\tau_{\text{term}} = 0,15 \text{ s}$.

nowotwór:

(A) $\mu_T = 270,49 \text{ cm}^{-1}$.

(B) $\delta = 281,41 \times 10^{-3} \text{ cm}$.

(C) $\bar{x} = 3,69 \times 10^{-3} \text{ cm}$.

(D) $\mu_{\text{eff}} = 3,55 \text{ cm}^{-1}$.

(E) $\tau_{\text{term}} = 14,14 \text{ s}$.

Zadanie 14

- (A) $H = 120 \text{ J/cm}^2$.
- (B) $\delta = 0,51 \text{ cm}$.
- (C) $c_m = 5 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$.
- (D) $D_{\text{powierzchniowa}}^* = 141 \text{ mmol/l}$.
- (E) $z_{\text{martwicy}} = 1,1 \text{ cm}$.

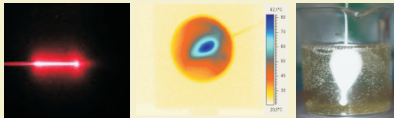
Zadanie 15

- (1) (A) $\mu_T = 217,1 \text{ cm}^{-1}$; (B) $g = 0,78$; (C) $a = 0,972$; (D) w kierunku propagacji.
- (2) (B) $\mu_T = 200,8 \text{ cm}^{-1}$; (B) $g = 0,81$; (C) $a = 0,971$; (D) w kierunku propagacji.
- (3) (C) $\mu_T = 49,7 \text{ cm}^{-1}$; (B) $g = 0,28$; (C) $a = 0,91$; (D) w kierunku propagacji, choć zbliżony do izotopowego.

Zadanie 16

- (A) $GP_0 = 6,28 \text{ mW/cm}^2$.
- (B) $GP_{\text{wyj}} = 0,059 \text{ mW/cm}^2$.
- (C) $D = 0,59 \text{ mJ/cm}^2$.

Działając w Kołach Naukowych: Biomedica, Bio-Nanopor, Micella, możesz prowadzić własne badania w zakresie biofizyki agregatów molekularnych i błon komórkowych, optyki biomedycznej i nanomedycyny, symulacji komputerowych układów biologicznych, analizy sygnałów biologicznych i czujników medycznych.



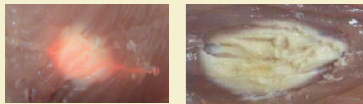
Koagulacja białka laserowym aplikatorem światłowodowym



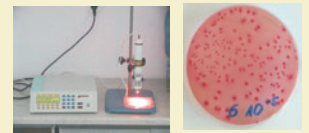
Badanie właściwości elektrycznych tkanek



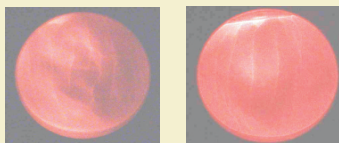
Badanie potencjałów słuchowych



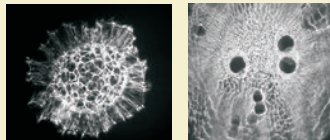
Koagulacja tkanki laserowym aplikatorem światłowodowym



Laserowe niszczenie bakterii



Badanie właściwości optycznych stawów międzypaliczkowych



Optyczne metody identyfikacji bakterii

Inżynieria Biomedyczna
ISSN 1214-0543
Acta Bio-Optica et Informatica Medica vol 12, nr 2/2005

Najwyższej jakości kamery termograficzne **IRtech**

©Cedip Insaas

www.irtech.com.pl

<http://www.inzynieria-biomedyczna.com/>

Zdjęcia pochodzą z badań prowadzonych w Instytucie Inżynierii Biomedycznej i Pomiarowej. Pracownicy Instytutu redagują również jedyny w Polsce kwartalnik Inżynieria Biomedyczna.

WYDZIAŁ PODSTAWOWYCH PROBLEMÓW TECHNIKI

ZAPRASZA NA

STUDIA INŻYNIERSKIE I MAGISTERSKIE I. i II. STOPNIA

NA KIERUNKU

INŻYNIERIA BIOMEDYCZNA



Politechnika Wrocławska

Przydatne linki:

<http://www.portal.pwr.wroc.pl/index.dhtml>

<https://rekrutacja.pwr.wroc.pl/EdukacjaWeb/>

<http://www.ibp.pwr.wroc.pl/IB-studia/>

http://www.wppt.pwr.wroc.pl/program_studiow,101.dhtml

ROZDZIAŁ 19
OPTYCZNA DIAGNOSTYKA MEDYCZNA.
PRZYKŁADOWE ĆWICZENIA
LABORATORYJNE

Igor Buzalewicz, Katarzyna Kowal,
Katarzyna Wysocka-Król, Halina Podbielska

Spis treści	
19.1. Wstęp	460
19.2. Analiza stanu polaryzacji światła przechodzącego przez tkankę w układzie polaryskopowym	460
19.2.1. Wyznaczenie gęstości mocy wiązki oświetlającej	461
19.2.2. Wyznaczenie zmiany stopnia polaryzacji światła po przejściu przez badaną tkankę	461
19.2.3. Wyznaczenie zależności zmiany stopnia polaryzacji liniowej światła po przejściu przez badaną tkankę od kąta padania liniowo spolaryzowanej wiązki wejściowej	463
19.2.4. Wyznaczenie zależności gęstości mocy światła przechodzącego przez tkankę od kąta położenia osi transmisji analizatora	463
19.2.5. Wyznaczenie zależności współczynnika transmisji światła przez badaną tkankę od kąta padania liniowo spolaryzowanej wiązki oświetlającej	464
19.3. Obrazowanie struktur powierzchniowych tkanek w świetle odbitym i przechodzącym w układzie polaryskopowym	464
19.3.1. Obserwacja preparatów tkankowych w odbiciowym i transmisyjnym mikroskopie optycznym	465
19.3.2. Obserwacja preparatów tkankowych w układzie polaryskopowym w świetle odbitym	467
19.3.3. Obserwacja powierzchni skóry w układzie polaryskopowym w świetle odbitym	469
19.4. Komputerowa analiza zdjęć komórek biologicznych	470
19.4.1. Wstępna obróbka zdjęć w programie <i>ImageJ</i>	470
19.4.2. Charakteryzacja obrazów fluorescencyjnych komórek biologicznych za pomocą programu <i>ImageJ</i>	471
19.4.3. Określenie rozmiarów komórki oraz jej jądra na podstawie analizy jej profilu w jednym z kanałów R, G lub B zdjęcia fluorescencyjnego	472

19.4.4.	Analiza rozkładu rozmiarów struktur komórkowych na podstawie analizy obrazu w jednym z kanałów R, G, lub B z wykorzystaniem funkcji <i>Analyze Particles</i>	473
19.5.	Zastosowanie lampy Wooda w diagnostyce fluorescencyjnej	476
19.5.1.	Wprowadzenie	476
19.5.2.	Przebieg ćwiczenia	479
19.6.	Spektroskopia skóry	480
19.6.1.	Wprowadzenie	480
19.6.2.	Budowa skóry	480
19.6.3.	Spektroskopia odbiciowa	482
19.6.4.	Przebieg ćwiczenia	483

19.1. Wstęp

Niniejszy rozdział został opracowany z myślą o osobach, które chciałyby samodzielnie popробować sił w medycznej diagnostyce optycznej. Może być pomocny dla prowadzących zajęcia z zakresu fizyki medycznej i inżynierii biomedycznej. Polecamy go też studentom wyższych lat studiów na Inżynierii Biomedycznej. Zaprezentowany zestaw ćwiczeń pozwoli na praktyczne wykorzystanie wiedzy zdobytej na wykładach dotyczących optycznej diagnostyki medycznej. Z uwagi na fakt, iż omawiana dziedzina nauki należy do zagadnień interdyscyplinarnych i obejmuje szeroki zakres tematyczny badań diagnostycznych, w niniejszym rozdziale zdecydowano się na zaprezentowanie kilku przykładowych ćwiczeń laboratoryjnych, które dotyczą problematyki bezpośrednich pomiarów rozpraszania oraz depolaryzacji światła w tkankach, jak również obrazowania, badań fluorescencyjnych, komputerowej analizy obrazu i badań spektroskopowych.

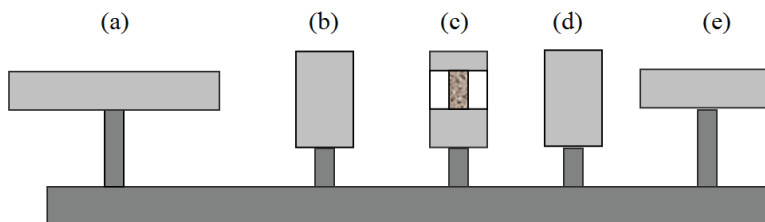
19.2. Analiza stanu polaryzacji światła przechodzącego przez tkankę w układzie polaryskopowym

Należy przeprowadzić bezpośrednie pomiary gęstości mocy promieniowania laserowego generowanego przez laser He-Ne o długości fali 632,8 nm po przejściu przez badany rodzaj tkanki. Celem ćwiczenia jest:

- zapoznanie się z metodologią pomiarów gęstości mocy promieniowania laserowego w układzie polaryskopowym,
- przeanalizowanie zmian stanu polaryzacji wiązki świetlnej przechodzącej przez tkankę,
- wyznaczenie zależności współczynnika transmisji liniowo spolaryzowanego światła laserowego przez badany rodzaj tkanki od kąta padania wiązki oświetlającej.

Układ pomiarowy składa się z następujących elementów (patrz rys. 19.1):

- źródło promieniowania laserowego: laser He-Ne,
- polaryzator liniowy,
- statyw z uchwytem na badaną tkankę wraz z podziałką kątową,
- analizator w postaci polaryzatora liniowego,
- detektor mocy.



Rys. 19.1. Schemat układu pomiarowego: (a) laser, (b) polaryzator, (c) próbka, (d) analizator, (e) detektor mocy

19.2.1. Wyznaczenie gęstości mocy wiązki oświetlającej

Układ pomiarowy w tym przypadku ogranicza się do lasera He-Ne, polaryzatora liniowego oraz detektora mocy zlokalizowanego w płaszczyźnie próbki (odpowiednio (a), (b), (e) na rys. 19.1). Stacyk polaryzatora liniowego umożliwi jego rotację, czyli zmianę położenia osi transmisji. W celu określenia gęstości mocy GP_0 wiązki oświetlającej tkankę przy zapewnieniu jej optymalnej wartości, należy polaryzator obracać, aż do momentu, kiedy wartość gęstości mocy wskazywana przez detektor mocy będzie maksymalna. W celu określenia dokładności pomiaru, należy przeprowadzić dziesięć takich pomiarów gęstości mocy GP_0 , za każdym razem zmieniając pozycję polaryzatora i ponownie go ustawiając w położeniu, zapewniającym uzyskanie maksymalnej wartości GP_0 . Zmierzone wartości należy zanotować w tabeli pomiarowej. Na podstawie uzyskanych wyników pomiarów należy wyznaczyć wartość średnią gęstości mocy wiązki oświetlającej $\overline{GP_0}$ oraz odchylenie standardowe od wartości średniej, które określać będzie dokładność pomiaru ΔGP_0 .

19.2.2. Wyznaczenie zmiany stopnia polaryzacji światła po przejściu przez badaną tkankę

W tym zadaniu pomiarowym dodatkowo korzystamy z drugiego polaryzatora liniowego – analizatora. Detektor mocy umieszczamy na końcu ławy optycznej.

Również w tym przypadku statyw analizatora ma możliwość obrotu i jest dodatkowo wyposażony w podziałkę kątową, charakteryzującą położenie osi transmisji analizatora. W pierwszej kolejności należy obracać polaryzator aż do momentu uzyskania minimalnej wartości gęstości mocy wiązki laserowej. Gdy warunek ten zostanie spełniony, należy zablokować polaryzator za pomocą odpowiedniego pokrętkła, a następnie ustawić skalę kątową w pozycji 90° . W tym przypadku osie transmisji polaryzatora są do siebie prostopadłe i uzyskujemy tzw. konfigurację krzyża polaryzacyjnego. Aby wyznaczyć stopień polaryzacji liniowej wiązki laserowej, należy przeprowadzić po trzy pomiary gęstości mocy wiązki wyjściowej GP_1^0 oraz GP_1^{90} dla dwóch położen θ_i^T analizatora; odpowiednio: 0° i 90° . Dodatkowo konieczne jest wyznaczenie dokładności określenia położenia kąowego osi transmisji analizatora za pomocą podziałki kątovej umieszczonej w jego oprawie, dlatego też korzystając ze zmierzonych wartości gęstości mocy wiązki wejściowej \overline{GP}_0 oraz gęstości mocy GP_1^0 , GP_1^{90} , jak również prawa Malusa, należy wyznaczyć kąt θ^T pomiędzy osiami transmisji polaryzatora oraz analizatora.

Następnie należy określić średnią różnicę pomiędzy wartościami kątów wyznaczonych teoretycznie θ_T a wartościami kątów θ_i^P ustawionych na podziałce kątovej statywu analizatora. Uzyskane wyniki należy zanotować i wyznaczyć stopień polaryzacji P_L^0 wiązki oświetlającej. W celu wyznaczenia zmiany stopnia polaryzacji światła po przejściu przez badaną tkankę konieczne jest umieszczenie na ławie optycznej, pomiędzy polaryzatorem (b) oraz analizatorem (d), uchwyty do tkanki (c). Następnie na ławie optycznej należy umieścić badaną tkankę. Statyw ten wyposażony jest w skalę kątową, która umożliwia bezpośredni odczyt kąta padania wiązki oświetlającej na powierzchnię tkanki. W tej części zadania pomiarowego wiązka laserowa powinna padać pod kątem 0° na powierzchnię tkanki, czyli prostopadłe do niej. Podobnie jak w poprzednim przypadku, dokonujemy pomiarów gęstości mocy GP_2^0 , GP_2^{90} wiązki transmitowanej przez tkankę dla dwóch położen analizatora: 90° i 0° . Uzyskane wyniki pomiarów zapisujemy w tabeli pomiarowej, a następnie wyznaczamy stopień polaryzacji liniowej wiązki wyjściowej P_L^T :

$$P_L^T = \frac{GP_2^0 - GP_2^{90}}{GP_2^0 + GP_2^{90}}. \quad (1)$$

Zmianę stopnia polaryzacji liniowej światła, wywołaną przez propagację w badanej tkance, wyznaczamy zgodnie z zależnością:

$$\Delta P_L = \left| P_L^0 - P_L^T \right|. \quad (2)$$

19.2.3. Wyznaczenie zależności zmiany stopnia polaryzacji liniowej światła po przejściu przez badaną tkankę od kąta padania liniowo spolaryzowanej wiązki wejściowej

Należy wyznaczyć charakterystykę kątową zmiany stanu polaryzacji liniowej światła po przejściu przez badaną tkankę w zależności od kąta padania wiązki oświetlającej. Zmianę kąta padania wejściowej wiązki laserowej uzyskujemy poprzez zmianę położenia tkanki, czyli poprzez obrót statywu, w którym została ona uprzednio umieszczona. Kąt padania wiązki laserowej odczytujemy ze skali kątowej zamocowanej na statywie. Podobnie, jak w poprzednim zadaniu pomiarowym, dokonujemy pomiaru gęstości mocy wiązki przechodzącej przez tkankę dla dwóch położań analizatora: 90° i 0° . Wyniki pomiarów zapisujemy w tabeli pomiarowej. Na ich podstawie określamy wartości stopnia polaryzacji liniowej P_L^T . Serie pomiarów gęstości mocy wykonujemy dla różnych wartości kątów padania wiązki oświetlającej.

Dla jednego dowolnie wybranego kąta padania θ_{pad}^1 wiązki należy przeprowadzić pięć pomiarów gęstości mocy wiązki wyjściowej przy tej samej pozycji analizatora (90° lub 0°) poprzez obrót statywu z tkanką i ponowne jego ustawienie w danej pozycji θ_{pad}^1 . Na podstawie tych pomiarów należy wyznaczyć wartość średnią gęstości mocy dla kąta padania θ_{pad}^1 oraz odchylenie od wartości średniej, które określać będzie dokładności pomiaru gęstości mocy przy zmianie kąta padania wiązki wejściowej. Uzyskane dane pozwolą na graficzne przedstawienie zależności zmiany stopnia polaryzacji liniowej światła przechodzącego przez badany rodzaj tkanki od kąta padania wiązki laserowej na tkankę.

19.2.4. Wyznaczenie zależności gęstości mocy światła przechodzącego przez tkankę od kąta położenia osi transmisji analizatora

Należy dokonać pomiarów gęstości mocy wiązki laserowej GP_1^θ po przejściu przez tkankę dla różnych kątów położenia osi transmisji analizatora. Zmianę położenia osi transmisji dokonujemy, podobnie jak w poprzednich przypadkach, poprzez obrót oprawy analizatora. Pomiaru należy przeprowadzić dla kąta padania wiązki wejściowej równego 0° . Na podstawie danych pomiarowych należy sporządzić wykres zależności gęstości mocy wiązki wyjściowej od położenia kątowego osi transmisji analizatora.

19.2.5. Wyznaczenie zależności współczynnika transmisji światła przez badaną tkankę od kąta padania liniowo spolaryzowanej wiązki oświetlającej

Przy ustalonej orientacji osi transmisji analizatora równej 0° , należy przeprowadzić pomiary gęstości mocy GP_2^0 wiązki wyjściowej dla różnych kątów padania wiązki oświetlającej tkankę. W tym celu należy dokonać obrotu statywu z umieszczoną w nim tkanką oraz odczytać wartość kąta padania wiązki oświetlającej z podziałki kątowej, która została zamontowana na statywie. Na podstawie danych pomiarowych należy wyznaczyć wartości współczynnika transmisji światła spolaryzowanego liniowo przez badany rodzaj tkanki zgodnie z zależnością:

$$T_L[\%] = \left(\frac{GP_2^0}{GP_0} \right) \cdot 100\%. \quad (3)$$

Omawianą zależność należy przedstawić graficznie w postaci wykresu współczynnika transmisji $T_L[\%]$ i kąta padania wiązki wejściowej θ_{pad} . Jako niepewność pomiaru gęstości mocy GP_2^0 należy przyjąć odchylenie standardowe od wartości średniej wyznaczonej w poprzednich podpunktach. Niepewność wyznaczenia współczynnika transmisji należy określić metodą różniczki zupełnej.

19.3. Obrazowanie struktur powierzchniowych tkanek w świetle odbitym i przechodzącym w układzie polaryskopowym

W tej części proponujemy zapoznanie się z jedną z głównych technik obrazowania optycznego opartego na analizie światła odbitego w układzie polaryskopowym, która jest wykorzystywana w diagnostyce medycznej, szczególnie dermatologii. Należy przeprowadzić pomiary próbek preparatów tkankowych, które należy umieścić w odpowiednich oprawach, zgodnie z przedstawionym poniżej harmonogramem ćwiczenia.

Potrzebne elementy to:


- odbiciowy i transmisyjny mikroskop optyczny,
- lampa halogenowa,
- układ polaryskopowy ze statywem z uchwytem na badany preparat tkankowy,
- aparat cyfrowy,
- układ dwóch polaryskopów.

19.3.1. Obserwacja preparatów tkankowych w odbiciowym i transmisyjnym mikroskopie optycznym

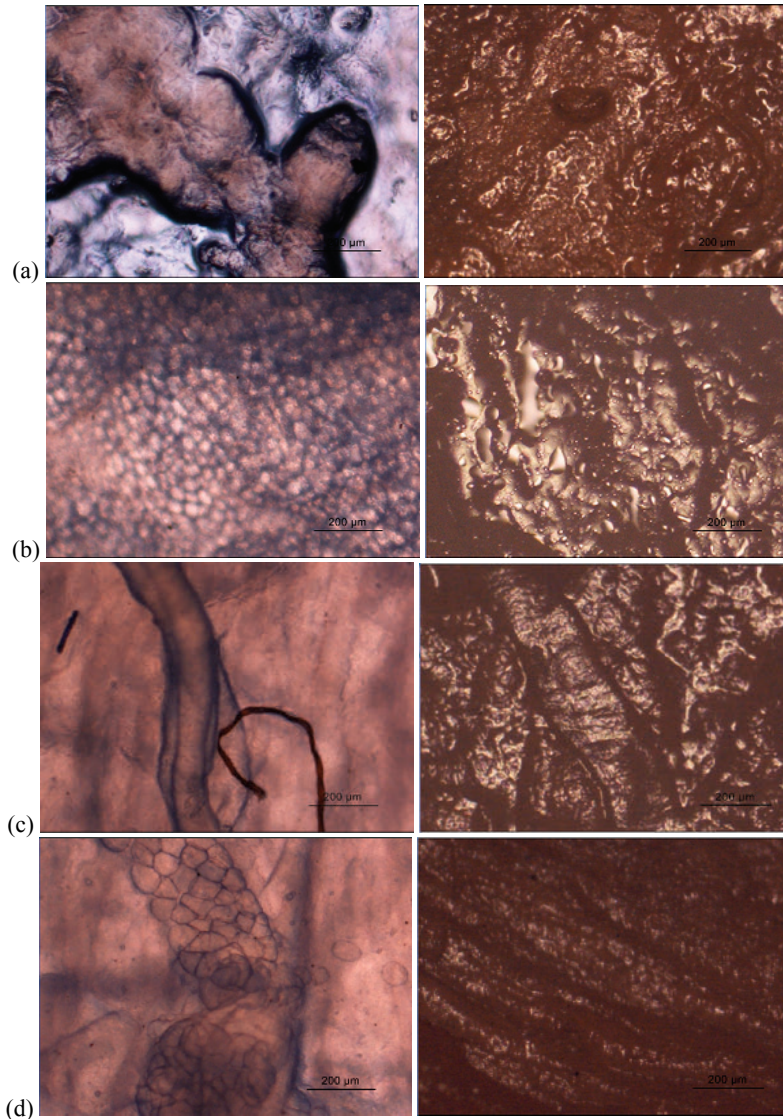
Na rysunku 19.2 przedstawiono schemat mikroskopu oraz objaśnienie poszczególnych jego elementów składowych. Na stoliku należy ułożyć szkiełko podstawowe, a na nim analizowane preparaty tkankowe. Należy uzyskać ostry obraz badanych próbek tkanek poprzez odpowiednią regulację pokręteł przesuwu pionowego i poziomego w obu trybach pracy mikroskopu tzn. transmisyjnym oraz odbiciowym (w zależności od przezroczystości próbki). Po uzyskaniu ostrego obrazu należy, zarejestrować zdjęcia preparatów poszczególnych rodzajów tkanek.



Rys. 19.2. Mikroskop optyczny [1]

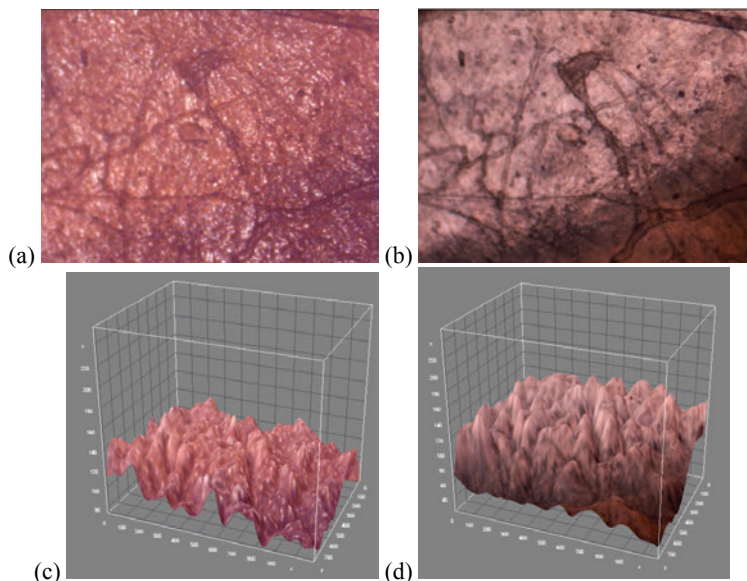
W sprawozdaniu należy zamieścić zarejestrowane zdjęcia oraz opisać, z czego wynikają różnice pomiędzy obrazami zarejestrowanymi w obu trybach pracy mikroskopu. Dodatkowo, korzystając z programu np. *ImageJ* [2], należy przygotować dwuwymiarowe rozkłady natężenia światła na powierzchni wybranych struktur tkankowych na podstawie zdjęć zarejestrowanych na mikroskopie (luminancja obrazu). W tym celu należy wybrać zakładkę *Plugins*, a następnie opcję *3D* oraz *Interactive 3D Surface Plot*. W ten sposób utworzone zdjęcia powierzchni tkanek z dyskretnym rozkładem wartości natężenia światła należy również zamieścić w sprawozdaniu oraz dokładnie opisać (patrz rys. 19.3). W przypadku przezroczystych preparatów tkankowych na podstawie transmisyjnych zdjęć mikroskopowych należy scharakteryzować właściwości transmisyjne tkanki. W tym celu należy pamiętać o takim zarejestrowaniu obrazu tkanki, aby widoczne było również tło. Następnie w programie *ImageJ* należy opracować przekrój poprzeczny zdjęcia tkanki. W tym celu należy zaznaczyć ikonę  dostępną na Pasku Narzędzi Programu *ImageJ*, a następnie na zdjęciu zaznaczyć odpowiedni kierunek przekroju.

Przeciągając kursor od jednej krawędzi obrazu tkanki do drugiej, w taki sposób, aby linia przechodziła przez tkankę oraz obejmowała również pewien niewielki obszar tła poza nią, wyznaczamy kierunek, wzdłuż którego analizować będziemy profil tkanki. Po zaznaczeniu tej linii, należy w zakładce *Analyze* wybrać opcję *Plot Profile*, która pozwoli na określenie profilu obrazu transmisyjnego tkanki.



Rys. 19.3. Zdjęcia preparatów tkankowych w trybie transmisyjnym (po lewej) oraz trybie odbiciowym (po prawej):
(a) odtuszczona świńska skóra, (b) nieodtuszczona świńska skóra, (c) aorta, (d) tchawica

Profile należy zamieścić w sprawozdaniu i za ich pomocą scharakteryzować właściwości transmisyjne analizowanych preparatów tkanek (patrz rys. 19.4).



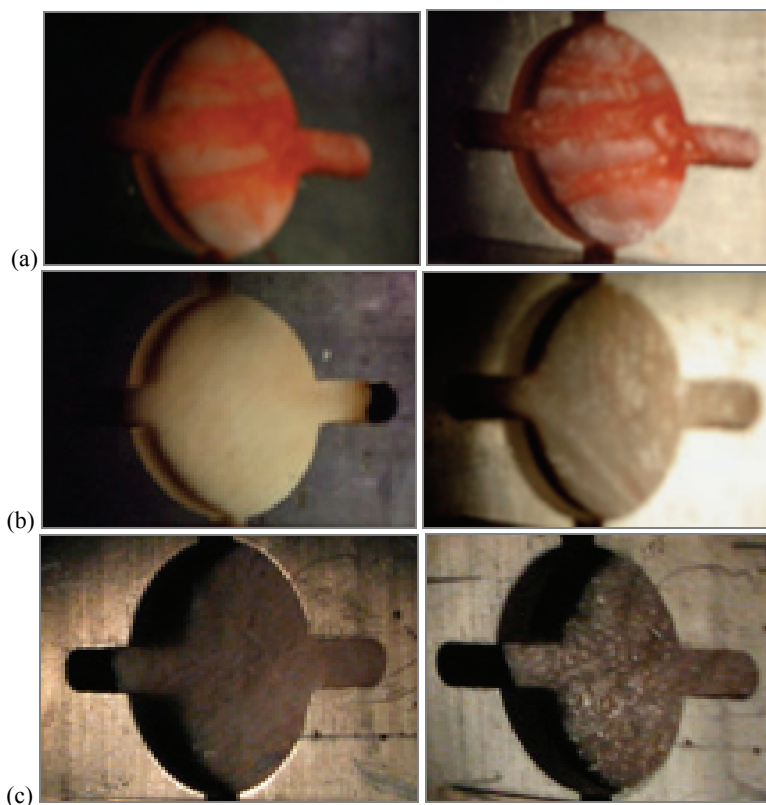
Rys. 19.4. (a) Zdjęcie tkanki wykonane w trybie odbiciowym, (b) Zdjęcie tkanki wykonane w trybie transmisyjnym, (c) Trójwymiarowa reprezentacja struktury tkankowej wykonana na podstawie zdjęcia (a), (d) trójwymiarowa reprezentacja struktury tkankowej wykonana na podstawie zdjęcia (b)

19.3.2. Obserwacja preparatów tkankowych w układzie polaryskopowym w świetle odbitym

Analizowane preparaty tkankowe należy umieścić w odpowiednim mocowaniu, a następnie w statywie posiadającym podziałkę kątową charakteryzującą położenie badanych próbek w stosunku do układu polaryzatorów. Korzystając z lampy halogenowej, należy w jednorodny sposób oświetlić powierzchnię tkanki, dodatkowo stosując w tym celu przesłonę irysową. Pomiedzy źródłem światła a badaną tkanką należy umieścić polaryzator liniowy. W pierwszej kolejności należy określić taką konfigurację układu polaryzatorów liniowych (polaryzatora i analizatora), aby uzyskać krzyż polaryskopowy, czyli minimalne natężenie wiązki wyjściowej po przejściu przez polaryzator. W tym celu należy umieścić źródło światła, polaryzator i analizator współliniowo (bez badanej próbki). Analizator wyposażony jest w podziałkę kątową, która pozwala określić w dokładny sposób kątowe położenie jego osi transmisji. W pierwszej kolejności należy ustawić podziałkę kątową w pozycji 90° , a następnie obracać sam analizator aż do momentu uzyskania minimalnego na-

tężenia wyjściowej wiązki świetlnej lub też jej całkowitego wygaszenia. Po uzyskaniu tego warunku, podczas obrazowania w świetle odbitym, należy obracać jedynie oprawą analizatora z podziałką kątową, a sam analizator powinien pozostać w niezmięnionej pozycji.

Najpierw należy badaną próbkę ustawić w pozycji 45° względem polaryzatora ze źródłem światła. Obracając analizator, obserwujemy powierzchnię tkanki w świetle odbitym i sporządzamy notatki opisujące różnice pomiędzy obrazami tkanki w różnych położeniach analizatora. Za pomocą aparatu cyfrowego rejestrujemy zdjęcia tkanki najbardziej się między sobą różniące. W ten sam sposób analizujemy wszystkie dostępne rodzaje tkanek. W sprawozdaniu należy umieścić wszystkie notatki z obserwacji różnych rodzajów tkanek w świetle odbitym w układzie polaryskopowym, jak również zarejestrowane zdjęcia. Należy skomentować możliwość obserwacji poszczególnych struktur powierzchniowych tkanki w świetle spolaryzowanym.



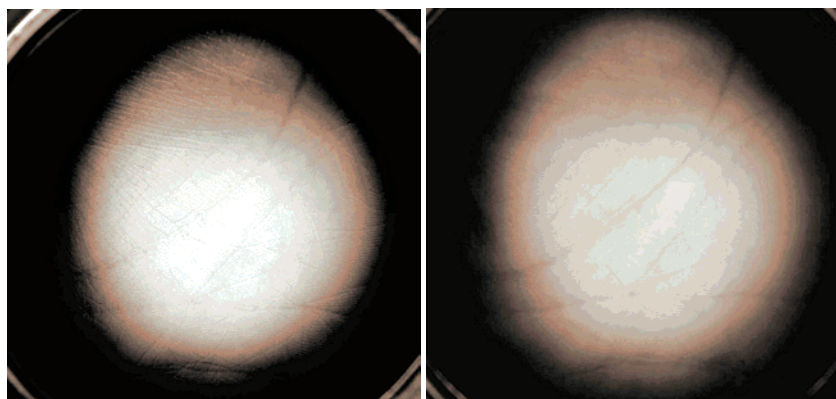
Rys. 19.5. Zdjęcia tkanek zarejestrowanych w świetle odbitym:
 (a) wypreparowanej powierzchni aorty; (b) skóry kurczaka; (c) skóry właściwej świni.
 Zdjęcia po prawej stronie odpowiadają skrzyżowanym osiom transmisji polaryzatorów,
 po lewej równoległym osiom transmisji

Przykładowe zdjęcia przedstawione zostały na rys. 19.5. Widzimy, iż przy równoległym ustawieniu osi transmisji polaryzatorów dostrzec można strukturę powierzchni tkanki, podczas, gdy dla prostopadłych osi transmisji, strukturę wewnętrzną.

W tej części należy przeprowadzić analizę wpływu kąta padania wiązki oświetlającej na obserwowany obraz uzyskany w świetle odbitym. W tym celu należy zmieniać położenie mocowania tkanki poprzez jej obrót. Kąt padania odczytujemy z podziałki kątovej umieszczonej na statywie próbki. Należy zanotować wyniki obserwacji, które zostaną zamieszczone w sprawozdaniu. Należy zauważyć, iż odbicie od powierzchni tkanki ma charakter dyfuzyjny.

19.3.3. Obserwacja powierzchni skóry w układzie polaryskopowym w świetle odbitym

Należy dokonać obserwacji powierzchni własnej skóry w układzie polaryskopowym w świetle odbitym. W tym celu należy wymontować statyw z próbką z układu pomiarowego. W miejsce to należy umieścić dłoń. Obserwujemy skórę dłoni od strony grzbietowej i dłoniowej w różnych pozycjach analizatora. Następnie w układzie należy umieścić przedramię i analizować obrazy powierzchni skóry w ten sam sposób. W szczególności należy się skupić na wszelkiego rodzaju znamionach barwnych, siniakach, wylewach podskórnych, ranach, bliznach itp., jeżeli możliwa jest obserwacja takich stanów. W raporcie należy zawrzeć notatki z obserwacji oraz sfotografowane poszczególne obrazy powierzchni skóry (patrz rys. 19.6). Wszystkie wyniki analizy należy zamieścić w sprawozdaniu i w odpowiedni sposób skomentować.

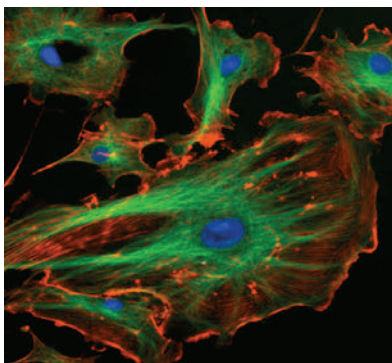


Rys. 19.6. Zdjęcia skóry wewnętrznej (dłoniowej) powierzchni ręki:

- (a) skrzyżowane osie transmisji polaryzatorów,
- (b) równoległe osie transmisji polaryzatorów

19.4. Komputerowa analiza zdjęć komórek biologicznych

Ćwiczenie laboratoryjne polega na analizie obrazów fluorescencyjnych komórek, m.in. śródbłonka. Przykładowy cytoszkielet komórek śródbłonka został przedstawiony na rys. 19.7. Mikrotubule na zdjęciu fluorescencyjnym są zabarwione na kolor zielony, aktyna ma kolor czerwony, podczas gdy DNA zawarte w jądrach komórkowych ma barwę niebieską. Należy jednak podkreślić, że w przypadku struktur komórkowych wzbudzanych w inny sposób, emisja promieniowania może następować w innych pasmach spektralnych, czyli mieć inną barwę na zdjęciach fluorescencyjnych.



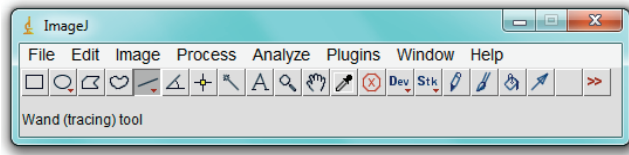
Rys. 19.7. Przykładowe zdjęcie fluorescencyjne komórek śródbłonka [3]

Ze względu na to, iż poszczególne struktury biologiczne emitują promieniowanie o różnych długościach fal, w celu ich wyodrębnienia pomocna jest komputerowa analiza zdjęć fluorescencyjnych, która pozwala m.in. na przetwarzanie poszczególnych kanałów (R, G lub B) kolorowego obrazu RGB. Takie rozwiązanie będzie podstawowym narzędziem wykorzystywanym w badaniach zdjęć fluorescencyjnych prowadzonych w ramach niniejszego ćwiczenia laboratoryjnego.

Zdjęcia fluorescencyjne komórek śródbłonka, które będą analizowane podczas ćwiczenia laboratoryjnego, należy w sprawozdaniu opisać. Komputerowa analiza informacji obrazowej zostanie przeprowadzona za pomocą programu *ImageJ*, który można pobrać bezpośrednio ze strony [2].


19.4.1. Wstępna obróbka zdjęć w programie *ImageJ*

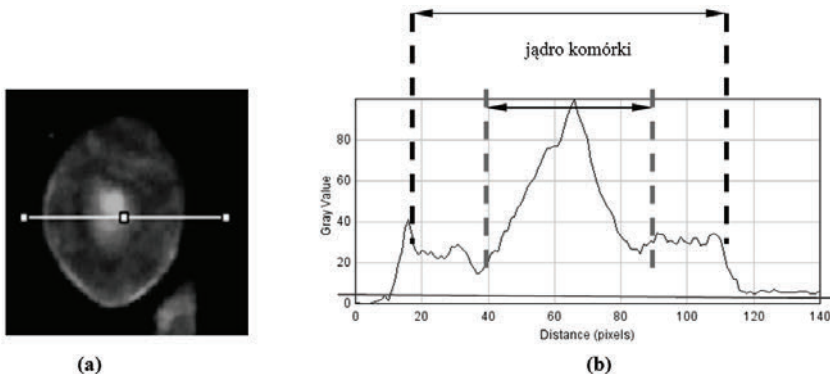
Należy otworzyć program *ImageJ* (patrz rys. 19.8). W zakładce *File* należy zaznaczyć *Open*, znaleźć katalog ze zdjęciami fluorescencyjnymi oraz wybrać zdjęcia, które będą poddane obróbce komputerowej.

Rys. 19.8. Okno główne programu *ImageJ*

W celu polepszenia jakości zdjęć, czyli ich wyostrenia, należy w zakładce *Process* zaznaczyć opcję *Sharpen*. Z kolei, aby poprawić kontrast, należy w tej samej zakładce zaznaczyć opcję *Enhance Contrast*.

19.4.2. Charakteryzacja obrazów fluorescencyjnych komórek biologicznych za pomocą programu *ImageJ*

W celu charakteryzacji obrazów fluorescencyjnych komórek biologicznych należy zaznaczyć ikonę  dostępną na pasku narzędzi programu *ImageJ*, a następnie na zdjęciu wybrać odpowiednią komórkę, która będzie analizowana. Przeciągając kursor od jednej krawędzi obrazu komórki do drugiej, w taki sposób, aby linia przechodziła przez jądro komórkowe oraz obejmowała również pewien niewielki obszar tła poza komórką, wyznaczamy kierunek, wzdłuż którego analizować będziemy profil komórki. Po zaznaczeniu tej linii, należy w zakładce *Analyze* wybrać opcję *Plot Profile*, która pozwoli na określenie profilu obrazu fluorescencyjnego komórki (patrz rys. 19.9). Wyznaczony profil będzie wykresem dyskretnych wartości natężenia obrazu fluorescencyjnego, zapisanych w skali szarości (0–255) oraz długości zaznaczonej linii (długość w pikselach). Profil należy zapisać poprzez zaznaczenie pod wykresem (patrz rys. 19.9b) ikony *List*.



Rys. 19.9. (a) Kierunek wzdłuż którego wyznaczony zostanie profil, (b) profil komórki wzdłuż zaznaczonej linii (czerwona linia wyznacza natężenie tła – *background*)


Następnie w nowym oknie reprezentującym tabelę opisującą profil, które pojawiło się po odznaczeniu tej opcji, należy wejść do zakładki *File* i zaznaczyć opcję *Save as*. Program *ImageJ* w domyśle zapisze niniejszy profil w postaci tabeli w formacie *.xls*.

Histogram jest niezwykle przydatnym narzędziem analizy danych. Stanowi on graficzne przedstawienie liczby pikseli o danej wartości natężenia w skali szarości. Należy wygenerować histogramy dla poszczególnych kanałów R, G, B, wybierając w zakładce *Plugins* opcję *Macros* i *RGB histogram*, a następnie zapisać obrazy poszczególnych histogramów.

Celem opracowywania wyników na podstawie zapisanych profili, należy sporządzić wykresy w *Excelu*, a następnie scharakteryzować natężenie fluorescencji (w stosunku do tła) poszczególnych obszarów komórki, jak również wyznaczyć rozmiar poprzeczny całej komórki oraz jej jądra wzdłuż linii wyznaczającej kierunek określenia profilu. Dodatkowo w sprawozdaniu konieczne jest zamieszczenie wszystkich zdjęć z zaznaczoną linią wyznaczającą kierunek analizowanego przekroju (patrz rys. 19.9a). Na profilach przygotowanych w programie *Excel* powinno być zaznaczone jądro komórki oraz jej ciało (patrz rys. 19.9b) oraz przypadające wartości natężenia pikseli w skali szarości (*gray scale* – od 0 do 255). W sprawozdaniu należy umieścić również histogramy poszczególnych kanałów R, G, B oraz podać średnią wartość natężenia pikseli (*Mean*) oraz odchylenie standardowe (*StdDev*). Należy zamieścić również spostrzeżenia dotyczące średniej wartości natężenia pikseli w kontekście efektywności fluorescencji poszczególnych struktur komórkowych.

19.4.3. Określenie rozmiarów komórki oraz jej jądra na podstawie analizy jej profilu w jednym z kanałów R, G lub B zdjęcia fluorescencyjnego

Dostępne w ćwiczeniu laboratoryjnym zdjęcia są zdjęciami kolorowymi, czyli zarejestrowanymi w trybie RGB. Wzbudzenie fluorescencji komórek umożliwia analizę poszczególnych struktur komórkowych, gdyż emitują one promieniowanie w różnych pasmach spektralnych. W celu wyodrębnienia jądra oraz ciała komórkowego komórek śródbłonna należy przeprowadzić separację kanałów: czerwonego (R – red), zielonego (G – green) oraz niebieskiego (B – blue) oraz wybrać te, dla których fluorescencja jądra lub ciała komórkowego jest najlepiej widoczna. W tym celu w zakładce *Image* na pasku narzędzi zaznaczamy opcje *Color*, a następnie *Split channels*. W ten sposób wybrane obrazy (dla dwóch kanałów, R, G lub B) poddane zostaną dalszemu komputerowemu przetwarzaniu informacji obrazowej w celu analizy fluorescencji poszczególnych struktur komórkowych oraz określenia ich ilości oraz przybliżonych rozmiarów.

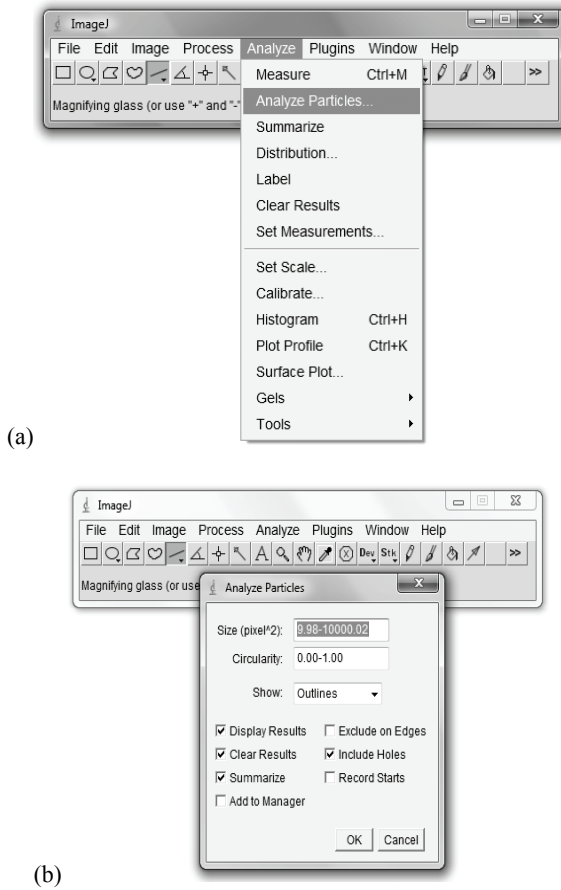
W celu realizacji tego zadania pomiarowego należy zaznaczyć ikonę  dostępną na pasku narzędzi programu *ImageJ*. Następnie na zdjęciu wybieramy odpowiednie struktury komórkowe (różne jądra oraz ciała komórkowe) i przeciągając kursor od jednej krawędzi tego obiektu do drugiej, wyznaczamy kierunek, wzdłuż którego sporządzony zostanie profil. Postępując podobnie, jak w poprzednim punkcie, zapisujemy profile różnych wybranych komórek oraz jąder komórkowych (w odpowiednich dla nich kanałach R, G lub B, w których są najbardziej uwidocznione) w formacie *.xls*.

Na podstawie zapisanych danych pomiarowych przedstawiających profile analizowanych obiektów należy w *Excelu* sporządzić wykresy oraz określić rozmiary poprzeczne (w pikselach). W sprawozdaniu konieczne jest zamieszczenie zdjęć oraz profili analizowanych obiektów (zarówno tych z programu *ImageJ*, jak również przygotowanych w *Excelu*). Należy uwzględnić, jaki zakres wartości natężenia (*gray scale*) przypada na rozważaną strukturę. Podobnie, jak w poprzednim przypadku należy zapisać obrazy zdjęć z wyznaczonymi kierunkami profilu. W sprawozdaniu zamieszczone powinny zostać również obrazy trzech kanałów R, G i B wejściowego zdjęcia RGB oraz krótkie spostrzeżenia dotyczące widoczności poszczególnych struktur w każdym kanale.

19.4.4. Analiza rozkładu rozmiarów struktur komórkowych na postawie analizy obrazu w jednym z kanałów R, G, lub B z wykorzystaniem funkcji *Analyze Particles*


W celu przeprowadzenia analizy rozmiarów poprzecznych (w pikselach) komórek oraz jąder komórkowych należy skorzystać z funkcji *Analyze Particles* znajdującej się w zakładce *Analyze* na pasku narzędzi programu *ImageJ* (patrz rys. 19.10a).

Funkcja ta umożliwi określenie liczby obiektów o predefiniowanym polu powierzchni oraz określenie średniego pola powierzchni obiektów dzięki wyznaczeniu współczynnika cyrkularności, którego wartość 1 oznacza idealne koło, natomiast wartości z przedziału (0, 1) oznaczają bardziej złożone struktury o nieregularnych kształtach, a tym samym bardziej dokładne przybliżenie obszaru zajmowanego przez badany obiekt. Zaznaczenie wartości współczynnika cyrkularności równej 1 sprawia, iż analizowane są jedynie obiekty o kształcie zbliżonym do koła, podczas, gdy pozostałe o bardziej nieregularnych kształtach są pomijane. Z kolei dla wartości tego współczynnika równej 0, analizowane będą obiekty o nieregularnych kształtach, a tym samym znajdujące się bardzo blisko siebie obiekty lub też dodatkowe artefakty, które nie są przedmiotem analizy, zostaną potraktowane jako jeden obiekt, co może wprowadzić istotne błędy w ocenie rozmiarów obiektów. Z tego też powodu dobór wartości tego współczynnika w istotny sposób może wpływać na poprawność prowadzonej analizy.

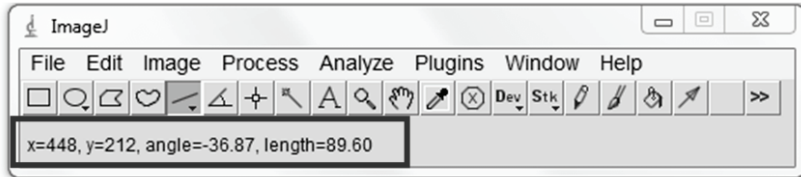


Rys. 19.10. Aplikacja programu do analizy rozmiarów badanych obiektów

W pierwszej kolejności należy utworzyć binarną reprezentację obrazów analizowanych obiektów w kanałach R, G, B najbardziej je uwidaczniających. Można tego dokonać, wybierając obraz w odpowiednim kanale, zaznaczając w zakładce *Process* opcję *Binary*, a następnie opcję *Convert to Mask*. Po wybraniu opcji *Analyze Particles* pojawia się okno umożliwiające zdefiniowanie odpowiednich parametrów prowadzonej analizy (patrz rys. 19.10b), takich jak pole powierzchni (*Size*) w jednostkach piksel^2 (pixels^2) oraz współczynnik cyrkularności (*Circularity*). Analizę przeprowadzamy dla wybranych wartości współczynnika cyrkularności z zakresu od 0 do 1.

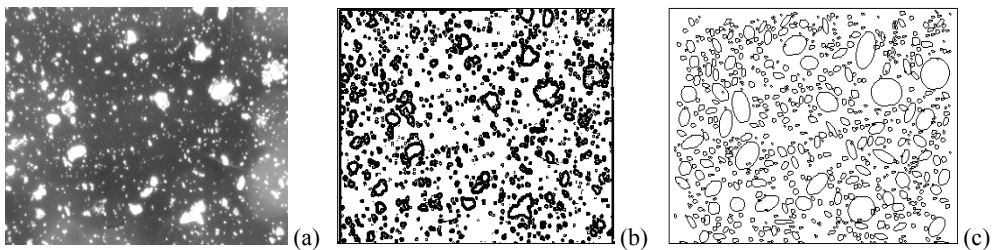
Najistotniejsze jest oszacowanie zakresu rozmiarów, jakie przyjmują badane obiekty na zdjęciu (cała komórka, jądro). W tym celu należy wyodrębnić jeden z najmniejszych oraz największych obiektów, a następnie zaznaczyć ikonę . Zaznaczając kursorem przekrój obiektu, podobnie, jak w przypadku wyznaczania

profilu obiektów, w dolnej części paska narzędzi (patrz rys. 19.11) pojawia się informacja na temat rozmiarów poprzecznych badanego obiektu (*length*) wyrażona w pikselach. Na podstawie tych danych możemy oszacować przedział pól powierzchni obiektów, które będą badane i wpisać go do okna predefiniującego parametry analizy (patrz rys. 19.10b).



Rys. 19.11. Określenie rozmiaru poprzecznego analizowanego obiektu

Współczynnik cyrkularności należy określić eksperymentalnie poprzez dobór najlepszego dopasowania obszaru zajmowanego przez analizowane obiekty. Poprzez wybór w opcji *Show* funkcji *Outlines*, możliwe jest graficzne przedstawienie dopasowania obszaru obiektu poprzez figury o kształtach predefiniowanych przez współczynnik cyrkularności. Ta opcja umożliwi kontrolę odpowiedniego doboru tego współczynnika (patrz rys. 19.12). Należy wybrać różne wartości współczynnika cyrkularności dla każdego zdjęcia w celu przeanalizowania wpływu jego doboru na poprawność analizy. Aby usprawnić prowadzoną analizę, należy w oknie poleceń (patrz rys. 19.10b) zaznaczyć dodatkowe opcje *Exclude on Edges*, wykluczając obiekty znajdujące się na brzegu zdjęć (na skraju pola widzenia mikroskopu fluorescencyjnego rejestrującego zdjęcia) oraz opcję *Include holes*.



Rys. 19.12. Przykładowa analiza zdjęć porów czystego białka:

- (a) zdjęcia porów, (b) binarny obraz porów po szkieletyzacji,
(c) dopasowanie porów figurami do kształcie zdefiniowanym przez współczynnik cyrkularności

W celu wygenerowania tabeli zawierającej liczbę obiektów o określonych rozmiarach należy w oknie poleceń (patrz rys. 19.10b) zaznaczyć opcję *Display Results*, która sprawia, że po każdej analizie wyświetlone zostanie zbiorcze zestawienie uzyskanych

wyników. Określony w ten sposób rozkład rozmiarów obiektów należy zapisać w formacie *.xls*. Należy również zapisać obrazy poszczególnych kanałów R, G i B, maski binarne początkowych zdjęć oraz obrazy dopasowania obiektów figurami o kształcie zdefiniowanym przez współczynnik cyrkularności (patrz rys. 19.12c). Na podstawie zapisanych tabel zbiorczych należy sporządzić wykresy przedstawiające liczbę obiektów o danym rozmiarze, wyznaczyć średni rozmiar obiektów oraz przeanalizować wpływ wartości współczynnika cyrkularności na poprawność prowadzonej analizy.

19.5. Zastosowanie lampy Wooda w diagnostyce fluorescencyjnej

19.5.1. Wprowadzenie

Robert Wood [4, 5, 6] (1868–1955), amerykański fizyk, autor wielu wynalazków z dziedziny optyki, spektroskopii, mikroskopii, elektryczności etc. zaproponował wykorzystanie światła ultrafioletowego i podczerwonego w fotografii. W diagnostyce stosowana jest lampa Wooda (patrz rys. 19.13), emitująca promieniowanie ultrafioletowe o długości fali o maksimum w zakresie ok. 360–365 nm. Dzięki filtrowi, wyeliminowane jest światło w zakresie widzialnym. Filtr Wooda z krzemianu baru z dodatkiem 9% tlenku niklu ma pasmo przepuszczania w zakresie 300–400 nm.



Rys. 19.13. Przykładowa lampa Wooda wykorzystywana do realizacji zajęć laboratoryjnych

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z podstawami diagnostyki medycznej opartej na zjawisku fluorescencji wzbudzonej promieniowaniem ultrafioletowym. Jako

wymagania wstępne należy posiadać podstawową wiedzę, dotyczącą następujących zagadnień:

- zastosowanie lampy Wooda,
- podział promieniowania ultrafioletowego,
- luminescencja,
- stan singletowy, trypletowy,
- barwy oraz odpowiadające im zakresy długości fal,
- oddziaływanie promieniowania UV na struktury tkankowe.

Promieniowanie ultrafioletowe jest podzielone na cztery zakresy w zależności od długości fali:

- ultrafiolet długofalowy UVA (315–400 nm),
- ultrafiolet średniofalowy UVB (290–315 nm),
- ultrafiolet krótkofalowy UVC (200–290 nm),
- ultrafiolet próżniowy UVV (100–200 nm).

Zakres promieniowania ultrafioletowego, czyli nadfioletowego dzielimy umownie ze względu na jego biofizyczne właściwości na 4 części:

- UV próżniowy 100–200 nm – można go badać tylko w próżni, gdyż fale o odpowiadających mu długościach są bardzo silnie pochłaniane przez powietrze;
- UVC 200–280 nm – praktycznie nie dociera do powierzchni Ziemi, gdyż jest pochłaniane przez ozon;
- UVB 280–320 nm;
- UVA 320–400 nm.

Większość padającego na skórę UVB nie pokonuje bariery naskórka – zostaje odbita lub pochłonięta przez komórki, natomiast około 50% UVA przenika głębiej. Jeszcze niedawno nie wywoływało to zaniepokojenia, gdyż za szkodliwe uznawano jedynie nadmierne promieniowanie UVB (rumieniotwórcze). Tylko ono bowiem (a nie UVA) wywołuje rumień po opalaniu i przyczynia się do poważnych poparzeń skóry. UVA jest promieniowaniem o długości 320–400 nm, jest mniej rumieniogenne, ale za to bardziej barwnikotwórcze od UVB. Ilość UVA docierająca do powierzchni Ziemi jest znacznie większa niż UVB. Wysokie dawki UVA mogą wzmacniać odczyny rumieniowe i zwiększać niekorzystne efekty biologiczne promieniowania UVB.

Promieniowanie UVA stanowi ponad 95% promieniowania UV, przenika ono przez szkło okienne, działa słabiej niż UVB, ale dociera w skórze najgłębiej, bo do warstwy rozrodczej naskórka i w okolice naczyń krwionośnych, cechuje się słabym działaniem fotochemicznym i nie wywołuje odczynu rumieniowego skóry. W dużych dawkach powoduje natychmiastową pigmentację skóry, czyli ciemnienie, wskutek utlenienia melatoniny – barwnika istniejącego w skórze. Barwnik posiada zdolność pochłaniania promieniowania słonecznego, dlatego zbrązowienie skóry pod wpływem UVA chroni ją przed tym promieniowaniem. Ochronę przed promieniowaniem stanowi też naskórek, który grubieje pod wpływem promieniowania.

Zabarwienie jakie daje światło z lampy Wooda na skórze	
Zielone	Na ten kolor świecą pterydyny wydzielane przez grzyby chorobotwórcze
Koralowo-czerwone	Ten odcień daje łupież pstry
Zielone zabarwienie światła	Spowodowane obecnością Pseudomonas
Niebiesko-biała fluorescencja	Zmiany hipopigmentacyjne i depigmentacyjne
Niebiesko-fioletowy	Cera normalna
Zabarwienie bladoróżowe	Cera sucha
Zabarwienie prawie czarne	Cera tłusta
Zabarwienie biało - srebrne	Skóra nadmiernie zrogowaciała
Pomarańczowo - żółte	Zmiany trądzikowe

Rys. 19.14. Zmiany uwidaczniane na skórze w świetle emitowanym przez lampę Wooda [7]

Lampa Wooda znajduje zastosowanie m.in. w:

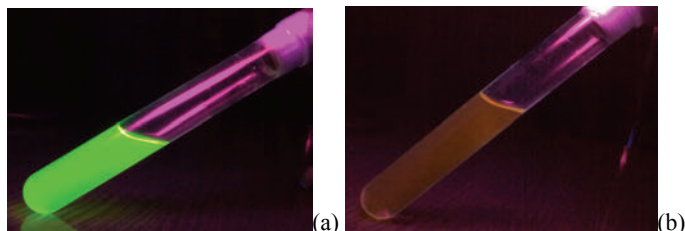
- dermatologii i kosmetologii do oceny skóry, paznokci i skóry owłosionej (zakażeń grzybiczych, zmian łojotokowych, zmian barwinkowych np. bielactwo),
- stomatologii (zmiany na zębach, na dziąsłach, np. porfiria),
- onkologii, także w połączeniu z zewnętrznymi światłouczulaczami,
- kryminologii (np. do wykrywania sfalszowanych dokumentów, banknotów etc.).

Przykładowe zmiany uwidaczniane na skórze w świetle emitowanym przez lampę Wooda przedstawiono na rys. 19.14 [8].

19.5.2. Przebieg ćwiczenia

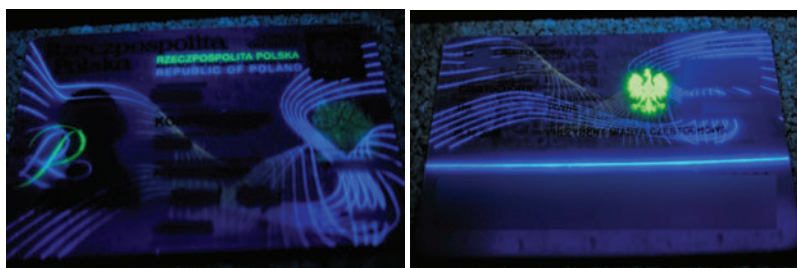
Podczas wykonywania ćwiczenia należy przestrzegać reguł i zasad BHP, w szczególności nie należy kierować lampy w okolice oczu. Pierwsza część ćwiczenia polega na analizie różnego rodzaju barwników fluorescencyjnych (np. porfiryny, ryboflawina, chloriny).

Należy umieścić lampę Wooda nad pojemnikami z barwnikami i zarejestrować zdjęcie w ultrafiolecie (patrz rys. 19.15). Następnie za pomocą skali barw, należy określić długość fali, którą emituje wzbudzony barwnik. Korzystając z informacji o widmach, należy określić, jakie związki mogą znajdować się w pojemnikach.



Rys. 19.15. Zdjęcie barwnika w ultrafiolecie (a) ryboflawiny, (b) protoporfiryny IX

Do dalszych badań należy wykorzystać dowolne banknoty oraz dokumenty osobiste (patrz rys. 19.16). Należy umieścić lampę Wooda nad dowolnym banknotem i sfotografować awers i rewers. Za pomocą dowolnego programu graficznego należy wskazać na zdjęciach miejsca, w których umieszczono znaki fluorescencyjne oraz należy przyporządkować odpowiednią długość fali danej barwie. Należy również dokonać analizy dłoni od strony grzbietowej (w szczególności paznokci) oraz dłoniowej.



Rys. 19.16. Zdjęcie dowodu osobistego w świetle UV [9]

W tym celu należy zarejestrować obraz obu dłoni i opisać czym różnią się zapisane obrazy, czy widoczne są zmiany w stosunku do obrazu w świetle białym oraz czy widoczne są jakieś zmiany patologiczne. Tę samą procedurę można powtórzyć dla skóry na czole, owłosionej skóry głowy, zębów. Sprawozdanie powinno zawierać wszystkie wykonane zdjęcia, obróbkę, omówienie wyników.

19.6. Spektroskopia skóry

19.6.1. Wprowadzenie

Pomiary spektroskopowe znajdują coraz szersze zastosowanie jako narzędzie biometryczne, służące m.in. do identyfikacji osób w systemach kontroli, zabezpieczeniach. Spektroskopia skóry może znaleźć zastosowanie w badaniach nieinwazyjnych, np. w wykrywaniu cukrzycy II stopnia. Prowadzone są prace nad wykorzystaniem metod optycznych do identyfikacji różnego rodzaju znamion, zmian patologicznych, ran etc.

Jak wiadomo, światło może być zarówno pochłaniane, jak i rozpraszane przez tkanki [10]. Rozpraszanie w skórze spowodowane jest m.in. ułożeniem włókien kolagenowych [11]. Natomiast pochłanianie związane jest z obecnością chromoforów np. melaniny. Głębokość penetracji światła zależy od długości fali padającej i zawartości barwników w skórze. Na podstawie spektrum odbiciowego skóry można uzyskać informacje na temat rozkładu i stężenia różnych chromoforów obecnych w skórze.

Celem ćwiczenia jest zapoznanie się z metodą spektroskopowych pomiarów odbiciowych oraz przeprowadzenie pomiarów właściwości spektroskopowych skóry.

Do wymagań wstępnych należą zagadnienia z zakresu:

- budowy skóry,
- absorpcji, rozpraszania odbicia,
- oddziaływania światła z tkankami.

19.6.2. Budowa skóry

Skóra zbudowana jest z trzech warstw: naskórka, skóry właściwej i tkanki podskórnej [12]. Naskórek jest warstwą zewnętrzną, pełniącą funkcję ochronną i składa się głównie z komórek nabłonka (keranocytów). Jedną z jego funkcji jest ochrona m.in. przed promieniowaniem, co następuje dzięki obecności melaniny. W skórze właściwej, zbudowanej z tkanki łącznej, znajdują się włókna kolagenowe oraz elastyna, wpływające na napięcie skóry. Włókna kolagenowe pełnią istotną rolę w skórze, mianowicie od ich kondycji zależy jej wygląd zewnętrzny. Tkanka podskórna jest zbudowana z tkanki tłuszczowej i łącznej; pełni m.in. funkcje magazynujące. W tej

warstwie znajdują się naczynia krwionośne, chłonne, nerwy. Skóra ma za zadanie chronić organizm przed szkodliwymi czynnikami zewnętrznymi – temperaturą, uszkodzeniami mechanicznymi, chemicznymi oraz promieniowaniem.

Ponadto, w naskórku powstają wytwory tzw. przydatki skóry, jak paznokcie czy włosy. Żeby skóra mogła pełnić swoją rolę, w jej strukturze znajdują się gruczoły i receptory, pozwalające na adaptację organizmu do różnych warunków. Jednocześnie dzięki obecności zakończeń nerwowych w skórze, możliwe jest odczuwanie zmian temperatury, proces czucia, dotyku. Główne funkcje skóry, to:

- bariera przed środowiskiem zewnętrznym,
- termoregulacja,
- udział w gospodarce wodno-elektrolitowej,
- metabolizm tłuszczów, węglowodanów, białek, hormonów i witamin,
- percepcja bodźców,
- magazynowanie materiałów zapasowych,
- wchłanianie,
- melanogeneza (wydzielanie melaniny pod wpływem promieniowania UV).

Najważniejszym pigmentem skóry jest melanina. Z chemicznego punktu widzenia, jest ona polimerem, nadającym barwę skórze właściwej, naskórkowi i tęczówce oka. Zależnie od rozmieszczenia może nadawać barwę od pomarańczowej do czarnej. Od zawartości melaniny w cebulce zależy kolor włosów. Osoby o włosach blond mają niską zawartość tego barwnika. Melanina powstaje w melanocytach, znajdujących się w warstwie podstawnej naskórka. Wyróżnia się trzy rodzaje melanin:

- eumelanina – barwnik czarno-brązowy,
- feomelanina – barwnik żółtoczerwony,
- neuromelanina – powstaje z dopaminy.

Widmo spektroskopowe skóry zależy od:

- głębokości penetracji światła,
- zawartości i rozmieszczenia barwnika,
- ukrwienia skóry.

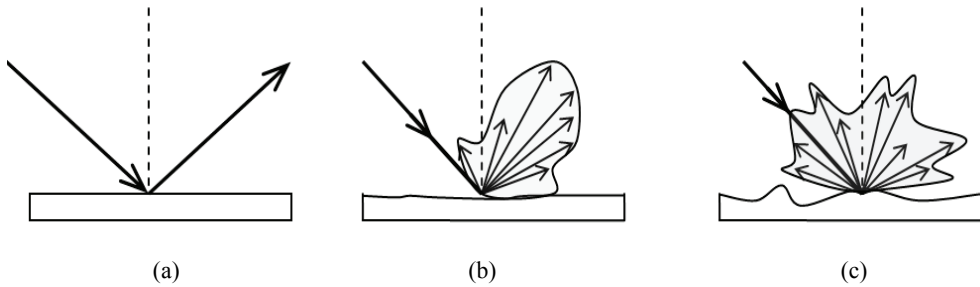
Funkcje skóry możemy podzielić na:

- bierne:
 - ochrona przed zimnem, ciepłem, promieniowaniem,
 - ochrona przed uciskiem, uderzeniem, tarcieniem,
 - ochrona przed działaniem substancji chemicznych,
 - ochrona przed wnikaniem drobnoustrojów poprzez wytworzenie płaszcza lipidowego.
- aktywne:
 - ochrona przed mikroorganizmami, które przeniknęły do wnętrza skóry,
 - wchłanianie odpowiednich substancji czynnych,
 - wydalanie potu – ochładzanie organizmu, wraz z gruczołami łojowymi wytwarzanie płaszcza lipidowego,

- regulacja krążenia krwi i termoregulacja dzięki ukrwieniu skóry,
- narząd zmysłu odbierający bodźce ucisku, drgań, bólu, temperatury.

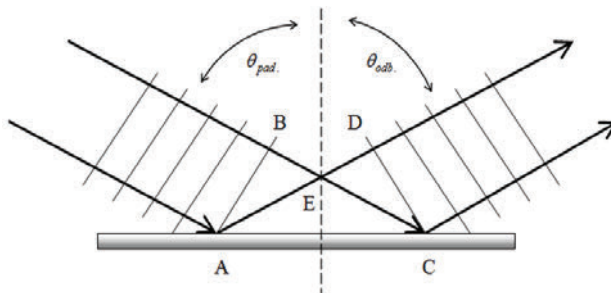
19.6.3. Spektroskopia odbiciowa

Spektroskopia odbiciowa bada widma powstałe na skutek odbicia wiązki światła od badanej powierzchni. W zależności od chropowatości powierzchni odbijającej, możemy mieć do czynienia ze zjawiskiem odbicia bądź rozproszenia fali. W przypadku powierzchni granicznych o nierównościach większych od długości fali padającej, mamy do czynienia z odbiciem fali we wszystkich kierunkach, czyli rozproszeniem fali. Jeżeli chropowatości są mniejsze od długości fali, wtedy wiązka odbita ma charakter kierunkowy, czyli większość światła jest odbita w jednym kierunku. Natomiast w przypadku powierzchni gładkich zachodzi zjawisko odbicia lustrzanego (patrz rys. 19.17).



Rys. 19.17. Rodzaje odbicia światła: (a) odbicie zwierciadlane (lustrzane), (b) (c) odbicie dyfuzyjne dla zmniejszających się w stosunku do długości fali światła wymiarów nierówności powierzchni

Prawo odbicia mówi o tym, że kąt padania θ_{pad} jest równy kątowi odbicia θ_{odb} . Natomiast promień padający, odbity i normalna do powierzchni odbijającej leżą w jednej płaszczyźnie (patrz rys. 19.18).



Rys. 19.18. Graficzne przedstawienie prawa odbicia

W próbkach biologicznych mamy do czynienia z sytuacją, kiedy zachodzą zjawiska zarówno pochłaniania, jak i odbicia. Natężenie wiązki odbitej uzależnione jest od właściwości powierzchni. Jeżeli wiązka pada na powierzchnię nieabsorbującą, wtedy natężenie zależy od kąta padania, współczynnika załamania, długości fali oraz polaryzacji ośrodka. W przypadku ośrodków absorbujących natężenie wiązki odbitej jest osłabione w stosunku do wiązki padającej, gdyż część energii zostaje zaabsorbowana przez ośrodek. Stosunek natężenia wiązki odbitej do natężenia wiązki padającej nazywamy współczynnikiem odbicia $R(\nu, \Theta)$:

$$R(\nu, \Theta) = \frac{I(\nu, \Theta)}{I_0} \quad (4)$$

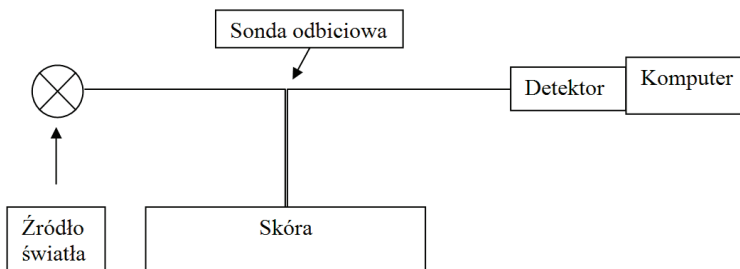
Absorbancja obliczana jest na podstawie poniższej zależności:

$$A_\lambda = -\log_{10} \left(\frac{S_\lambda - D_\lambda}{R_\lambda - D_\lambda} \right) \quad (5)$$

gdzie: A_λ – absorbancja, S_λ – natężenie światła odbitego od próbki, D_λ – natężenie przy szczelinie zamkniętej, R_λ – natężenie światła od powierzchni referencyjnej, λ – długość fali.

19.6.4. Przebieg ćwiczenia

W ćwiczeniu wykorzystywana będzie sonda odbiciowa (patrz rys. 19.19). Źródłem światła w układzie jest lampa halogenowa produkcji firmy *Top Sensors* z wbudowanym sprzężaczem światłowodowym. Tego typu sonda posiada 3 końcówki. Jedna z końcówek zawiera sprzężone ze sobą dwa światłowody, dzięki czemu możliwe jest jednoczesne oświetlenie próbki i rejestracja widma odbiciowego. Pozostałe końcówki służą do prowadzenia światła ze źródła do próbki oraz do rejestracji widma przez detektor. Do rejestracji wyników pomiarów wykorzystuje się oprogramowanie *OOIBase*.



Rys. 19.19. Schemat układu do pomiarów spektroskopowych wykorzystujących sondę odbiciową

Korzystając z programu *OOIBase* i spektrofotometru *PC1000 (Ocean Optics)*, należy przeprowadzić pomiary spektroskopowe skóry, zbliżając sondę prostopadle i możliwie najbliżej powierzchni skóry (ok. 1 mm). Należy wykonać pomiary absorpcji:

- skóry dłoni na powierzchni dłoniowej oraz powierzchni grzbietowej,
- skóry przedramienia w miejscu, gdzie widoczne są naczynia krwionośne,
- widocznych znamion (pieprzyki, naczyniaki),
- wypreparowanych tkanek skóry świni,
- zbadać różnice widm spektroskopowych skóry po nałożeniu kremu z filtrem UV,
- zbadać wpływ zmiany odległości sondy od powierzchni tkanki na rejestrowane widma spektroskopowe,

Korzystając z programu kalkulacyjnego typu *Excel* należy przedstawić wyniki pomiarowe w formie wykresu. Na podstawie spektrum wskazać pasmo absorpcji/transmisji i omówić wyniki.

Literatura

- [1] <http://www.microscopy.fsu.edu/primer/anatomy/nikone200cutaway.html>
- [2] <http://rsbweb.nih.gov/ij/download.html>
- [3] <http://www.stolaf.edu/people/giannini/cell/nuc.htm>
- [4] <http://www.nanogallery.info/news/?id=8670&slid=news&type=anews>
- [5] <http://scienceworld.wolfram.com/biography/Wood.html>
- [6] http://msp.rmit.edu.au/Article_04/06.html
- [7] <http://www.musicpro.kqs.pl/index.php?p398,lampa-wooda-fan-analizator-tester-skory>
- [8] <http://www.musicpro.kqs.pl/index.php?p398,lampa-wooda-fan-analizator-tester-skory>
- [9] <http://www.wykop.pl/ramka/261572/zabezpieczenia-rzeczy-codziennych-widziane-w-uv/>
- [10] <http://omlc.ogi.edu/>
- [11] <http://www.cubs.buffalo.edu/>
- [12] SOLOMON, VILLEE, *Biologia. Wykłady z Anatomii*, Wydawnictwo Multico, 2003.