МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ імені І. І. МЕЧНИКОВА
ФАКУЛЬТЕТ МАТЕМАТИКИ, ФІЗИКИ ТА ІНФОРМАЦІЙНИХ ЕХНОЛОГІЙ

Ю. Ф. Ваксман

ОПТИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ В БІОМЕДИЧНІЙ І ФАРМАЦЕВТИЧНІЙ ПРАКТИЦІ

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК

ОДЕСА
ОНУ
2022

УДК 53.082.5:615.073(075.8)
В147

Рекомендовано вченою радою
ОНУ імені І. І. Мечникова.
Протокол № 5 від 21.12.2022 р.

Рецензенти:
В. В. Кідалов, заслужений діяч науки і техніки України, доктор фізико-математичних наук, професор, професор кафедри «Вища математика і фізика» Таврійського державного агротехнічного університету імені Дмитра Моторного;

О. Р. Гохман, доктор фізико-математичних наук, професор, завідувач кафедри фізики ПНПУ імені К. Д. Ушинського.

Ваксман Ю. Ф.

В147 Оптичні методи дослідження в біомедичній і фармацевтичній практиці: навч. посіб. / Ю. Ф. Ваксман. – Одеса : Одес. нац. ун-т ім. І. І. Мечникова, 2022. – 139 с.; іл., табл.
ISBN 987-617-689-519-0

У навчальному посібнику викладено оптичні методи дослідження, що мають практичне застосування в біології, медицині і фармації. Розглядаються оптичні методи, прилади і системи діагностики зору, а також засоби корекції зору. Представлені сучасні методи лазерної діагностики, лазери і лазерні системи. Розглянуто механізми взаємодії когерентного випромінювання на різних рівнях збудження живих тканин та фактори, що визначають дозоване використання оптичного випромінювання.

Навчальний посібник призначений для студентів університету, що навчаються за спеціальностями 105 Прикладна фізика та наноматеріали і 226 Фармація. Промислова фармація.

УДК 53.082.5:615.073(075.8)

ISBN 987-617-689-519-0
© Ваксман Ю. Ф., 2022
© Одеський національний університет імені І. І. Мечникова, 2022

ЗМІСТ

Передмова 6
ЧАСТИНА І. ОПТИЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ЗОРУ 9
1. Оптичні основи офтальмології 9
1.1. Оптична система ока людини 9
1.1.1.Будова ока людини 9
1.1.2. Основні елементи оптичної системи ока 10
1.2. Застосування законів геометричної оптики в офтальмології 12
1.3.Функції зору 20
1.4. Аберації оптичної системи ока 24
1.5. Клінічна рефракція ока 29
Контрольні питання та завдання 31
2.Офтальмоскопічна техніка 33
2.1. Структурні елементи офтальмоскопічних систем 33
2.2. Методи усунення світлових рефлексів 36
2.3. Методи вимірювань на очному дні 40
2.4. Поляризаційні офтальмоскопічні прилади 42
2.5. Прилади для флуоресцентної ангіографії 45
2.6. Прилади для біомікроскопії ока 46
Контрольні питання та завдання 49
3. Прилади підбору і контролю засобів корекції зору 51
3.1. Офтальмометри 51
3.2. Рефрактометри 55
3.3. Діоптриметри 57
Контрольні питання та завдання 59
ЧАСТИНА ІІ. ОПТИЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ І АНАЛІЗУ 60
4. Оптична мікроскопія 60
4.1.Оптична схема, збільшення і роздільна здатність оптичного мікроскопу 60
4.2. Спеціальні прийоми оптичної мікроскопії 65
Контрольні питання та завдання 71

5. Спектральний аналіз в біомедичних дослідженнях 73
5.1. Абсорбційна спектроскопія 73
5.2. Люмінесцентна спектроскопія 81
5.3. Спектрометрія хімічних елементів 87
Контрольні питання та завдання 90
6. Поляриметричний аналіз оптично активних речовин 91
6.1. Фізичні основи поляриметрії 91
6.2. Методика визначення кута обертання площини поляризації 92
Контрольні питання та завдання 94
7. Рефрактометричний аналіз розчинів 95
7.1. Фізичні основи рефрактометрії 95
7.2.Методика рефрактометрії 97
Контрольні питання та завдання 101
ІІІ. ЛАЗЕРИ В БІОЛОГІЇ І МЕДИЦИНІ 103
8. Особливості практичного застосування лазерного випромінювання 103
8. 1. Властивості лазерного випромінювання 103
8.2.Особливості взаємодії оптичного випромінювання з біологічними об’єктами 105
8.3. Біофізичний механізм дії лазерного випромінювання на біологічні тканини 110
8.4.Лазери і лазерні системи для діагностики біологічних об’єктів 112
8.4.1. Газові лазери 113
8.4.2. Рідинні лазери на барвниках 116
8.4.3. Твердотільні лазери 117
Контрольні питання та завдання 120
9. Лазерні методи діагностики 122
9.1. Лазерна нефелометрія 122
9.2. Лазерна спектроскопія квазіпружного розсіяння світла 124
9.2.1. Вимірювання швидкостей потоків рідин і газів за допомогою лазерних

допплерівських анемометрів 124
9.2.2. Діагностика біологічних об’єктів на основі реєстрації швидкостей направленого руху 126
9.2.3. Лазерна допплерівська спектроскопія живих клітин і діагностика внутрішньоклітинної рухомості 128
9.3 Абсорбційні методи діагностики 130
9.3.1. Класифікація абсорбційних методів діагностики 130
9.3.2. Абсорбційно - трансмісійний аналіз з використанням лазерів з перебудовою частоти 131
9.3.3. Абсорбційна спектроскопія ультрашвидких процесів 134
9.3.4. Класифікація калориметричних методів діагностики 136
Контрольні питання та завдання 137
Література 138

Передмова

Оптичні методи дослідження в біомедичній і фармацевтичній практиці займають чільне місце серед сучасних засобів діагностики і аналізу. Широкий загал людей пов'язують термін «оптика» з засобами корекції зору. Проблематиці методів діагностики і корекції зору присвячена перша частина навчального посібника. Поряд з традиційними методами оптичної діагностики розглянуто удосконалені системи, що включають застосування новітніх світлодіодних, лазерних джерел світла інфрачервоного діапазону випромінювання, та способи автоматичної реєстрації сигналів, що виключають суб'єктивні фактори.

В навчальному посібнику розглянуті оптичні методи діагностики і аналізу, що знаходять своє застосування в біології, медицині і фармації: абсорбційна і рефракційна мікроскопія, спектрофотометричний і флуоресцентний спектральний аналіз, спектрометрія хімічних елементів, методи поляриметрії і рефрактометрії.

Сучасні прилади і системи діагностики і аналізу включають лазерні джерела оптичного випромінювання. В навчальному посібнику наведено характеристики когерентного випромінювання, що стали основою для його застосування в сучасних методах і системах діагностики. Обговорюються особливості взаємодії лазерного випромінювання з живими тканинами та механізми його дії на різних рівнях інтенсивності світлового потоку.

Представлено короткий огляд сучасних лазерів, що знаходять своє застосування в біомедичній та фармакологічній практиці. Автор не претендує на огляд всього спектру лазерних методів дослідження, проте в навчальному посібнику обговорюються найбільш поширені методики з застосуванням когерентних джерел випромінювання.

Кожний розділ закінчується контрольними питаннями та завданнями, що дозволяє студентам звернути увагу на основні аспекти розглянутого та закріпити здобуті знання.

Запропонований автором навчальний посібник орієнтований на

студентів, що вивчають дисципліни «Медична оптика» та «Фармація з фізичними методами аналізу».

Дисципліна «Медична оптика» є вибірковою в Освітньо-професійній програмі підготовки бакалаврів спеціальності 105 «Прикладна фізика та наноматеріали» (галузь знань 10 «Природничі науки», освітньо-професійна програма «Прикладна фізика та наноматеріали»).

Основними завданнями вивчення дисципліни є: засвоєння студентами принципів функціонування оптичних приладів і систем, робота яких основується на фізичних законах і явищах; ознайомлення з оптичними методами діагностики і лікування; вивчення можливостей використання сучасних приладів і систем, включно лазерних технологій, в медичних і біологічних дослідженнях. Навчальний посібник повною мірою відповідає робочій програмі і завданням, що стоять перед студентами, які вивчають дану дисципліну.

Дисципліна «Біологічна фізика з фізичними методами аналізу» є дисципліною загальної підготовки магістрів фармації за спеціальністю 226 «Фармація. Промислова фармація». Галузь знань 22 «Охорона здоров'я», освітньо-професійна програма «Фармація».

Серед основних завдань вивчення дисципліни є такі: вибирати відповідні фізичні методи дослідження для вирішення конкретних задач фармацевтичного аналізу; користуватися апаратурою для проведення фізичних досліджень лікарських засобів; аналізувати фізичні процеси в організмі, використовуючи фізичні закони і явища. Розділ «Оптичні методи діагностики і аналізу» навчального посібника відповідає робочій програмі і завданням, що стоять перед вивченням дисципліни в частині «…фізичні методи аналізу», що складає приблизно 40 % часу, що виділяється для вивчення курсу.

Навчальний посібник написано на основі курсів «Медична оптика», «Фармація з фізичними методами аналізу», що продовж ряду років читає автор в Одеському національному університеті імені І. І. Мечникова.

Автор щиро вдячний доктору фізико-математичних наук професору О. Р. Гохману і доктору фізико-математичних наук професору В. В. Кідалову за уважне рецензування рукопису та корисні зауваження.

ЧАСТИНА І. ОПТИЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ ЗОРУ

1. Оптичні основи офтальмології

1.1. Оптична система ока людини

Око людини є своєрідним оптичним приладом, що займає в фізичній оптиці і техніці значне місце. По-перше, чимало оптичних приладів (мікроскоп, зорові труби, оптичні телескопи та ін.) розраховані саме на зорове сприйняття. По-друге, око людини є налаштованою в процесі еволюції біологічною системою, що неодноразово приводило до новітніх ідей конструкторів оптичних систем.

1.1.1. Будова ока людини

Власне оком (рис. 1.1) є очне яблуко, що має не зовсім правильну сферичну форму: переднє-задній (сагітальний) розмір дорослої людини в середньому 24,3 мм, вертикальний – 23,4 мм і горизонтальний – 23,6 мм.

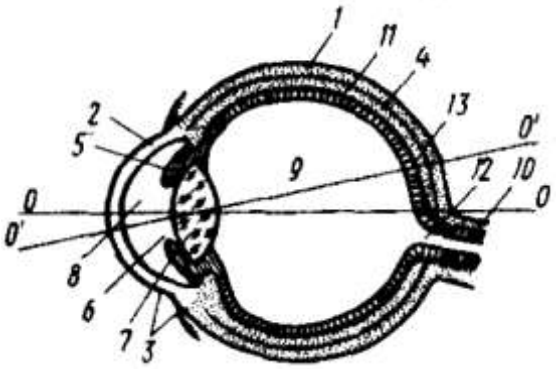


Рис.1.1. Будова ока людини

Стінки ока складаються з трьох концентричних оболонок: зовнішньої (склери), середньої (судинної) і внутрішньої (сітківки). Зовнішня білкова оболонка – ***склера*** (1) в передній частині ока перетворюється в прозору опуклу оболонку – ***рогівку*** (2). Показник заломлення рогівки $n_{\text{рог.}} = 1{,}38$. Ззовні рогівка переходить в *кон'юнктиву* (3), прикріплену до повік. До склери прилягає *судинна оболонка – хоріоїдея* (4), внутрішня поверхня якої встелена шаром темних пігментних клітин, що створюють перепону внутрішньому дифузному розсіюванню світла в оці. В передній частині ока судинна оболонка переходить в *райдужну оболонку* (5), в якій є круглий отвір

– *зіниця* (6). Безпосередньо до зіниці з внутрішньої сторони ока прилягає *кришталик* (7) – прозоре і пружне тіло, подібне двоякоопуклій лінзі. Показник заломлення кришталика $n_{хр.}$= 1,45.

Між рогівкою і кришталиком розташована *передня камера* ока (8), вона заповнена *водянистою вологою* – рідиною, близькою за оптичними властивостями до води. Вся внутрішня частина ока від кришталика до задньої стінки зайнята прозорою студенистою масою, що називають *склистим тілом* (9). Показник заломлення склистого тіла такий же, як і водянистої вологи: $n_{ск.т.}$= $n_{вод.вол.}$= 1.336.

Зоровий нерв (10) входить в очне яблуко через задню стінку. Розгалужуючись він переходить в самий внутрішній шар ока – *сітківку – ретину* (11), що являє собою світлочутливий (рецепторний) апарат ока. Сітківка складається з декількох шарів і неоднакова за своєю товщиною і чутливістю до світла. В ній знаходяться світлочутливі зорові клітини – палички і колбочки. Довжини паличок 60-80 мкм, діаметр біля 1,8 мкм, а колбочок відповідно 35 і 5-6 мкм. На сітківці ока людини розташовано біля 130 млн. паличок і 7 млн. колбочок.

В місті входження зорового нерву знаходиться не чутлива до світла *сліпа пляма* (12). В середині сітківки, трохи ближче до області виска, лежить сама чутлива до світла *жовта пляма* (13), центральна частина якої має діаметр біля 0,4 мм (це так звана *область макули*).

Колбочки і палички розподілені на сітчатці нерівномірно. Колбочки розташовані, головним чином, в центральній частині сітківки – в жовтій плямі. В центрі жовтої плями знаходяться виключно колбочки, на краях сітківки – тільки палички.

1.1.2. Основні елементи оптичної системи ока

Рогівка. Діаметр рогівки дорослої людини складає 10-12 мм. Рогівка більш опукла ніж в цілому поверхня очного яблука. Радіус кривизни передньої поверхні рогівки в середньому рівний 7,7 мм, задньої поверхні – біля 6,8 мм. Товщина рогівки в центрі біля 0,6 мм**,** на периферії – до 1 мм. Форма передньої поверхні рогівки не є

сферичною, а скоріше наближається по поверхні еліпсоїду або іншої кривої другого порядку. Проте, центральна частина рогівки діаметром біля 4 мм практично є сферичною. Важливо, що форма передньої поверхні рогівки, що межує з повітряним середовищем, суттєво впливає на сферичну аберацію ока.

Ізольована рогівка, оточена з усіх сторін повітрям, діє як розсіювальна лінза. В живому оці з повітрям межує тільки передня поверхня рогівки, а задня – контактує з водянистою вологою, показник заломлення якої близький до відповідної величини для рогівки В таких умовах рогівка працює як збирна лінза. При цьому передня і задня фокусні відстані різняться і складають f= -17,1 мм, а f' = 22,8 мм. Заломлююча сила рогівки, як окремої складової оптичної системи ока, дорівнює приблизно 40 дп.

Кришталик. Кришталик має форму двоопуклої лінзи з закругленими краями. Кришталик складається з прозорих волокон епітелію, розташованих в напрямках від центру до периферії, а тому густина кришталику в центрі більша ніж на периферії. З цієї причини, *в ядрі кришталика показник заломлення на 1,5 % більший, ніж на периферії.* Діаметр кристалика 8-10 мм, радіус кривизни передньої поверхні в середньому 10 мм, задньої – 6 мм, а товщина в центральній частині біля 6 мм. Обидві поверхні кришталика в його центральній частині є сферичними, проте, в периферичній області вони являють собою поверхні другого порядку, тобто стають більш плоскими.

Оптична сила ізольованого кришталика складає 102 дп. В природних умовах кришталик, оточений водянистою вологою і склистим тілом, має фокусну відстань 70 мм і оптичну силу 20 дп.

Таким чином, в оптичній системі ока людини *найбільшу оптичну силу має рогівка, а не кришталик.*

Спектр пропускання оптичної системи ока людини помітно змінюється з віком. На старості, коли кришталик жовтіє, а значить пропускає менше голубого і зеленого світла, оточуючий світ уявляється в більш теплих кольорах.

Оболонки ока. На відміну від фотокамери, стінки якої мають бути абсолютно світлонепроникними, а світло попадає тільки через об'єктив, оболонки очного яблука пропускають на сітчатку деяку частину світла через склеру – тверду оболонку товщиною 0,5-1 мм. При освітленні склери дуже яскравим світлом (відповідний метод дослідження називають *діафаноскопією*) добре видно як світиться внутрішня область очного яблука. Цього світла достатньо для виявлення пухлин і інших змін густини, товщини і пігментації оболонок ока.

Важливо зауважити, що невелика прозорість очного яблука обумовлена як поглинанням світла в склері, так і в судинній оболонці. Хоріоїдея – це м'яка судинна оболонка, що містить мережу кровоносних судин, що живлять око. З боку сітківки, вона покрита шаром *пігментного епітелію*, що слугує головним захистом (своєрідним фільтром) від стороннього світла. Таким чином, *одною з суттєвих відмінностей оптичної системи ока від фотокамери є часткова проникність оболонок ока для світла.* В результаті цього, за умов надто яскравого освітлення, виникають перешкоди у вигляді вуалі, що знижує контрастність зображення на сітківці.

1.2. Застосування законів геометричної оптики в офтальмології

За умов, коли діаметр зіниці перевищує 2мм, дифракційні явища відсутні і процес поширення світла в оптичній системі ока можна описувати, основуючись на законах геометричної оптики. Розглянемо найбільш характерні приклади застосування законів заломлення і відбивання світла в офтальмології.

Рефракція (заломлення) світла. Розглянемо рефракцію світла в рівнобедреній призмі з малим кутом при вершині (рис. 1.2).

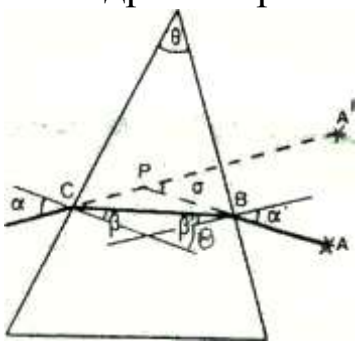


Рис. 1.2. **Хід променів у призмі**

Призма виготовлена зі скла з показником заломлення n і знаходиться на повітрі. Кут θ при вершині призми менший 6^0, що дозволяє замінити значення тригонометричних функцій на значення відповідних кутів в радіанах.

Для розрахунку кута відхилення **σ** променя при його проходженні через призму запишемо рівняння, що описують закони заломлення світла у точках входу (С) і виходу (В) променя з призми:

$$\alpha/\beta = n, \quad (1.1)$$

$$\beta'/\alpha' = 1/n, \quad (1.2)$$

та два рівняння, основаних на геометричних міркуваннях:

$$\theta = \beta + \beta', \quad (1.3)$$

$$\sigma = \alpha - \beta + \alpha' - \beta'. \quad (1.4)$$

Розв'язок цих рівнянь дозволяє отримати формулу для розрахунку кута відхилення променя світла призмою з малим кутом при вершині

$$\sigma = (n-1)\theta. \quad (1.5)$$

Як видно з (1.5), відхиляюча дія даної призми визначається тільки кутом при її вершині θ та не залежить від кута падіння світлового променя. Формула (1.5) зберігає свою силу при куті θ, що не перевищує 6^0.

В офтальмології заломлююча сила таких призм вимірюється в *призмових діоптріях***.** Призма, що має оптичну силу в 1 призмову діоптрію (1 $дп_{\Delta}$), відхиляє промінь світла на $L = 1$ см на відстані 100 см від призми. Призма в 2 і 3 $дп_{\Delta}$ відхиляє промінь на 2 і 3 см на такій же відстані. Таким чином, кутове відхилення променя складає $\mathrm{tg}\sigma = L/100$.

Призми з малим кутом при вершині (призмові окуляри) використовують для корекції зору у випадку, якщо зображення об'єкту, що створене оком, зміщено поза область найкращого зору (поза область макули).

Рефлекси очного дна. При освітлені очного яблука в його об'ємі виникають дзеркальні і дифузні рефлекси. При дзеркальному відбиванні виконуються закони відбивання світла. При дифузному відбиванні кожна точка поверхні, що відбиває світло, є окремим джерелом вторинних хвиль, що поширюються у всіх напрямах. При цьому значна частина світлової енергії поглинається поверхнею.

Рефлекси очного дна спостерігають за допомогою офтальмоскопу. Задній полюс ока захищений трьома оболонками (рис. 1.3, а): сітківкою (1), судинною оболонкою (2) і склерою (3). На межі між скловидним тілом і сітківкою розташована внутрішня мембрана − прозора плівка, що тісно прилягає до сітківки і має більший показник заломлення порівняно зі скловидним тілом.

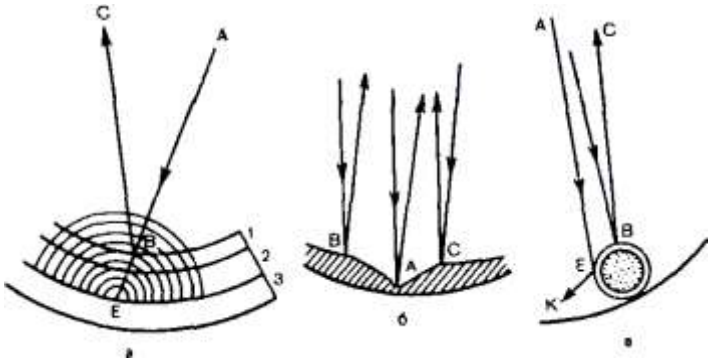


Рис. 1.3. Дифузне відбивання на очному дні (а); дзеркальне відбивання на макулярній області (б); дзеркальне відбивання на судині (в) [10]

Тому на межі між скловидним тілом і внутрішньою мембраною створюються умови для дзеркального відбивання світла. Промінь АВ (рис. 1.3, а), що падає на дно ока, частково відбивається в напряму ВС. Основна частина світлової енергії поширюється вглиб, проходить через сітківку, судинну оболонку та досягає поверхні склери. Кожну точку склери, наприклад Е, можна розглядати як точкове джерело дифузного відбивання світла, що поширюється у зворотному напряму і проходить через кров судинної оболонки як через червоний фільтр. Таким чином, *при офтальмоскопії білим світлом дифузно відбите світло має червоний колір, а світло, відбите від дзеркальної поверхні внутрішньої мембрани, залишається білим.* При офтальмоскопії більше уваги надають *рефлексам* очного дна, що створюються дзеркально відбитим світлом, оскільки саме вони несуть інформацію

про природу явищ в сітківці і судинній оболонці.

Розглянемо деякі рефлекси очного дна. Центральний відділ очного дна має складний рельєф, схематично позначений на рис. 1.3, б. Область макули (область жовтої плями) представлена воронкоподібним заглибленням ВАС, в центрі якого розташована центральна ямка жовтої плями А з дуже малим радіусом кривизни. Світло від офтальмоскопу, що попадає на середину центральної ямки, відбивається у зворотному напрямку в сторону зіниці, тому офтальмолог помічає в середині центральної ямки світлу пляму – *фовеолярний рефлекс*. На краях макулярної області підвищення сітківки вирівнюється в плато і утворює вал еліптичної форми. Відбиті від цього валу промені утворюють офтальмологічну картину *макулярного рефлексу*. При цьому можна спостерігати зовнішній макулярний рефлекс – більш широке кільце відблисків.

Патологічні рефлекси є наслідком зміни дна рельєфу. *Точкові рефлекси*, поодиноку або групові, вказують на підвищення сітківки, наприклад, на наявність вогнища дифузного запалення, а кожний рефлекс відповідає вершині цього підвищення. *Кругові і півкругові рефлекси* утворюються на межі піднесення і западання рівня сітківки.

Дзеркальне відбивання створює рефлекси не тільки на сітківці, а й на судинах. На середині судин спостерігаються *світлові доріжки*, що утворюються за рахунок того, що відбиті промені тільки в цьому разі спрямовуються у зворотному напрямку в око спостерігачеві (рис. 1.3, в). Бокові промені, що падають на судини, відбиваються в різні сторони і не попадають в око спостерігачеві.

Повне внутрішнє відбивання. В офтальмологічній техніці широко використовуються оптичні системи, що працюють на основі повного внутрішнього відбивання світла. Основою таких систем слугують призми повного відбивання світла та світловоди.

Явище повного відбивання світла має місце і в тканинах ока. В офтальмології відомий феномен *дирекційної чутливості сітківки.* Він полягає в тому, що промені, спрямовані вздовж осі колбочок, викликають значно сильніше сприйняття світла ніж промені, що

йдуть під кутом, більшим 10^0 до осі колбочок. Доказано, що показник заломлення речовини колбочки перевищує показник заломлення оточуючої рідини в 1.022 рази. Таким чином, при малих кутах падіння, має місце повне внутрішнє відбивання світла від бокових поверхонь колбочки. Промені, що падають під значним кутом до осі колбочки, заломлюються в оточуючу рідину і не викликають зорових фотохімічних реакцій.

Повне внутрішнє відбивання є причиною того, що без спеціального оснащення ми не можемо бачити деталі кутів передньої камери ока. Промені, що виходять з кутів передньої камери ока (рис. 1.4, а), досягають передню поверхню рогівки під кутом, що перевищує граничний кут повного внутрішнього відбивання, а тому такі промені не попадають в око спостерігачеві і відбиваються в сторону райдужної оболонки. Кути передньої камери ока можна розглядати за допомогою ***гоніоскопа*** (рис. 1.4, б), що контактує з поверхнею рогівки і цим самим нівелює різницю показників заломлення між рогівкою і повітрям.

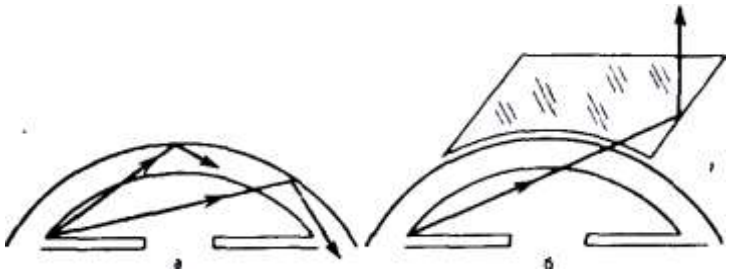


Рис. 1.4. **Повне внутрішнє відбивання променя, що надходить від кута передньої камери ока (а); хід променя при гоніоскопії (б) [10]**

Промінь від кута передньої камери ока, не зазнавши повного відбивання, проходить в корпус гоніоскопа і, відбившись на його грані, спрямовується в око спостерігачеві.

Око як центрована оптична система. Оптична система ока може бути представлена як центрована оптична система, утворена рогівкою, рідиною передньої камери і кришталиком (чотири заломлюючі поверхні) і обмежена спереду повітряним середовищем, а ззаду – скловидним тілом.

Головна оптична вісь 00 (рис. 1.5) проходить через геометричні центри рогівки, зіницю і кришталик. Крім того, важливе значення має

так звана *зорова вісь O'O'* ока (рис. 1.1), яка визначає напрям найбільшої світлочутливості ока і проходить через центри кришталика і жовтої плями. Кут між головною оптичною і зоровою осями складає 5°.

На рис.1.5 позначені фокуси, головні точки і площини, вузлові точки і площини для деякого усередненого нормального ока (відстані подано в мм).

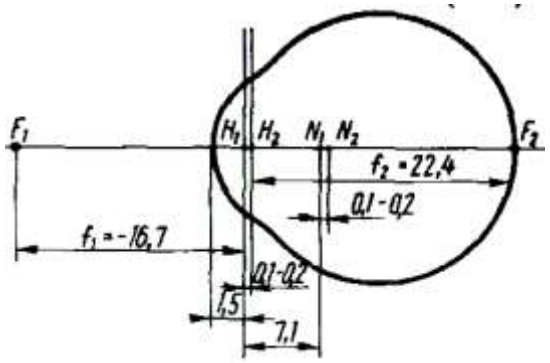


Рис. 1.5. Схематичне око як центрована оптична система [7]

Оптична сила такої системи розраховується за формулою складної центрованої системи:

$$D = D_{\text{рог.}} + D_{\text{кр.}} - \frac{d}{n} D_{\text{рог.}} D_{\text{кр.}}, \qquad (1.6)$$

де: d – оптичний інтервал (відстань від задньої головної площини рогівки до передньої головної площини кришталика); n – показник заломлення скловидного тіла; $D_{\text{рог}}$, $D_{\text{кр}}$ – оптична сила рогівки і кришталика.

На практиці точний розрахунок центрованої оптичної системи ока часто заміняють спрощеними моделями «схематичного ока».

«Схематичне око» по Гульстранду. Гульстранд ще в 1909 р. запропонував модель ока – «схематичне око». Ця модель дозволяє одержати орієнтовні дані про положення і величину зображення на сітківці ока, що функціонує автономно або разом з оптичними приладами. В моделі застосовані усереднені значення основних параметрів ока: показників заломлення прозорих середовищ, їх товщини (відстані від вершини рогівки), радіусів кривизни поверхонь. Для більшого спрощення розрахунку Гульстранд обчислив для «усередненого» ока положення головних і вузлових точок, передні і задні фокусні відстані, заломлюючу силу рогівки,

кришталика і в цілому системи ока. Оскільки для ока простір предметів (повітря) і простір зображення (середовища ока) заповнені речовинами з різними показниками заломлення, то головні і вузлові точки і площини не співпадають одна з одною, а передні і задні фокусні відстані різняться між собою. Вузлові точки неакомодованого ока лежать на відстані 7 і 7,7 мм від вершини рогівки, а головні точки – на відстані 1,35 и 1,65 мм від цієї вершини, що досить близько до відповідних значень на рис. 1.5.

Редуковане око. Найбільш спрощеною моделлю є так зване редуковане (спрощене) око, в якому дві головні точки замінені одною. В такій моделі вся оптична система ока зображується еквівалентною схемою, що має лише одну заломлюючу поверхню, яка розділяє два середовища – повітря і скловидне тіло. В редукованому оці по Вербицькому радіус кривизни рогівки $r = 6{,}8$ мм, показник заломлення $n = 1.4$, а довжина ока – 23.4 мм. Проте, ці величини обрані не достатньо точно. Як «схематичне» око Гульстранду, так і «редуковане» око не враховують аберацій живого ока. Усереднені аберації реального ока добре відтворюються моделлю в тому випадку, коли передня поверхня рогівки прийнята поверхнею параболоїда обертання.

Найбільше заломлення світла в оптичній системі ока виникає на зовнішній поверхні рогівки. В цілому оптична сила рогівки розраховується за формулою товстої лінзи

$$D_{рог} = D_п + D_з - \frac{d}{n_р} D_п D_з, \quad (1.7)$$

де: $D_п$, $D_з$ – оптичні сили передньої і задньої поверхні рогівки, $n_р$ – показник заломлення рогівки, d – середня товщина рогівки, а величини оптичних сил поверхонь рогівки розраховуються за формулами

$$D_п = \frac{n_р - 1}{r_п}; \quad D_з = \frac{n_{в.в.} - n_р}{r_з}. \quad (1.8)$$

де $r_п$, $r_з$ – радіуси передньої і задньої поверхонь рогівки,

$n_{в.в}$ – показник заломлення водянистої вологи передньої камери ока.

Розрахована за формулами (1.8) і (1.7), з урахуванням усереднених значень параметрів ока, оптична сила рогівки складає приблизно 40 дп.

Оптична сила кришталика розраховується за формулою товстої лінзи:

$$D_{кр} = D_п + D_з - \frac{d}{n_{кр}} D_п D_з . \quad (1.9)$$

де: $D_п$, $D_з$ – оптичні сили передньої і задньої поверхні кришталика, $n_{кр}$ – показник заломлення кришталика, d – товщина кришталика в центральній частині, а величини оптичних сил поверхонь кришталика розраховуються за формулами

$$D_п = \frac{n_{кр} - n_{в.в.}}{r_п}; \quad D_з = \frac{n_{в.в.} - n_{кр}}{r_з}, \quad (1.10)$$

де $r_п$, $r_з$ – радіуси передньої і задньої поверхонь кришталика,
$n_{в.в} = n_{ск.т.}$ – показники заломлення водянистої вологи і склистого тіла.

Використовуючи усереднені значення параметрів ока за формулами (1.10) і (1.9), можна розрахувати оптичну силу кришталика – приблизно рівну 20 дп.

В цілому розрахунок за формулою (1.6) дає значення оптичної сили нормального ока приблизно 60 дп.

Передня і задня фокусні відстані ока розраховуються з співвідношень

$$f_п = 1/D; \qquad f_з = n_{\text{ск.т.}}/D. \qquad (1.11)$$

Різновіддалені предмети (на відстані від ока a_1) повинні давати на сітківці однаково різкі зображення, тобто оптична система ока має забезпечувати його акомодацію. Для центрованих оптичних систем

$$f_п / a_1 + f_з / a_2 = 1 \qquad (1.12)$$

З (1.12) видно, що акомодація ока може забезпечуватись або зміною відстані a_2 між головною площиною і сітківкою, як це забезпечується у фотоапаратах, або міняючи кривизну кришталика, а значить, змінюючи фокусні відстані $f_п$ і $f_з$. Оскільки відстань від предмета до ока значно перевищує передній фокус ока ($a_1 >> f_п$), то $a_2 \cong f_з$. Таким чином, різке зображення в площині сітківки забезпечується шляхом зміни фокусної відстані $f_з$ за рахунок зміни

радіусу кривизни кришталика, що знаходиться в тісній м'язовій обоймі.

1.3. Функції зору

Основними функціями зору є акомодація, адаптація (світлова чутливість), світло- і кольоровідчуття, гострота зору, поле зору, бінокулярний стереоскопічний зір.

Акомодація – з*датність ока давати на сітківці різке зображення предметів, що знаходяться на різних відстанях від нього.* Кривизна заломлюючих поверхонь кришталика змінюється в процесі акомодації під дією акомодаційних м'язів. Межі акомодації ока, що забезпечують можливість ясного бачення різновіддалених об'єктів, позначаються найближчою і подальшою точками ясного бачення. Положення *найближчої точки ясного бачення* характеризується найменшою відстанню a_1, ближче якої око вже не може чітко сприймати об'єкт при найбільшій напруженості акомодаційного м'язу. Положення *подальшої точки ясного бачення* характеризується найбільшою відстанню a_2, з якої при наближенні око здатне чітко сприймати об'єкт при повному спокою акомодаційного м'язу. Відстань між найближчою і подальшою точками ясного бачення, що визначає межу акомодації, виражену в діоптріях, називають *об'ємом акомодації*:

$$A = 1/a_1 - 1/a_2 = A_1 - A_2 . \quad (1.13)$$

Коли предмет розташований в нескінченності, то його зображення в нормальному оці знаходиться на сітківці. Кришталик при цьому акомодується на нескінченність і його оптична сила мінімальна. Якщо ж предмет наближається до ока, то у кришталика збільшується кривизна, а значить збільшується оптична сила. Зміна оптичної сили кришталика здійснюється в межах 60-70 дп.

У дорослої людини при приближенні предмета до 25 см акомодація ока забезпечується без помітного напруження акомодаційних м'язів. Тому відстань в 25 см називають *відстанню найкращого зору*.

Розгляд ще більш близьких предметів викликає значне

напруження акомодаційних м’язів. Відстань до ближньої точки ясного бачення з віком людини збільшується, а значить глибина акомодації, згідно з (1.13), зменшується.

Адаптація – *здатність ока пристосовувати сприйняття світлового потоку при різних рівнях освітленості.* Світлова чутливість визначається світловими рецепторами – паличками і колбочками. Палички при сутінковому освітленні утворюють особливу речовину – зоровий пурпур, який розкладається під дією сильного світла. Палички не сприймають відмінностей кольорів. Колбочки менш чутливі до світла і пристосовані до денного бачення, коли палички не функціонують. Колбочки сприймають різні кольори. При сильному освітлені в одному з шарів сітківки – пігментному починають переміщуватись пігментні зерна, які поглинають світло і тим самим, подібно світлофільтру зі змінним показником поглинання, оберігають очі від засліплення. Час світлової адаптації складає біля 5 хв, а темнової – від 30 до 60 хв.

Світло- і кольоровідчуття. Під *світловідчуттям* розуміють здатність ока сприймати інтегрально світлове випромінювання незалежно від довжини хвилі, а під ***відчуттям кольору*** – здатність ока диференціально реагувати на дію на сітківку світлових хвиль різної довжини. Спектральна чутливість ока людини при денному освітленні (рис. 1.6) обмежена інтервалом довжин хвиль від 400 до 760 нм і має максимум на довжині хвилі 555 нм.

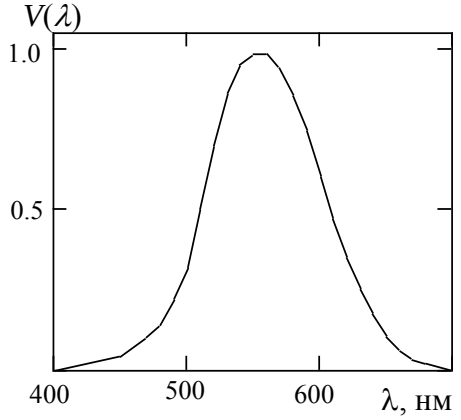


Рис. 1.6. Відносна спектральна чутливість ока людини при денному освітленні [2]

При слабкому освітленні (в сутінках) максимум спектральної чутливості ока зміщується в синю область і об’єкт сприймається в

синьо-сірому відтінку.

Гострота зору. Розмір зображення на сітківці залежить як від розміру предмету, так і від його відстані до ока, що визначає кут під яким видно предмет – *кут зору*. Цей кут утворюється між променями, що йдуть від крайніх точок предмету через єдину вузлову точку оптичної системи ока. З рис. 1.7 видно, що один і той же кут зору β может відповідати різним предметам (*KM* і *QP*), і кут зору визначає розмір об'єкту на сітківці:

$$b = l\beta \quad , \qquad (1.14)$$

де l – відстань між єдиною вузловою точкою N і сітківкою ($l \cong 16$мм). Формула (1.14) відповідає наближенню малого кута зору.

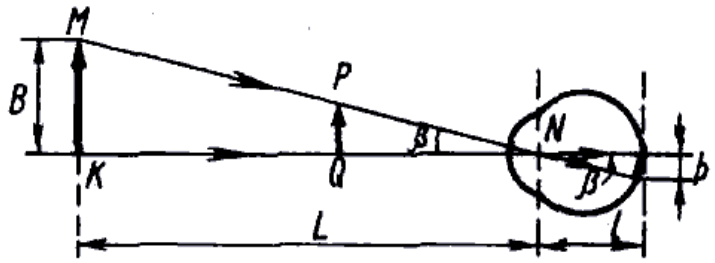


Рис. 1.7. До розгляду кута зору

З рис. 1.7 легко встановити зв'язок між розміром предмету B, відстанню його від ока L (рахуємо що, L значно більша відстані від переднього полюса ока до вузлової точки) і кутом зору β:

$$B = L\beta \ . \qquad (1.15)$$

З урахуванням (1.14) і (1.15), одержимо співвідношення для розрахунку розміру зображення

$$b = lB/L \ . \qquad (1.16)$$

Для характеристики роздільної здатності ока за точку відліку використовують *найменший кут зору* за якого око людини ще розрізняє дві крайні точки предмету. Цей кут приблизно рівний 1', що відповідає відстані B між точками, рівній 70 мкм, за умови, що предмет знаходиться на відстані найкращого зору. В такому разі розмір зображення предмету b на сітківці складає 5 мкм, що відповідає *середній відстані між двома колбочками на сітківці.* Якщо ж зображення двох крайніх точок предмету на сітківці займає лінію, коротшу 5 мкм, то ці точки не розділяються, тобто око їх не

розрізняє.

Слід відмітити, що таке ж значення найменшого кута зору відповідає обмеженню на розміри предмету, яке виключає вплив на формування зображення дифракційних ефектів. Таким чином, *число колбочок, що приходяться на одиницю площі сітківки, відповідає граничним можливостям наближення геометричної оптики.*

В медицині роздільну здатність ока оцінюють поняттям ***гостроти зору.*** За норму гостроти зору приймають одиницю, якщо найменший кут зору рівний 1′. Якщо ж найменший кут зору рівний 4', то гострота зору рівна 1:4=0,25.

В окремих випадках око людини розрізняє і більш мілкі предмети або їх рух, чим ті, що відповідають куту зору 1'. Так, наприклад, зміщення стрілки вимірювального приладу, що рухається по дузі, стає помітним, коли воно досягає 20", а не співпадіння двох тонких ліній (стрілки приладу і її дзеркального зображення) виявляється вже при куті 12" між ними.

З причини нерівномірного розподілу паличок і колбочок по поверхні сітківки гострота зору буде мінятися і різко падати при віддаленні зображення від жовтої плями (макулярної області) до периферії, де вона буде незначною. Роздільна здатність ока залежить також від діаметру зіниці (чим більший діаметр зіниці, тим менша гострота зору), від контрастності предмета і фона, від освітленості об’єкта (оптимальна освітленість 150-300 лк).

Середнє значення гостроти зору, за даними [10] суттєво змінюється з віком людини (таблиця 1).

Таблиця 1

Залежність середньої гостроти зору від віку людини [10]

Вік (роки)	1	2	3	5	10	17	70	80
Гострота зору	0,2	0,35	0,5	0,7	1,0	1,4	0,9	0,35

Поле зору – сукупність точок простору, що сприймаються оком одночасно. Статична межа зору нерухомого ока: 60^0 до верху, 75^0 до низу, 60^0 всередину і 100^0 ззовні. При цьому в полі зору розрізняють

три зони: центральна зона; зона ясного зору і зона периферичного зору. Проте в процесі зору око не залишається нерухомим, а тому частина простору, охвачена центральною зоною зору, значно більша.

Бінокулярний стереоскопічний зір. Поле зору, видиме одночасно двома очима, називають бінокулярним. Величини об'єктів та їх взаємне розташування визначаються одним оком орієнтовно за зміною величини акомодації і яскравості. Сприйняття глибини простору двома очима дає точне представлення про розміри і взаємне розташування об'єктів у просторі.

Чутливість зору при споглядання двома очима дуже велика. Так при величині кутового паралаксу більшій 10″ можна судити про різні відстані між двома точками.

1.4. Аберації оптичної системи ока

Хроматична аберація обумовлена залежністю показника заломлення світлових променів від довжини хвилі (дисперсією). Внаслідок дисперсії на сітківці утворюється не точковий фокус, а так звані круги світлорозсіяння (рис. 1.8). Якщо фокус синіх променів сумістити з площиною сітківки, то зображення точки буде оточено червоним ореолом і навпаки.

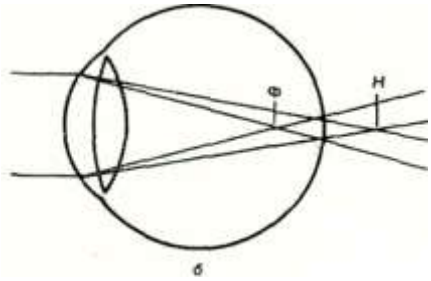


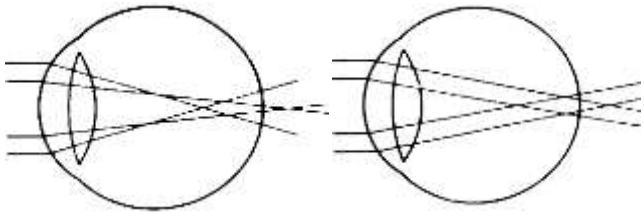
Рис. 1.8. Формування кругів світлорозсіяння (фокусу) на сітківці при хроматичній аберації

Найменші круги світлорозсіяння і найкраща якість зображення реалізуються в тому разі, коли площина зображення розташовується між фокусами червоних і фіолетових променів (рис. 1.8). Прояв хроматичної аберації зростає пропорційно діаметру зіниці і залежить від спектрального складу освітлення, а при природному освітленні – від погоди і часу доби.

Різниця між положенням фокусів Δf для фіолетових і червоних променів за оцінками Юнга становить 1,3 Дптр ($\Delta f \cong 0.4$ мм). Разом з тим, світлорозсіюванню внаслідок хроматичної аберації не надається особливого значення оскільки енергія світлового потоку в кругах світлорозсіяння розподілена вкрай нерівномірно. Розрахунки показують, що при діаметрі зіниці 2 мм біля 70 % світлової енергії концентрується в центрі світлової плями діаметром 5 мкм.

Сферична аберація обумовлена різним заломленням променів, що проходять через центральні і периферичні відділи оптичної системи, або якої-небудь заломлюючої поверхні. Наприклад, промені, що проходять через периферичний відділ двоякоопуклої фізичної лінзи, мають більш коротку фокусну відстань порівняно з центральними променями, що проходять ближче до оптичної осі. (рис. 1.9, а). Прояв сферичної аберації підсилюється при збільшенні діаметру діафрагми (зіниці ока).

Слід відзначити, що фізичне поняття «сферична аберація», що часто використовується в літературі з офтальмології, щодо ока людини потребує суттєвого уточнення. Особливість такої аберації в оптичній системі ока зумовлена тим, що така аберація, по-перше, не є сферичною, оскільки вона виражена в неоднаковій степені в різних меридіанах і навіть в межах одного меридіану в протилежних напрямах від оптичної осі, наприклад, вліво і вправо від неї.



(а (б

Рис. 1.9. Хід променів при сферичній аберації в фізичних лінзах (а) і при «сферичній аберації проти правил» в оптичній системі ока (б)

По-друге, структура кришталика не є однорідною, оскільки його ядро має більший показник заломлення, ніж периферичні зони, а тому периферичні зони мають більш слабку рефракцію, ніж центральні. Таким чином, сферична аберація, притаманна штучним (фізичним) оптичним лінзам, в оці людини представлена у спотвореному вигляді:

вона асиметрична, тобто по суті є *сферичною аберацією проти правил.* Хід променів з урахуванням сферичної аберації проти правил показаний на рис. 1.9, б.

Фізичний астигматизм похилих пучків полягає в тому, що промені одного і того ж пучка, які виходять із одної точки і поширюються в двох взаємно перпендикулярних площинах, після заломлення в лінзі, втрачають свою гомоцентричність, не збираються в точку, а утворюють дві точки сходу.

Уявимо пучок променів, що виходять з точки ***L*** і падають на оптичну систему під кутом до її осі. Розглянемо промен, виділені вузькою хрестоподібною діафрагмою, щілини MM і SS якої спрямовані вздовж меридіональної LMM і сагітальної LSS площин (рис. 1.10).

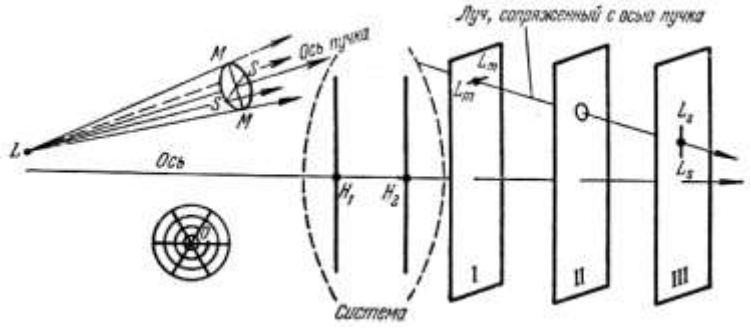


Рис. 1.10. Астигматизм похилих пучків

З такої діафрагми вийде плоска стрічка променів MM і SS, розташованих у відповідних площинах. Оскільки кривизна лінзи за двома взаємно перпендикулярними напрямами різна, ці стрічки заломлюються по-різному. В результаті зображенням точки ***L*** стають дві лінії L_mL_m і L_sL_s на двох взаємно перпендикулярних фокальних площинах I і III. Причому ці дві фокальні площини не співпадають. В площині II, що займає проміжне положення, зображення точки має вигляд еліпса. Отже, у випадку астигматизму похилих пучків зображення точки має вигляд *плями розсіювання*, форма якої залежить від положення екрану спостерігача.

Фізіологічний астигматизм. *Під фізіологічним розуміють такий астигматизм оптичної системи ока, при якому зберігається нормальна гострота зору і не виникають хворобливі явища.* Фізіологічний астигматизм властивий кожному оку і обумовлений

декількома основними факторами: астигматизмом похилих променів, асферичністю і децентруванням заломлюючих поверхонь і неоднорідністю густини оптичних середовищ. Коротко характеризуємо ці фактори.

1. Астигматизм похило падаючих променів зумовлений тим, що в оці людини кут між зоровою і оптичною осями в середньому складає 5°, що спричиняє астигматизм похилих пучків в 0,5 дп. Предмети, що проектуються на периферію сітківки, підлягають значно більшому впливу астигматизму похило падаючих променів.

2. Заломлюючі поверхні рогівки і кришталика не мають правильної сферичної форми. Астигматизм рогівки нормальних очей не перевищує 1 дп, що зумовлено деформацією очного яблука в процесі його нерівномірного росту. Астигматизм рогівки протягом життя зазнає змін. Крім того, форма рогівки може змінюватись під впливом фізіологічних факторів. Наприклад, примруження викликає деформацію рогівки і підсилення заломлення в горизонтальному меридіані інколи до 1–1,5 дп.

Кришталиковий астигматизм знаходиться в межах 0,5–0,6 дп. Встановлено, що астигматизм рогівки певною мірою коригується кришталиковим астигматизмом, котрий, очевидно, має динамічну природу, тобто обумовлений нерівномірним напруженням м’язів вій.

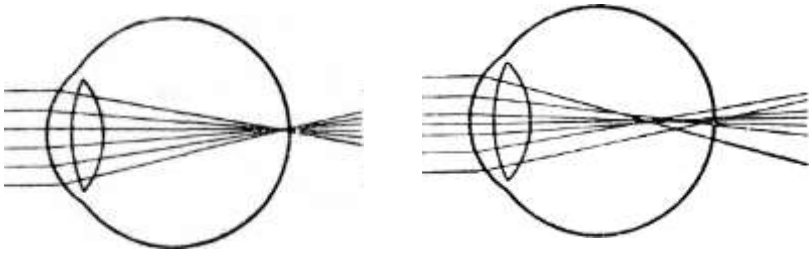
3. Неспівпадіння оптичної і зорової осей стосується орієнтації всієї оптичної системи ока відносно положення центральної ямки. Крім того, заломлюючі поверхні кришталика не центровані відносно положення заломлюючих поверхонь рогівки. В зміщенні кришталика мають значення дві обставини: поворот на 3–5° навколо вертикальної осі і на 0–3° навколо горизонтальної осі. При цьому нерідко оптична вісь кришталика розташована під кутом понад 10° до осі рогівки.

4. Заломлюючі середовища ока є живими тканинами, що не мають ідеальної прозорості і гомогенності. Ця обставина сприяє погіршенню якості зображення на очному дні. Гельмгольц вперше описав *променисті фігури світлорозсіювання* в умовах оптимальної корекції. На його думку, *промениста структура фігур*

світлорозсіювання є вираженням дольчатості заломлюючих середовищ кришталика.

Дослідження показують, що *структура фізіологічного астигматизму змінюється безладно. Безладність структури фізіологічного астигматизму обумовлює неможливість коригування його якими завгодно лінзами.* Описані вище оптичні недоліки ока людини складаються, частково компенсують одні одних і в кінцевому рахунку формують оптичну недосконаліть, що позначається як фізіологічний астигматизм.

Якість зображення на сітківці. Паралельні промені світла при проходженні через оптичну систему схематичного ока сходяться в фокусі – точці малих розмірів (рис. 1.11, а), а зображення предмета на сітківці стає ідеальним за якістю.



(а) (б)

Рис. 1.11. Хід променів в схематичному оці (а) і в оці з фізіологічним астигматизмом (б)

Навіть в схематичному оці з його сферичними і центрованими заломлюючими поверхнями при розташуванні фокусу на сітківці утворюються круги світлорозсіяння діаметром 4-6 мкм. В живому оці з великою кількістю оптичних недосконалостей, серед яких найбільше значення має фізіологічний астигматизм, в області фокусу відбувається безладне заломлення променів з утворенням значних за діаметром фігур світлорозсіяння (рис.1.11,б). В такому разі критерієм якості зображення є діаметр фігур світлорозсіяння та характер розподілу освітленості на площі цих фігур. Зі збільшенням розмірів фігур світлорозсіяння ретинальне зображення об’єктів стає більш розпливчатим.

Зіниця ока, діючи як діафрагма, суттєво впливає на глибину фокусної області. Глибину фокусної області ока визначають експериментально. При діаметрі зіниці 2 мм вона складає 0.88-1.0 мм,

а при діаметрі зіниці 6 мм – 0.30-0.36 мм.

Якщо зробити кілька поперечних перерізів в межах фокусної області, то на кожній з площин побачимо серію фігур світлорозсіяння неправильної форми (рис. 1.12). В середині будуть розташовуватися близькі за формою і розподіленням світлової енергії фігури світлорозсіяння.

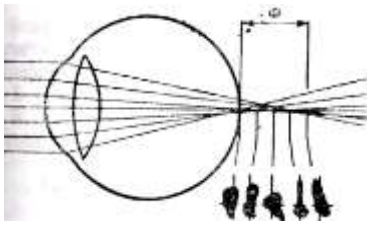


Рис. 1.12. Структура фокусної області (Ф)

Один з перерізів, що забезпечує найкращу якість зображення об'єкта, відповідає самій високій гостроті зору. Зміна гостроти зору в межах 1,35-1,32 не викликає помітних змін індивідуальної чутливості людини і не сприймається як зниження якості зору.

Аналізуючи вплив глибини фокусної області на якість зору, слід мати на увазі, що на відміну від світлочутливого шару фотокамери, рецепторний шар сітківки значно розтягнутий в глиб (порядку 60 мкм).

1.5. Клінічна рефракція ока

У випадку, коли оптичні аберації перевищують фізіологічний рівень, в оптичній системі ока формується так званий *клінічний фокус* – більш широкий і більш витягнутий вздовж оптичної осі. Якщо ж око наділене фізіологічним астигматизмом, то клінічний фокус має характеристики, властиві нормальному зору.

В залежності від положення заднього фокусу щодо сітківки в стані спокою акомодації розрізняють три різновиди клінічної рефракції: еметропію, міопію і гіперметропію.

Еметропія – це вид рефракції при якій клінічний фокус співпадає з сітківкою. Оскільки клінічний фокус має певну протяжність, то має місце кілька варіантів еметропії: сітківка пересікає клінічний фокус посередині, ближче до його заднього або переднього краю.

При *міопії* клінічний фокус розташовується перед сітківкою, а

оптична система являє собою складний міопічний астигматизм.

При *гіперметропії* клінічний фокус винесений за сітківку, а оптична система представлена складним неправильним астигматизмом.

Астигматизм не виділяється як окремий вид клінічної рефракції, але має велике клінічне значення. Теоретичною моделлю ходу променів в астигматичному оці є модифікований коноїд Штурма, показаний на рис. 1.13.

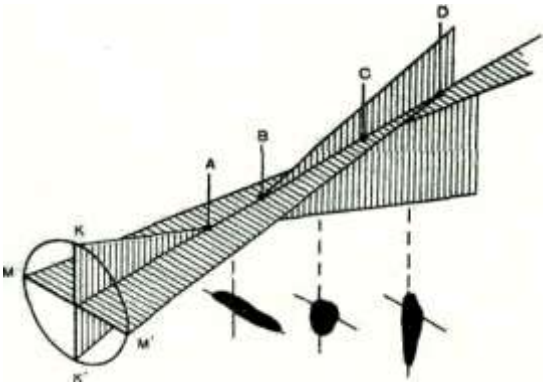


Рис. 1.13. Модифікований коноїд Штурма з урахуванням компонент неправильного астигматизму [10]

Коноїд має два головних перерізи КК′ и ММ′. Вузький пучок світла, що проходить в око відповідно до сильного в оптичному відношенні перерізу КК′, заломлюється на відрізку оптичної осі АВ. Вузький пучок світла, що проходить в оптично слабкому меридіані ММ′, заломлюється на відрізку CD.

Якщо в око спрямувати світло через всю площину зіниці і розмістити сітківку між точками А і В, то виникає зображення горизонтальної смуги, ширина якої залежить від ступеня нерівномірності заломлення в горизонтальному перерізі. Чим більшою є нерівномірність заломлення, тим більша дистанція між точками А і В і тим ширшою стає горизонтальна смуга.

При положенні сітківки між точками С і D одержимо зображення вертикальної смуги, ширина якої обумовлена неоднорідністю заломлення у вертикальному перерізі. Переміщення сітківки від одної фокальної області до другої приводить до утворення асиметричних фігур світлорозсіяння.

Корекція клінічного астигматизму згідно з моделлю коноїда Штурма здійснюється таким чином. Циліндрична лінза за оптичною

силою повинна точно відповідати ступені астигматизму, а вісь лінзи – точно співпадати з одним з головних перерізів астигматичного ока. За таких умов можна забезпечити нормальну гостроту зору. Дія коригуючої циліндричної лінзи зводиться до суміщення двох фокальних областей AB і CD, в результаті чого утворюється одна зона – клінічний фокус. Циліндрична коригуюча лінза за її оптичними характеристиками відповідає коноїду Штурма і прилаштована для корекції тільки ідеально правильного астигматизму. Неправильний компонент астигматизму не підлягає корекції.

Контрольні питання та завдання

1. В чому полягає різниця між оптичною і зоровою осями оптичної системи ока?
2. В чому полягає метод діафаноскопії?
3. Поясніть, чому заломлююча сила рогівки є більшою, ніж кришталика?
4. В чому полягає феномен дирекційної чутливості сітківки?
5. Порівняйте час адаптації ока при яскравому і сутінковому освітленні.
6. Вкажіть область спектральної чутливості ока і довжину хвилі, що відповідає її максимуму.
7. Дайте означення поняттю «акомодація ока». Як визначається об’єм акомодації?
8. Дайте означення одиниці гостроти зору. Які фактори впливають на гостроту зору?
9. Як впливає діаметр зіниці на сферичну аберацію ока?
10. Чому сферичну аберацію ока називають «аберацією проти правил»?
11. Чи залежить час світлової адаптації ока від кольору освітлення?
12. Чому в оптичній системі ока має місце астигматизм похилих променів?

13. Які фактори формують фізіологічний астигматизм ока? Чи може він коригуватися?
14. Як здійснюється корекція клінічного астигматизму? Чи є вона повною?
15. Поясніть, як впливає діаметр зіниці на глибину фокусної відстані?
16. Поясніть, які фактори впливають на якість зображення на сітківці?
17. Розрахуйте на скільки зміниться оптична сила кришталика при зменшені радіусу його передньої і задньої поверхонь на 5 %.
18. Розрахуйте на скільки буде зміщений світловий промінь в межах оптичної системи ока при корекції зору в 1 $дп_{Δ}$.
19. Розрахуйте як зміниться об'єм акомодації при віддалені ближньої точки ясного бачення з 20 до 25 см? Рахувати положення подальшої точки ясного бачення незмінним.
20. Розрахуйте мінімальний розмір предмета, що знаходиться на відстані 10 м від ока, який відповідав би мінімально допустимому розміру зображення на сітківці рівному 5 мкм. Відстань між вузловою точкою та сітківкою 15 мм.

2. Офтальмоскопічна техніка

2.1. Структурні елементи офтальмоскопічних систем

Офтальмоскопія – це спостереження дна ока. Таке спостереження потребує умов освітлення, за яких забезпечується максимальне проходження світлового потоку всередину ока. Таку функцію виконують *офтальмоскопи* – прилади для дослідження дна ока. Поряд з функцією забезпечення максимального освітлення офтальмоскопічні системи повинні попереджувати попадання в оптичну систему спостереження ока світлового потоку, відбитого рогівкою і іншими поверхнями. Інакше кажучи, попереджувати вплив небажаних рефлексів на зображення дна ока.

Під офтальмоскопічними системами розуміють візуальні, фотографічні та електронні системи для дослідження дна ока. Кожна офтальмологічна система включає в себе два канали – оптичний, що формує зображення дна ока, і освітлювальний що забезпечує максимальне освітлення досліджуваної поверхні (рис. 2.1).

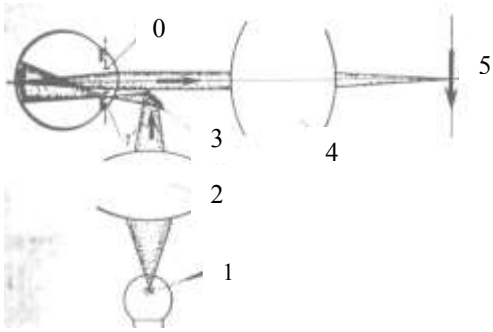


Рис. 2.1. Принципова оптична схема офтальмоскопу [11]

Випромінювання від джерела світла (1) проходить через систему лінз (2), спрямовується дзеркалом (3), фокусується в площині зіниці (0) і освітлює дно ока. Світло, що падає на дно ока, частково поглинається його тканинами, частково відбивається від поверхні сітківки (в основному дифузно) та виходить назад через зіницю, попадає в оптичний канал (4), що формує зображення дна в площині приймача випромінювання (5). В якості приймача випромінювання може бути око спостерігача, фотоплівка, веб-камера.

Слід зауважити, що кожна оптична система характеризується поняттями «вхідна і вихідна зіниці». Під *вхідною зіницею оптичної системи* розуміють той з дійсних отворів або його зображень, які

сильніше всього обмежують вхідний пучок. Під *вихідною зіницею оптичної системи* розуміють той з дійсних отворів або його зображень, які сильніше всього обмежують пучок, що виходить з системи.

Для освітлювального каналу офтальмоскопа вхідною зіницею є точкове джерело світла (1), а вихідною – його зображення (1') в площині зіниці ока. Для оптичного каналу вхідною зіницею є т.О – зіниця ока, а вихідною – т.5 в площині приймача випромінювання.

Оптичний канал. Принципова схема оптичного каналу приведена на рис. 2.2. В робочому стані до оптичного каналу підключається оптична система досліджуваного ока. Сумісно ці дві системи працюють як мікроскоп з малим збільшенням, або як сильна лупа. Вхідна зіниця офтальмоскопу винесена вперед і повинна бути суміщена з площиною зіниці досліджуваного ока. Тільки за таких умов може бути використане все поле зору приладу (рис. 2.2, а).

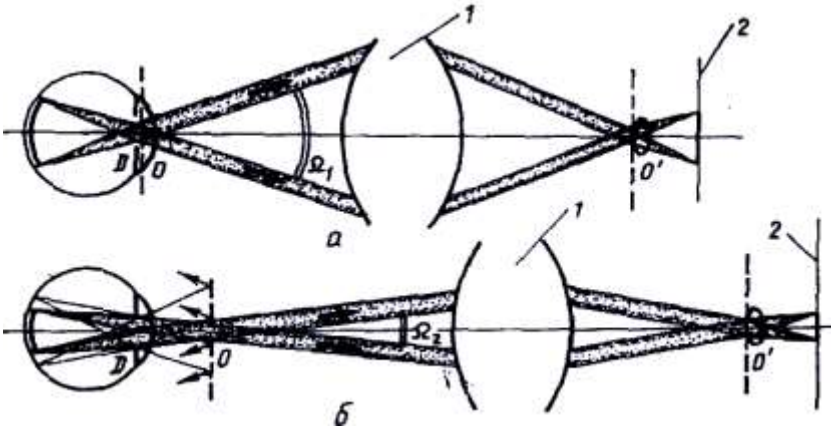


Рис.2.2. Схема оптичного каналу офтальмоскопу [11]

1 – оптична система (офтальмоскопічна лінза); 2 – приймач випромінювання; О – вхідна зіниця офтальмоскопу; О' – вихідна зіниця офтальмоскопу; D – зіниця досліджуваного ока; Ω – кут поля зору.

При правильному положенні офтальмоскопу (*а*) вхідна зіниця О співпадає з площиною зіниці досліджуваного ока (в приймачу випромінювання відображається все поле зору під кутом Ω_1).

При неправильному положенні (б) офтальмоскоп віддалений від досліджуваного ока і його вхідна зіниця О не співпадає з зіницею ока. На приймачі випромінювання відображається тільки частина поля

зору під меншим кутом Ω_2. При віддаленні вхідної зіниці оптичного каналу офтальмоскопу від досліджуваного ока поле зору зрізається і спостерігач може оглядати все поле, тільки переміщуючи погляд в площині вихідної зіниці офтальмоскопу (рис. 2.2, б). Таке спостереження називають «спостереженням за методом замкової щілини» і застосовується в ручних офтальмоскопах зі спрощеною конструкцією.

Працюючи як лупа, око досліджуваного не може забезпечити спостерігачу таке ж наведення на різкість, як і при роботі з фізичною лупою. Досягти різкого зображення при звичайному спостереженні за допомогою лупи ми можемо змінивши положення самої лупи щодо об'єкту спостереження. При офтальмоскопії це неможливо, оскільки зменшення або збільшення відстані між досліджуваним оком і офтальмоскопом не впливає на різкість зображення дна ока, а лише обмежує область видимого поля. Таким чином, при розгляді дна ока використовуються корегуючі лінзи, що забезпечують різке зображення при різних ступенях аметропії ока досліджуваного і спостерігача.

Освітлювальний канал. Схема освітлювальної системи офтальмоскопу (рис. 2.3) нагадує проекційний ліхтар. При офтальмоскопії роль проекційного об'єктиву відіграє оптична система досліджуваного ока.

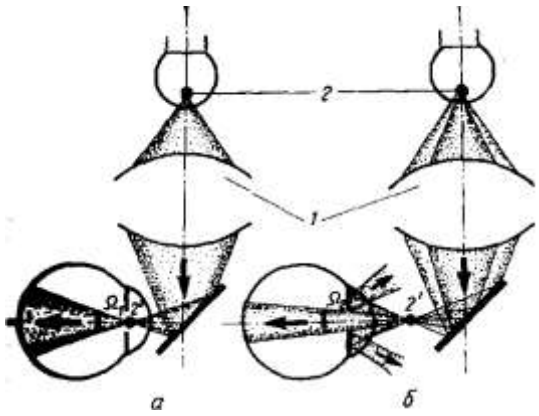


Рис.2.3. Схема освітлювального каналу офтальмоскопу [11]

1 – конденсор освітлювальної системи; 2 – джерело світла; 2'– зображення джерела світла – вихідна зіниця системи; Ω_1, Ω_2 – кутові величини освітленого поля. *а* – правильне розташування: джерело світла проектується на зіницю ока; б – неправильне: зображення джерела світла, віддалене від зіниці ока [11]

В оптичній системі офтальмоскопу, як і в проекційному ліхтарі, зображення джерела світла є вихідною зіницею освітлювальної системи і воно повинно розташовуватись в площині зіниці досліджуваного ока.

При розташуванні вихідної зіниці освітлювальної системи в площині зіниці ока досягається найкраща освітленість очного дна (рис. 2.3, а). При віддаленні джерела світла від ока райдужна оболонка зрізує частину падаючого на неї потоку світла і освітлене поле на сітківці стає меншим (рис. 2.3, б).

Слід відзначити, що дно ока слугує своєрідним екраном. В офтальмоскопах на освітлювальне поле проектується шкала, сітка або певні тести.

Взаємне розташування освітлювального і оптичного каналів повинно бути точно орієнтоване один відносно одного. При цьому слід дотримуватись двох основних вимог. Перша вимога – вісь оптичної системи повинна бути з точністю до 2-3° паралельною центральному променю освітлювального пучка, що падає в око. Якщо ця умова не буде виконана, то освітленим виявиться не та частина дна ока, яка спостерігається в офтальмометрі. Конструктивно паралельність пучків досягається тільки перед самим оком досліджуваного. Для цього відбиваюче дзеркало освітлювального каналу офтальмоскопу розташовується в безпосередній близькості від ока.

Друга вимога викликана необхідністю позбавлення рефлексів. Ця вимога полягає в тому, що оптичний і освітлювальний канали повинні бути орієнтовані по відношенню один до одного так, щоб вхідна зіниця оптичного каналу і вихідна зіниця освітлювального каналу не перекривались (були розділені в межах зіниці ока).

2.2. Методи усунення світлових рефлексів

Причини виникнення світлових рефлексів. Належність ока до обох каналів офтальмоскопа – освітлювального і оптичного обумовлює утворення світлових рефлексів у вигляді зображень джерела світла, вуалі поверхнями, що знаходяться в ході променів

(поверхні лінз, рогівки). Ці рефлекси ускладнюють спостереження дна ока. Складніше всього позбавитись рефлексів, утворюваних рогівкою. Світловий потік, що виходить з освітлюваного каналу, зазнає часткового відбивання від поверхні рогівки і через вхідну зіницю поступає в оптичний канал, створюючи світлові рефлекси або вуаль. Також утворюються рефлекси від оптичних деталей – лінз, плоско паралельних пластин, розташованих по ходу світлових променів. Якщо рефлекси фокусуються поблизу площини зображення дна ока, то вони мають вигляд зменшених зображень джерела світла. Якщо ж площина зображення рефлексів віддалена від дна ока, то вони накладаються на нього у вигляді вуалі, що також знижує якість зображення.

Геометричний метод усунення рефлексів. Основним методом усунення рефлексів рогівки є так *званий геометричний метод*. Він полягає в тому, що вхідна зіниця оптичного каналу і вихідна зіниця освітлювального каналу повинні розташовуватись в межах відкритої зіниці ока *поруч, не перекриваючи один одного*.

Важливо, щоб зображення джерела світла в площині зіниці ока не мало помітного ореолу. В такому разі розділення вхідної і вихідної зіниць може бути повним. *Усунення ореолу* досягають, перш за все, ретельним коригуванням аберацій освітлювальної системи, просвітленням поверхонь лінз, що суттєво зменшує інтенсивність відбитого світла, а також найбільш повним усуненням світла, розсіяного поверхнями металічних деталей, які зазвичай захищають чорними матовими покриттями. Однак, виключно геометричними засобами повністю позбавитись від рефлексів неможливо.

В залежності від вимог щодо величини поля зору, коефіцієнту збільшення зображення дна ока і його яскравості, системи офтальмоскопів, основаних на геометричному методі позбавлення рефлексів, поділяють на дві групи.

1. *Системи з повністю розділеними оптичним і освітлювальним каналами* (рис. 2.1). Загальним в таких офтальмоскопах є лише оптична система досліджуваного ока. Щоб поворотне дзеркало 3

(рис. 2.1) не попадало в хід променів в оптичній системі і не зрізало пучків, що формують зображення, воно повинно бути розташованим близько від досліджуваного ока. Саме це є недоліком таких систем, оскільки при наближенні поворотного дзеркальця до ока на 12-15 мм кут зору не перевищує $14\text{-}16^0$. Незважаючи на це, завдяки простоті, така оптична схема найшла широке застосування в ручних офтальмоскопах.

2. *Системи з загальним оптичним компонентом* – офтальмоскопічною лінзою. Такі системи працюють в стаціонарних офтальмоскопах, в яких передбачено фотографування або електронний запис зображення очного дна. В таких системах оптичний і освітлювальний канали не повністю розділені між собою (рис. 2.4), а мають загальну *офтальмоскопічну лінзу* (3).

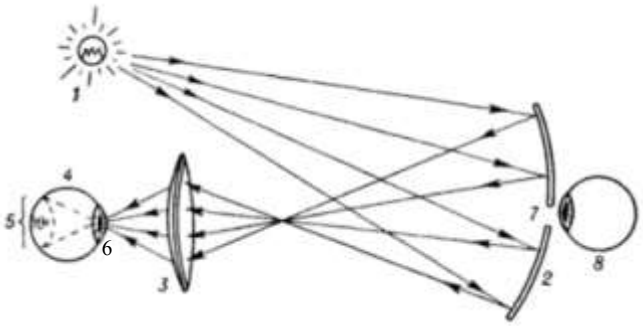


Рис. 2.4. Оптична схема офтальмоскопа з загальною офтальмоскопічною лінзою

Світловий потік від джерела світла (1) спрямовується на сферичне дзеркало (2), далі проходить через загальну офтальмоскопічну лінзу (3), попадає в око (4) та освітлює досліджувану частину очного дна (5). Розсіяне світло виходить через зіницю (6), фокусується лінзою (3) і через центральний отвір (7) дзеркала (2) попадає в око спостерігача (8).

На відміну від схеми з розділеними каналами (рис. 2.1) дзеркало (7) розташовується не перед досліджуваним оком, а всередині приладу поряд з апертурною діафрагмою. Така конструкція дозволяє, не обмежуючи розмірів поля зору, віддаляти офтальмоскоп на достатню для зручної роботи відстань. Проте, при цьому виникає серйозна перешкода – додаткові рефлекси від поверхні самої офтальмоскопічної лінзи (3).

Усунення рефлексів від офтальмоскопічної лінзи є значною технологічною проблемою. Навіть при багатошаровій конструкції просвітлюючих шарів, коли коефіцієнт відбивання стає рівним сотим часткам відсотка, рефлекси все ж переважають за яскравістю зображення дна ока.

Вихід було знайдено в створенні офтальмоскопічної лінзи з асферичною поверхнею. Профіль поверхні такої лінзи являє собою криву другого порядку – параболу, еліпс або гіперболу. Для таких поверхонь характерним є збільшення радіусу кривизни по мірі віддалення від вершини кривої. Така особливість лінз дозволяє повністю позбавитись від сферичної аберації. Для позбавлення від хроматичної аберації офтальмоскопічні лінзи склеюють з двох сортів скла. Разом з тим, в умовах серійного виробництва одержання асферичних лінз викликає значні труднощі. Тому подальший розвиток якісних офтальмоскопів привів до застосування *поляризаційних і комбінованих методів позбавлення рефлексів*.

Поляризаційний і комбінований методи усунення рефлексів. Поляризаційний метод полягає в тому, що при освітленні ока лінійно поляризованим світлом рогівка і поліровані поверхні лінз офтальмоскопа при відбиванні світла в основному зберігають стан його поляризації, в той час як дифузно відбиваючі тканини дна ока деполяризують більшу частину світла, що падає на них. Це дає можливість своєрідно «сортувати» за допомогою аналізатора світло, відбите від дна ока і світло, відбите поверхнями лінз і рогівки. Аналізатор, оптична вісь якого повинна бути орієнтована перпендикулярно до напряму осі поляризатора, повинен повністю гасити дзеркальні рефлекси лінз і рогівки та пропускати дифузно відбите світло тканинами дна ока. Проте, значна частина світлового потоку втрачається при проходженні світла через поляризатор і аналізатор. Крім того, дослідження ефективності поляризаційного методу показали, що повного усунення рефлексів від рогівки не досягається: на зображення дна ока накладається помітна вуаль, що знижує контрастність. Це зумовлено тим, що тканини ока не в повній

мірі викликають деполяризацію світла, а також неповною поляризацією поляроїдів, особливо в крайніх зонах видимого спектру.

Сумарно втрати світлової енергії при використанні поляризаційного методу складають від 75 до 90 %. Разом з тим, сучасні потужні джерела світла дозволяють застосовувати поляризаційний метод для усунення рефлексів як при спостереженні, так і при фотографуванні дна ока.

Значно кращий ефект дає використання комбінованого геометричного і поляризаційного методів, що спрощує одержання якісного зображення. Це дозволяє знизити вимоги щодо якості зображення джерела світла і, відповідно, до виправлення аберацій освітлювальної системи. Відпадає також необхідність екранування рефлексів асферичної поверхні. За умов якісного просвітлення оптики такі рефлекси практично відсутні. Використання сучасних поляроїдів а також джерел світла, що дають поляризоване випромінювання, дозволяє значно спростити конструкцію офтальмоскопічних приладів.

2.3. Методи вимірювань на очному дні

Вимірювання елементів ока використовується як при діагностиці захворювань, так і для вивчення органа зору. Специфіка оптичних вимірювань пов’язана з двома особливостями. Перша – це рухомість об’єкта вимірювань. Як відомо, око знаходиться в стані майже неперервного руху. Друга особливість обумовлена тим, що більша частина елементів ока знаходиться за очними середовищами – рогівкою, кришталиком, скловидним тілом, які змінюють видимий розмір досліджуваного об’єкту. Для правильної оцінки розмірів необхідно враховувати збільшення очних середовищ, яке може суттєво відрізнятись у різних людей. Вимірювання елементів ока можна здійснювати як в процесі візуального спостереження, так і фотометрично – за фотознімками, голограмами, електронними записами.

Для проведення візуальних досліджень використовуються прилади з вимірювальними шкалами і сітками різної конфігурації. Суміщення штрихів шкал з вимірювальними елементами здійснюється в більшості випадків за допомогою зміни напрямку погляду пацієнта, що слідкує за фіксуючою точкою приладу. Здійснити точне суміщення таким шляхом досить важко, тримаючи око пацієнта в потрібному положенні впродовж часу, необхідного для здійснення відліку.

Геліометричний метод. Цей недолік виключається при геліометричному методі запозиченому з астрономії. Він застосовується переважно для каліброметрії судин дна ока. Сутність методу полягає в наступному. Оптичним шляхом, за допомогою призми або розрізаної лінзи, зображення поділяється на дві частини, зміщені одна відносно одної. Переміщуючи мікрогвинтом рухому частину лінзи (або призму), лікар досягає дотику двох половин зображення в точках А і В, між якими вимірюється відстань – діаметр судини (рис. 2.5).

Таким чином, крайня точка верхньої половини зображення вимірюваного елементу, наприклад, судини, слугує початком відліку для нижньої половини. Величину, на яку при цьому переміщується рухома частина лінзи (призми), визначають по шкалі мікрогвинта. При довільних рухах ока обидві половинки його зображення переміщуються однаково, не зміщуючись одна відносно іншої. Для правильного калібрування судин необхідно досягнути такого розташування судини, коли вона перпендикулярна до лінії розділу.

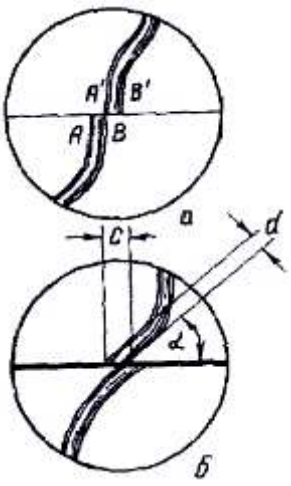


Рис. 2.5. Геліометричний метод вимірювання елементів дна ока за допомогою окуляра Лобека

а – правильне суміщення верхньої і нижньої частин роздвоєного зображення;

б – неправильне суміщення – судина розташована під кутом α до лінії розділу. Замість калібру *d* вимірюється величина *c*.

При візуальних спостереженнях, що дозволяють сприйняти іноді більш тонкі деталі порівняно з фотографуванням, точні вимірювання ускладнені рухами очей та стомленістю пацієнта. Навіть при використанні окуляра Лобека потрібно значно більше часу для проведення вимірювання, ніж при фотоекспонуванні.

Фотографічний, електронний методи. При фотографуванні на фотоплівку, чи з застосуванням веб-камери можна проводити багатократні вимірювання всіх деталей, порівнювати зображення, одержані в різні моменти часу, і тим самим відслідковувати динаміку процесу. Фотографічні або електронні вимірювання можна проводити за допомогою мікроскопів з невеликим збільшенням та проекційних приладів.

2.4. Поляризаційні офтальмоскопічні прилади

Оптична анізотропія біологічних тканин, що проявляється в поляризованому світлі, дозволяє встановлювати їх внутрішню будову та характерні особливості.

В медичній практиці поляризаційні методи досліджень ока дозволяють не тільки підвищити контрастність елементів тканин і позбавитись небажаних рефлексів, але й визначати функціональний стан окремих ділянок ока по характеру інтерференційних смуг поляризованого світла на поверхні рогівки.

Оптична анізотропія біологічних тканин проявляється частіше всього в явищі *дихроїзму*, коли природне світло в анізотропній речовині розділяється на два пучки, поляризовані у взаємно перпендикулярних напрямках, але один з них проходить майже повністю, а другий поглинається тканиною. Тому часто кажуть, що дихроїзм є анізотропією поглинання.

Одержання поляризованого світла. Найбільш широкого поширення набули герапатитові і полівінілові поляроїди, дія яких основується на явищі дихроїзму. Герапатитові поляроїди виготовляють з полійодиду сульфату хініну. Частіше всього у вигляді суспензії ультрамікроскопічних голкоподібних кристаликів в нітро- або ацетил-целюлозній плівці. При цьому всі кристалики орієнтовані

паралельно один одному.

Полівінілові поляроїди виготовляють з плівки полівінілового спирту, що містить йод, розтягнутої в одному напрямку. Одиночні полівінілові поляроїди пропускають біля 30 % і розсіюють приблизно 0,1 % світла, що падає. Герапатитові пропускають приблизно 28 % і розсіюють 3,5 % світла. Апертурний кут поляризації складає біля 90° для полівінілових і біля 60° для герапатитових поляроїдів. Колір окремого поляроїду сірий або сіро-зелений. Два поляроїди зі схрещеними площинами поляризації майже повністю гасять світло, що падає на них. За допомогою поляроїдів можна плавно регулювати інтенсивність освітлення об’єкта в межах до 100000 разів.

Поляризаційна офтальмоскопія. Офтальмоскопія і фотографування дна ока в поляризованому світлі дозволяє спостерігачу безпосередньо бачити і реєструвати зміни, пов’язані з оптичною анізотропією тканин, на різних ділянках дна досліджуваного ока, в том числі і в області жовтої плями .

Метод поляризаційної офтальмоскопії оснований на тому, що ділянки тканини очного дна, що володіють дихроїзмом, набувають в поляризованому світлі яскравості і світлових відтінків, відмінних від звичайних. В залежності від направлення схрещених поляроїдів, встановлених в приладі, освітленість і колірні відтінки окремих ділянок дна ока помітно змінюються. Одні структурні елементи гасяться, інші стають більш чіткими, а іноді навіть проявляються нові. Підвищення контрастності деяких елементів дна ока сприяє кращому виявленню патологічних змін, нерозпізнаних або погано помітних при звичайній офтальмоскопії.

Важливою перевагою поляризаційної офтальмоскопії є більш повне гасіння небажаних рефлексів, що дозволяє детально розглядати і фотографувати картину дна ока. Схема дослідження ока в поляризованому світлі показана на рис. 2.6.

Аналізатор гасить рефлекси від рогівки, але пропускає частину світла, дифузно відбитого очним дном (стрілка *III).* При повороті схрещених поляроїдів анізотропні ділянки тканин дна ока змінюють

свою яскравість.

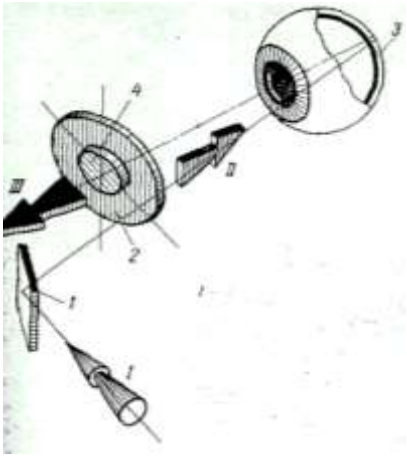


Рис. 2.6. Схема дослідження ока в схрещених поляроїдах [11]

1 – дзеркало, що спрямовує пучок природного світла (стрілка ***I***) від джерела до ока; 2 – поляризатор; 3 – дно ока, яке деполяризує основну частину поляризованого світла, що падає (стрілка //); 4 – аналізатор, схрещений з поляризатором

Прилади поляризаційної офтальмоскопії. У всіх приладах передбачено спільне обертання схрещених поляроїдів Досягнення повністю безрефлексної офтальмоскопії забезпечено розділенням пучків світла освітлювального і оптичного каналів на зіниці досліджуваного ока. Остаточно рефлекси і вуаль усуваються застосуванням поляризованого світла. У якості поляризаційного офтальмоскопу показано прилад ФОСП-1 (рис. 2.7).

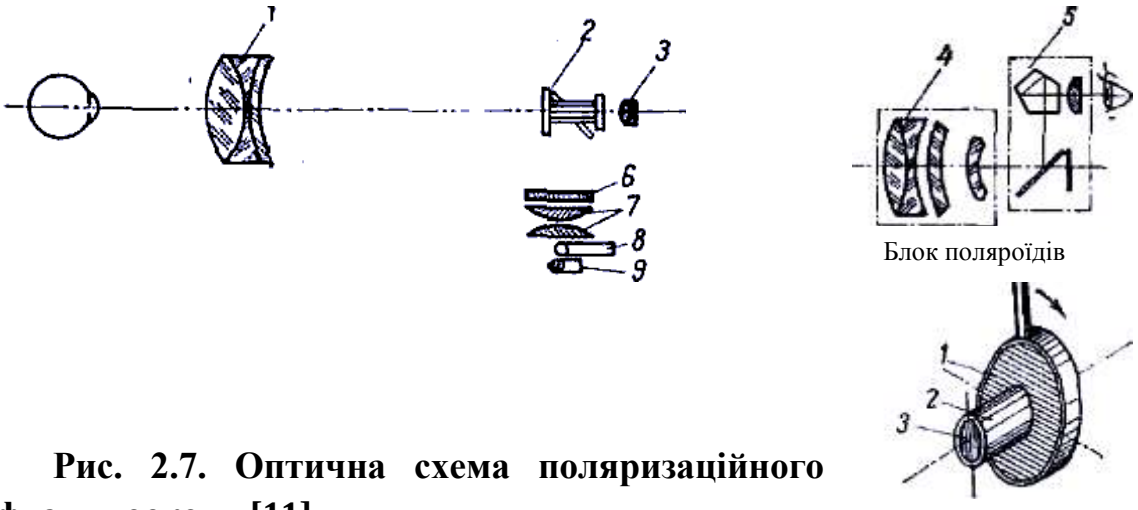


Рис. 2.7. Оптична схема поляризаційного офтальмоскопу [11]

1 – офтальмоскопічна асферична лінза; 2 – блок поляроїдів; 3 – змінні корекційні лінзи; 4 – фотооб’єктив; 5 – фотокамера; 6 – світлофільтр; 7 – конденсор; 8 – імпульсна лампа; 9 – галогенна лампа

Поляризатор 1, розташований в освітлювальному каналі, являє собою кільцевий поляроїд. Він закріплений на металічні трубці 2, що

слугує апертурною діафрагмою оптичної системи. В отворі трубки установлено круглий поляроїд – аналізатор 3.

Оптичні осі поляроїдів розташовані взаємно перпендикулярно, а тому аналізатор гасить залишкові рефлекси від поверхонь офтальмоскопічної лінзи та рогівки ока. Весь блок апертурної діафрагми з обома поляроїдами може повертатися від руки на 90°, при цьому світло від джерела проходить через різні ділянки кільцевого поляроїду. Обертаючи блок поляроїдів, лікар здійснює обертання площини поляризації і може добитися послідовного підвищення контрастності різних анізотропних елементів досліджуваної ділянки. Це дає можливість здійснювати фотознімки одної і тої ж дільниці з різними за контрастністю елементами.

2.5. Прилади для флуоресцентної ангіографії

Звичайна фотографія не забезпечує контрастного зображення судин ока, а також багатьох тонких патологічних змін тканин. У зв'язку з цим, особливе місце в досліджені ока і особливо очного дна займає *флуоресцентна ангіографія – дослідження судин методом флуоресценції.* Цей метод дає можливість спостерігати різні форми кровообігу, зміни кровоносних судин сітківки, що виникають при гіпертонії, діабеті та інших захворюваннях. Метод дозволяє також знаходити пошкодження капілярів сітківки ока, які надто малі, щоб їх помітити на фоні майже однаково з ними забарвленими стінками очного дна, злоякісні утворення, а також ряд інших патологічних змін. Флуоресцентні дослідження застосовуються і для інших відділів ока, наприклад, передньої камери.

Параметри приладів для флуоресцентної ангіографії. Основною задачею при створені приладів для флуоресцентної ангіографії є вибір джерела світла і світлофільтрів, що забезпечують збудження інтенсивної флуоресценції і якісну контрастність зображення. Для спостереження і налаштування системи застосовують лампи значної потужності. Фотографування, або електронний запис за допомогою веб-камери, здійснюють за допомогою ламп, що працюють в імпульсному режимі. В інших

варіантах може застосовуватись лазер, або лазерний діод, що працює в режимі періодичних імпульсів. Дослідження проводять при максимально розширеній зіниці. Для реєстрації швидко протікаючих процесів, що виникають при проходженні розчину флуоресцеіна по судинам очного дна, інтервали між світловими імпульсами повинні бути мінімальними. Таким чином здійснюється серійний флюорографічний запис всіх фаз проходження яскраво випромінюючого флуоресцеіна по судинам очного дна.

В якості оптимального фільтра для збудження флуорофорів використовуються сині світлофільтри з максимумом пропускання в області 400-450 нм. З метою збільшення контрастності зображення перед приймачем випромінювання (фотодіод, фотоплівка або око спостерігача) влаштовують замикаючий світлофільтр, який поглинає розсіяне очними середовищами короткохвильове випромінювання джерела світла. При цьому замикаючий фільтр (жовтий) повинен найкраще пропускати світло в області максимуму флуоресцентного випромінювання. Синій і жовтий світлофільтри підбирають таким чином, щоб колір основного фону дна ока був сірим і на ньому можна було б розглядати деталі, необхідні для орієнтування.

2.6. Прилади для біомікроскопії ока

Біомікроскопія живого ока, дає можливість проводити дослідження структур очних середовищ при помірному збільшенні і різних умовах освітлення. За допомогою біомікроскопії можливо виявити малопомітні зміни прозорих середовищ, встановити глибину патологічного запалення, виявляти найменші зміни рельєфу оболонок та ін. Метод біомікроскопії дозволяє одержати на живому оці картину, яка в певній мірі нагадує гістологічний зріз при розгляді його в біологічний мікроскоп. Разом з тим, одержання значних збільшень зображення (в декілька сотень і тисяч разів), що застосовується при звичайній мікроскопії, при біомікроскопії живого ока неможливе. Навіть при збільшені в 50-60 разів глибина різкості катастрофічно зменшується (до декількох нанометрів).

Специфіка біомікроскопії полягає також у тому, що при

дослідженні живого ока спостерігач знаходиться з тої ж сторони об'єкта, звідки падає світло. Це значить, що при біомікроскопії неможливі дослідження в світлі, що проходить, як при звичайній мікроскопії. Неможливі також застосування методів підфарбування об'єктів дослідження з метою підвищення контрастності зображення.

Оптичні способи підвищення контрастності (метод темного поля, похилого освітлення, фазового контрасту) також можуть бути застосовані тільки в значно зміненій формі.

Сучасні прилади дозволяють застосовувати біомікроскопічні дослідження практично для всіх відділів ока. Особливо ефективні вони для дослідження прозорих середовищ: рогівки, кришталика, передньої камери, скловидного тіла. За допомогою спеціальних пристроїв спостерігають важкодоступні ділянки ока: кути передньої камери (мікрогоніоскопія), циліарне тіло і циннові зв'язки (мікроциклоскопія і мікрозонулоскопія), а також проводять біомікроскопію дна ока – біомікроофтальмоскопію. Спеціальні пристрої дозволяють також спостерігати крайню периферію сітківки і хоріоідеї.

Біомікроскопія являє собою розвинутий і вдосконалений метод бокового освітлення, введений в 1899 р. Цапским. В 1911 р. Гульстрандом був створений перший варіант *щілинної лампи*, в якому замість всього зображення джерела світла використовувався вузький пучок, вирізаний з його проміжного зображення щілинною діафрагмою, змонтованою в приладі.

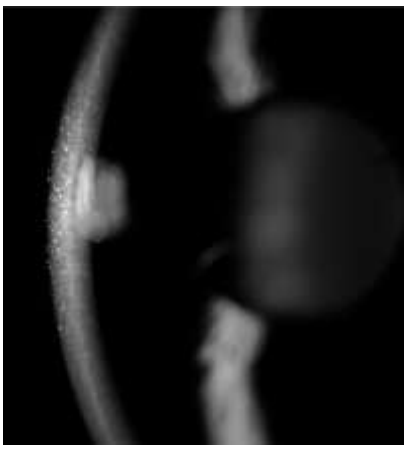


Рис. 2.8. Оптичні зрізи рогівки і кришталика, одержані за допомогою щілинної лампи

В щілинній лампі вузька світлова щілина фактично вирізає з

очного яблука тонкий «оптичний зріз». Рогівка, кришталик, скловидне тіло і різні включення видні як сірі фігури, що світяться або опалесцентні фігури (рис. 2.8).

Фізичні основи одержання «оптичних зрізів». Явище Тиндаля. Одержання оптичних зрізів основується на тому, що прозорі середовища ока розсіюють світло (кажуть, що «світяться») при падінні на них пучка світла. Явищем Тиндаля називають розсіяння світла оптично неоднорідними (мутними) середовищами. Неоднорідність показника заломлення зумовлює оптичну неоднорідність і, відповідно, розсіяння світла. Якщо неоднорідності малі порівняно з довжиною хвилі, то має місце слабке розсіяння світла. При збільшенні розмірів оптичних неоднорідностей інтенсивність розсіяного світла зростає, що покращує можливість спостереження структури прозорих середовищ у відбитому світлі. Явище Тиндаля має наступні особливості: при спостереженні збоку розсіяне світло має голубий відтінок. Чим меншими є частинки, що розсіюють світло, тим більш короткохвильовим (голубішим) стає розсіяне світло. Крім того, при падінні на об'єкт природного світла розсіяне світло стає поляризованим. Поляризація світла мутними середовищами є неповною, що пояснюється оптичною анізотропією молекул. Таким чином, одержане за допомогою щілинної лампи, світіння середовищ ока може бути використане для його діагностики, основаної на кольорових відтінках оптичних зрізів та поляризації розсіяного світла. Проте, при біомікроскопії ці ознаки не використовуються, а світіння оптичних зрізів застосовують тільки для детального розгляду стану прозорих середовищ ока.

Будова щілинної лампи. Конструкція щілинних ламп орієнтована на одержання «оптичних зрізів» і спостереження їх в бінокулярний мікроскоп. Щілинна лампа містить два канали – освітлювальний і спостережний. Спостережний канал складається з бінокулярного мікроскопу, встановленому на кронштейні координатного столику. В мікроскопі зазвичай є п'ять змінних об'єктивів зі збільшенням від 5 до 50-60 разів. Збільшення понад 20

використовується не часто, оскільки глибина різкості при значних збільшеннях стає надто малою і незначне зміщення мікроскопу або ока пацієнта призводить до втрати різкості зображення. При збільшеннях порядку 18-20 разів одночасно різко видні рогівка, райдужка, кришталик. Робочий відрізок, на який досліджуване око віддалене від приладу, досить значне і складає від 60 до 100 мм.

Освітлювач формує різке зображення щілини точно на тій же відстані від приладу, на яку сфокусовано мікроскоп. Конденсор освітлювача проектує проміжне зображення джерела світла – нитки лампи розжарювання в площину щілинної діафрагми, розташованої в корпусі освітлювача. Діафрагма регулюється за шириною, що дозволяє змінювати ширину оптичного зрізу. Можливий також варіант кругового освітлення. Ширина зображення щілини в сучасних приладах регулюється від 0,02 до 10 мм. Щілина може повертатися на 90°.

Суттєво розширює можливості приладу те, що «оптичний зріз» можна розглядати в бінокулярний мікроскоп під різними кутами. Для цього освітлювач і бінокулярний мікроскоп установлені на одній вертикальній осі, що проходить через середину лобної опори приладу. Вони можуть повертатися навкруг цієї осі на кут ±60°, утворюючи між собою кути від 0 до 120°. При будь-якій величині цього кута осі освітлювального пучка і вісь симетрії бінокулярного мікроскопу пересікаються в одній точці – там, де розташовується досліджуване око. Завдяки цьому досліджувана ділянка ока залишається весь час різко видною і добре освітлюваною.

Випускаються також ручні щілинні лампи. Проте їх функціональні можливості обмежені.

Контрольні питання та завдання

1. Які вимоги повинні виконуватись щодо взаємного розташування оптичного і освітлювального каналів офтальмоскопу?

2. Чому використання поляризаційного методу не забезпечує повного гасіння рефлексів?
3. В чому полягають переваги офтальмоскопів з загальною офтальмоскопічною лінзою?
4. В геліометричному методі вимірювань на очному дні використовують призми або розрізані лінзи для одержання подвійного зображення судини. Які ще способи одержання подвоєного зображення можна використовувати?
5. Вкажіть основні переваги поляризаційних офтальмоскопів. В чому полягає явище дихроїзму біологічних середовищ?
6. Поясніть призначення синього і жовтого світлофільтрів в офтальмоскопах флуоресцентної ангіографії.
7. Чому при біомікроскопії ока збільшення мікроскопу не перевищує 20?
8. В чому відмінність «оптичного зрізу» від біологічного зрізу тканини?
9. В чому полягає явище Тиндаля?
10. Який вигляд має зображення світлового потоку в щілинній лампі?
11. Які елементи структури ока спостерігають за допомогою щілинної лампи?

3. Прилади підбору і контролю засобів корекції зору
3.1. Офтальмометрия

Офтальмометри призначені для визначення радіусу кривизни і рефракції передньої поверхні рогівки ока, величини і виду астигматизму рогівки, а також напряму головних перерізів астигматичної рогівки. Прилад знайшов широке застосування при підборі контактних лінз з метою уточнення радіусу кривизни передньої поверхні рогівки, а також при підборі окулярів для визначення астигматизму ока. Офтальмометри можуть також бути застосовані при діагностиці очних захворювань, пов'язаних зі зміною форми і кривизни рогівки.

В основу методики офтальмометрії закладено припущення, що радіус кривизни, вимірюваний в тому або іншому головному перерізі, має стале значення на всій ділянці від центру рогівки до її периферії, тобто *вся поверхня рогівки є сферичною*. В дійсності це справедливо лише для центральної зони рогівки діаметром до 4 мм, що називають *оптичною зоною*, яку і вимірюють офтальмометром.

Принципова оптична схема офтальмометру показана на рис. 3.1. M'N' = 2*l'* є зображенням об'єкту MN = 2*l*, одержаним в результаті відбивання світла від поверхні рогівки 1 досліджуваного ока. Об'єктив 2 формує зображення M''N'' = 2*l''* в площині сітки (екрану) 3, спряжене з M'N', яке розглядається за допомогою окуляру 4.

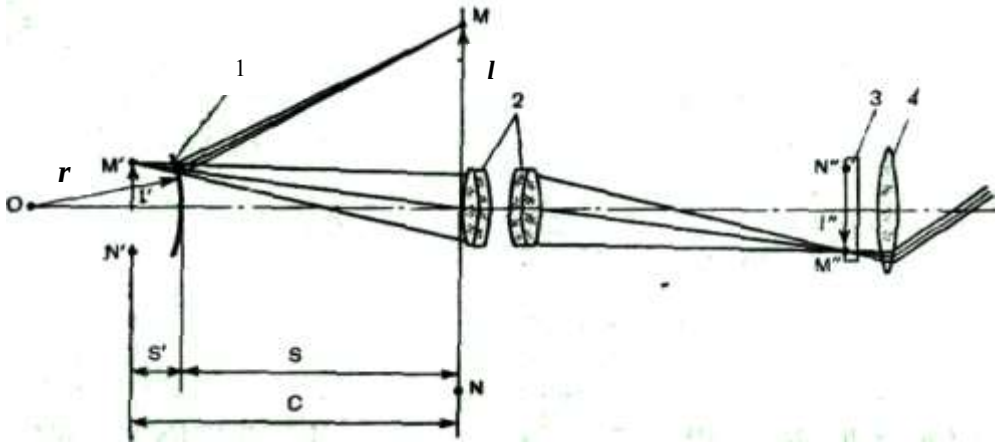


Рис. 3.1. Принципова оптична схема офтальмометру [12]

Рівняння для сферичного дзеркала (передньої поверхні рогівки)

має вигляд:

$$\frac{1}{s}-\frac{1}{s'}=\frac{2}{r}. \qquad (3.1)$$

З подібності трикутників: $$\frac{l}{s}=\frac{l'}{s'}. \qquad (3.2)$$

З рівнянь (3.1) і (3.2) одержимо радіус кривизни передньої поверхні рогівки

$$r=\frac{2sl'}{l'-l}. \qquad (3.3)$$

Щоб виключити необхідність визначення величини ***s***, оптична система офтальмометру налаштована так, що зображення об'єкту ***l′,*** яке для оптичної системи приладу являється предметом, знаходиться на одній і тій же відстані від об'єктиву (***c***-const). Для цього вся оптична система встановлюється по відношенню до ока спостерігача так, щоб зображення співпадало з площиною нерухомо встановленої сітки 3, забезпечуючи при цьому сталість відстані від об'єктиву 1 до зображення M"N", яка позначена на рис. 3.1 через ***c***. Це значення є величиною відомою для даної конструкції офтальмометру і зв'язане з величинами ***s*** і ***s′*** співвідношенням:

$$c = s - s'. \qquad (3.4)$$

З рівнянь (3.1), (3.2) і (3.4), одержимо

$$l'=-\frac{rl}{c+\sqrt{r^2+c^2}}. \qquad (3.5)$$

Враховуючи, що $r^2 << c^2,$ одержимо наближене співвідношення

$$l'=-\frac{rl}{2c}. \qquad (3.6)$$

Оскільки збільшення об'єктиву є величиною відомою для даного приладу, то визначення радіусу кривизни рогівки ***r*** зводиться до вимірювання ***l′*** при відомій величині ***l***, або вимірювання l при відомій величині l'. В першому випадку розмір об'єкту ***l*** є заданою, а l' вимірюваною величинами. Вимірюючи l', визначають радіус кривизни передньої поверхні рогівки ***r***. Така схема використовується в *офтальмометрах з нерухомими марками.* В другому випадку l' стала величина, а l – вимірювана (змінна). Така схема визначення ***r***

використовується в *офтальмометрах з рухомими марками.*

Особливістю оптичних схем всіх офтальмометрів, що мають винесені світлові марки, є наявність в них *елементів подвоєння,* необхідних для фіксації зображень світлових марок, що постійно переміщуються через рухливість ока. При введенні елементу подвоєння (рис. 3.2) замість одного зображення в полі зору елементу видно два. Якщо точки M_2'' і N_2'' співпадають, то величина лінійного подвоєння рівна величині зображення $M''N''$.

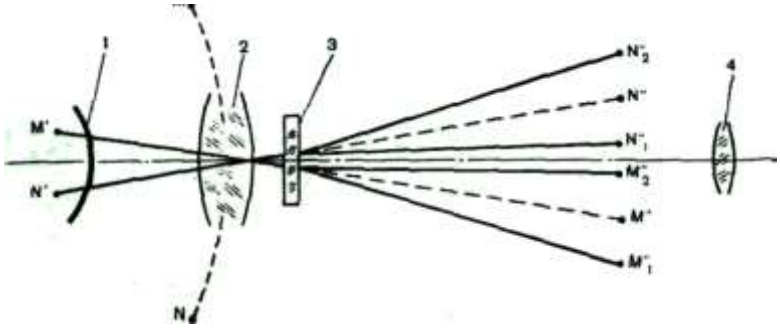


Рис. 3.2. Елемент подвоєння в офтальмометрі [12]
1 – рогівка ока;
2 – об'єктив;
3 – елемент подвоєння;
4 – окуляр

Таким чином, знаючи величину подвоєння, знають і величину зображення. Момент співпадіння точок M_2'' и N_1'' добре видний в центрі поля зору офтальмометра, незважаючи на те, що об'єкт знаходиться в постійному русі. В приладах точками об'єкту M і N слугують спеціальні симетрично розташовані світлові марки.

Офтальмометри з рухомими марками характеризуються наявністю двох рухомих світлових марок, що симетрично розташовані на дузі, і елементу подвоєння зі сталою величиною лінійного подвоєння. Відстань між марками змінюється доти, поки величина зображення, що залежить від радіусу рогівки, не стане рівною l', сталою для даного офтальмометру. При цьому відстань між марками буде відповідати радіусу кривизни рогівки, значення якого читається за шкалою, зв'язаною з рухомими марками.

Офтальмометри з нерухомими марками характеризуються наявністю двох нерухомих світлових марок і елементу подвоєння. Значення величини подвоєння змінюється доти, доки не стане рівним l', що залежить від величини радіусу кривизни рогівки, значення

якого читається за шкалою, зв'язаною з елементом подвоєння.

Ручний офтальмометр ОФ-3 є моделлю з нерухомими марками (рис.3.3). У якості елементу подвоєння використовується призма Волластона, що переміщується вздовж оптичної осі приладу.

Прилад має три шкали: шкалу вимірювання радіусів кривизни рогівки, шкалу рефракцій і шкалу кутових мір (для визначення астигматизму). Шкала рефракцій відображає значення оптичної сили рогівки в наближенні рівності радіусів передньої і задньої поверхонь: $D_{рог} = \frac{n_{рог} - 1}{r} + \frac{n_{в.в.} - n_{рог}}{r} = \frac{n_{в.в.} - 1}{r}$, де $n_{в.в.} = 1.336$ – показник заломлення водянистої вологи.

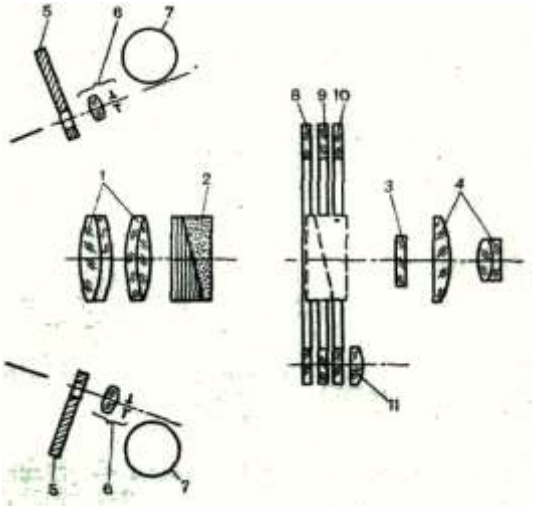


Рис.3.3. Оптична схема офтальмометру ОФ-3 з нерухомими марками [12]
1 – обєктив; 2 – елемент подвоєння (призма Волластона); 3 – сітка; 4 – окуляр; 5 – марки; 6 – проекційний пристрій; 7 – джерело світла; 8, 9 і 10 – шкали відліку; 11 – лупа

У зв'язку з тим, що метод офтальмометрії забезпечує перш за все визначення радіусу кривизни рогівки у двох головних перерізах, що буває недостатньо при підборі контактних лінз; більш широкого застосування набувають прилади, що забезпечують кератоскопічний і фотокератометричний методи дослідження форми передньої поверхні рогової оболонки ока, що не потребують у своїх схемах елементу подвоєння.

Фотокератометри. Метод дослідження оснований на оцінці фотозображення, одержаного в результаті відбивання тест-об'єктів від поверхні рогівки у вигляді концентричних кілець відомих діаметрів і радіальної сітки. Результатом оцінки такого фото-

зображення являється топографія рогівки ока, за якою проводиться розрахунок і вибір жорстких рогівкових контактних лінз.

На фотокератограмі одержується зображення концентричних кілець, відстань між якими різна і залежить від ступеня асферичності рогівки.

3.2. Рефрактометри

Рефрактометр призначений для об'єктивного визначення недоліків оптичної системи ока, що враховуються для установлення рефракції корегуючих очкових лінз і положень головних перерізів при астигматизмі. Найбільш поширеним в офтальмології став коінцидентний рефрактометр Хартінгера. Схема рефрактометру Хартінгера побудована на принципі суміщення зображень (коінциденції). Якщо перед оком встановити дві діафрагми (рис. 3.4.), то різке зображення точки О стане тільки тоді, коли площина зображення буде знаходитись на сітківці. При неспівпадінні площини зображення з площиною сітківки утворюються два круга розсіяння (принцип Шейнера).

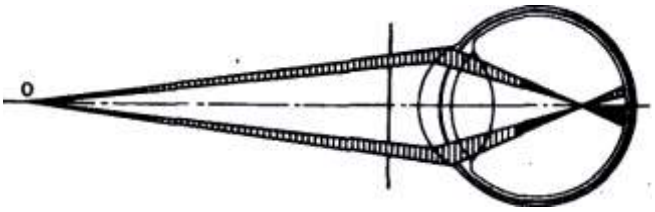


Рис. 3.4. До пояснення принципу Шейнера

В приладах в якості тест-марки застосовується не світлова точка, а група штрихів, нанесених на посріблену платівку – *міру*. За допомогою оптичних клинів світло від верхньої міри буде проходити через одну діафрагму, а від нижньої – через другу. Так досягається роздільне проектування двох половин зображення на дно ока. На рис. 3.5 показана принципова оптична схема рефрактометру, що складається з систем освітлення, спостереження і відліку. Освітлювальна і спостережна системи мають загальну офтальмоскопічну лінзи.

Промені від джерела світла 1, проходять конденсор 2 і призму повного внутрішнього відбивання 3, падають на тест-марку 4, котра

являє собою три вертикальні і дві горизонтальні щілини. На вертикальних гранях призми розміщені дві щілини, що розділяють промені від тест-марки на два пучка. Далі ці пучки світла проходять об'єктив 5, пентапризму 6, діафрагму 7 з двома щілинами, відхиляються дзеркалом 8 і з допомогою офтальмоскопічної лінзи 9 попадають у досліджуване око 10. Пучки променів, відбиті від дна ока, збираються офтальмоскопічною лінзою в її фокальній площині. Обєктивом 11 зображення з фокальної площини лінзи переноситься через отвір в дзеркалі 8 в площину сітки 12, потім розглядається через окуляр 13 оком спостерігача 14.

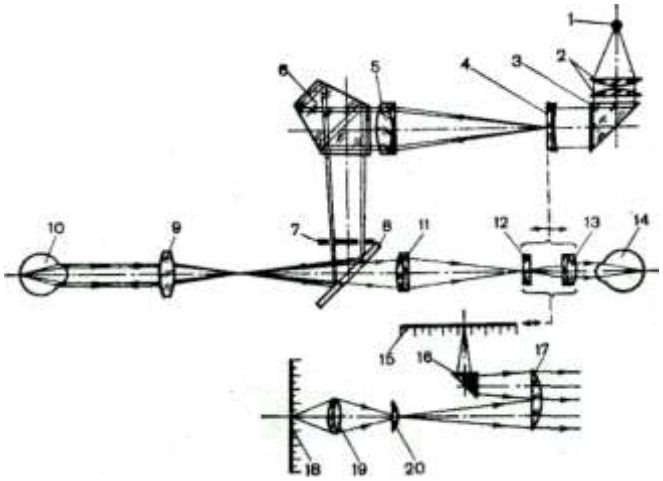


Рис. 3.5. Принципова оптична схема рефрактометра Хартингера [12]

Для визначення рефракції спостерігач суміщає зображення тест-марки з сітківкою досліджуваного ока і проводить відлік. Система відліку включає в себе діоптрійну шкалу 15, за якою з допомогою призми 16 і лупи 17 визначається переміщення тест-марки. Відлік повороту приладу навкруг горизонтальної осі здійснюється за шкалою 18 з допомогою об'єктиву 19, колективу 20 і лупи 17.

Автоматичні рефрактометри. Застосування інфрачервоних джерел випромінювання в оптиці і сучасні досягнення електроніки привели до створення ряду моделей автоматичних рефрактометрів, що дозволяють суттєво скоротити час проведення досліджень рефракції ока, документувати і зберігати їх результати.

В автоматичному рефрактометрі марка, освітлена інфрачервоним світлом, проектується на дно досліджуваного ока. За допомогою рухомої оптичної системи зображення цієї марки, відбите від дна ока,

попадає на фотоелектричний перетворювач через вузьку щілину, орієнтовану в кожний момент часу в одному з меридіанів досліджуваного ока. Аналізатор системи налаштований на пошук положення найбільшого контрасту зображення за його максимальною яскравістю. Цей пошук здійснюється переміщенням фокусуючої лінзи рухомої оптичної системи. Положення лінзи, при якому досягається найбільший контраст, вказує на рефракцію ока в даному меридіані. В процесі вимірювання щілина, що обертається, проходить всі меридіани досліджуваного ока і дані, одержані в меридіанах з максимальною і мінімальною рефракціями, після дворазового вимірювання та при співпадінні результатів, за допомогою ЕОМ висвітлюються в формі: «сфера-циліндр-вісь».

3.3. Діоптриметри

Діоптриметри призначені для вимірювання задньої вершинної рефракції і призматичної дії очкових лінз, а також для визначення і проставляння оптичного центру, положення головного перерізу з найменшою рефракцією (осі циліндра) в астигматичних лінзах і напряму головних перерізів у призматичних лінзах.

Принцип дії *окулярного діоптриметру* полягає в наступному: якщо в паралельний пучок світла помістити очкову лінзу, то за лінзою паралельний пучок променів буде сходитись для позитивної лінзи, або розходитись – для негативної. Змінюючи сходимість променів, можна відновити паралельність пучка світла в оптичній системі. Оптична схема окулярного діоптриметру показана на рис. 3.6.

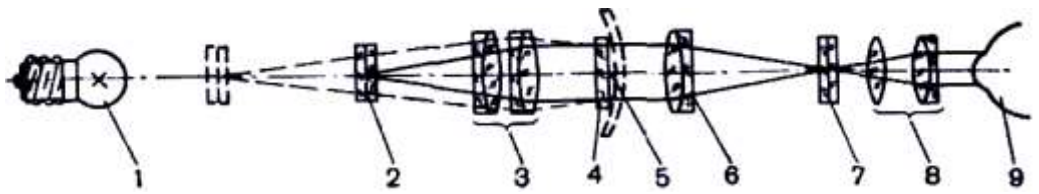


Рис. 3.6. Принципова оптична схема окулярного діоптриметру [12]

Промені від лампи 1 освітлюють марку 2. Щоб з об’єктиву 3 коліматора виходив паралельний пучок, марка 2 повинна бути

встановлена в задній фокальній площині об'єктиву коліматора. При цьому проти точки відліку повинен знаходитись нульовий показник діоптрійної шкали. Паралельний пучок променів проходить через плоско-паралельну скляну пластинку 4 (з агатовим стержнем 5) і попадає в об'єктив зорової труби 6. Далі пучок світла збирається в фокальній площині об'єктиву 6, в якому розташовані дві пластини 7; на одній з них нанесено перехрестя, а на другій – кругова шкала. Зображення світлової марки коліматора, перехрестя і кругової шкали розглядаються через окуляр 8. Спостерігач 9 за допомогою окуляру встановлює на різкість зображення марки.

Після того, як в хід променів введена очкова лінза (зображена на рис. 3.6. пунктиром) чітке зображення світлової марки коліматора в фокальній площині об'єктиву зорової труби може бути відновлено тільки при відповідному переміщенні марки коліматора 2 вздовж оптичної осі діоптриметра.

Якщо, наприклад, рефракція очкової лінзи негативна, то для того, щоб з коліматора виходив паралельний пучок променів, необхідно, щоб падаючий пучок сходився, тобто марка 2 повинна бути винесена вліво від первинного положення в напряму від об'єктиву (див. рис. 3.6).

Кожному положенню світлової марки коліматора відповідає певне значення вершинної рефракції очкової лінзи, яке нанесено на шкалу, що переміщується разом з маркою коліматора.

При вимірюванні задньої вершинної рефракції сферичної лінзи зображення світлової марки коліматора має вигляд круга зі світлих точок, розташованого в центрі перехрестя. Для призматичної лінзи кругла марка зміщена від центру перехрестя. Якщо ж лінза астигматична, то зображення світлових точок марки витягується в групу паралельних штрихів, віссю яких є пряма, що лежить в одному з головних перерізів такої лінзи. Різке зображення таких штрихів можна спостерігати в двох положеннях, що відповідають взаємно перпендикулярним розташуванням головних перерізів астигматичної очкової лінзи

Контрольні питання та завдання

1. Вкажіть за яких наближень розраховується оптична схема офтальмометра?
2. Які функції в оптичній схемі офтальмометра виконують елементи подвоєння?
3. Які ще, крім призми Волластона, елементи подвоєння можна застосовувати?
4. Поясніть оптичну схему офтальмометра. В чому відмінність офтальмометрів з фіксованими і рухомими марками?
5. Які наближення прийняті при розрахунку оптичної сили рогівки на шкалі офтальмометра?
6. В чому полягає перевага фотокератометрів? Вкажіть область їх застосування.
7. В чому полягає принцип суміщення зображень, застосований в рефрактометрі Хартінгера?
8. Поясніть оптичну схему рефрактометра Хартінгера.
9. Які зміни внесені в схему автоматичного рефрактометра порівняно з рефрактометром Хартінгера?
10. В чому полягає принцип дії окулярного діоптриметра?
11. Поясніть принципову оптичну схему діоптриметра.
12. Як відрізняються зображення марок при введені в оптичну схему сферичних і астигматичних лінз?
13. Які характеристики треба враховувати при підборі астигматичних лінз?

ЧАСТИНА ІІ. ОПТИЧНІ МЕТОДИ ДІАГНОСТИКИ І АНАЛІЗУ

4. Оптична мікроскопія

4.1. Оптична схема, збільшення і роздільна здатність оптичного мікроскопу

Можливість роздільного бачення деталей предмета залежить від розмірів його зображення на сітківці ока, або від кута зору. Кут зору можна збільшити, наблизивши предмет до ока, що не завжди є можливим. Для збільшення кута зору використовують оптичні прилади: телескопи, лупи, мікроскопи.

Лупою називають оптичну систему, в передній фокальній площині якої, або в безпосередній близькості від якої, розташований предмет. Зображення, одержуване лупою, знаходиться в нескінченності, або на зручній для ока відстані. Якщо зображення знаходиться в нескінченності, то воно спостерігається оком без акомодації. На рис. 4.1, *а* показано хід променів при використанні лупи (точка N являється вузловою точкою ока).

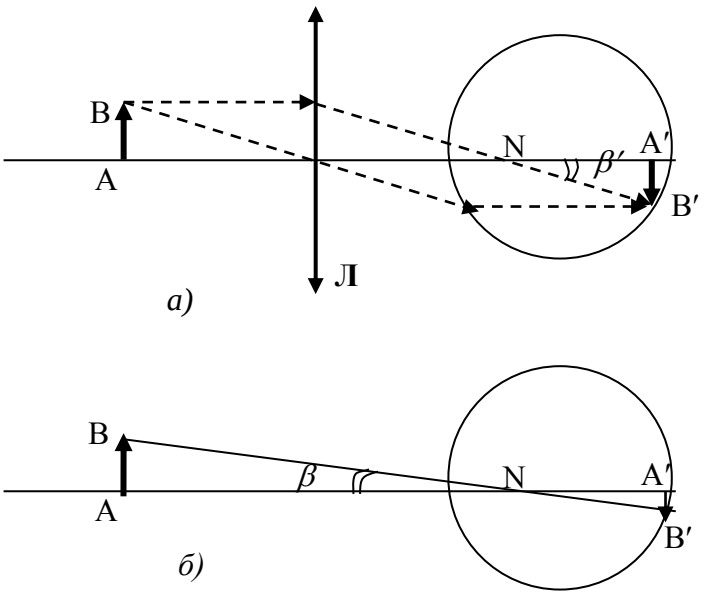


Рис. 4.1. Хід променів при використанні лупи (*а*) і в оптичній системі неозброєного ока (*б*)

Кут зору в оптичній схемі, що включає лупу, $\beta' = L/f$, де L – висота предмету АВ, f – фокусна відстань лупи. В оптичній системі неозброєного ока (рис. 4.1, *б*) кут зору $\beta = L/a_0$, де a_0 – відстань найкращого зору. Збільшення лупи визначається відношенням кутів зору: $\Gamma = \beta'/\beta = a_0/f$.

Збільшення лупи може бути від 2 до 40. На практиці найбільш поширеними є лупи з 10-кратним збільшенням, що дозволяє спостерігати предмети розміром до 7,5 мкм при гостроті зору 1. Для спостереження об'єктів менших розмірів використовують мікроскопи.

Оптична схема мікроскопу. Основними функціональними елементами мікроскопу є об'єктив і окуляр (рис. 4.2). Головні площини і головні точки об'єктиву позначені H_1 і H_1', окуляру – H_2 і H_2'; F_1 і F_2 – передні фокуси об'єктиву і окуляра; F_1' і F_2' – задні фокуси об'єктиву і окуляра. Зображення $A'B'$ предмету AB, створене об'єктивом, розташовано в передній фокальній площині F_2 окуляра. В результаті промені, що попадають в око, є паралельними (як і при спостережені за допомогою лупи). Фокусна відстань такої системи розраховується за формулою $f = f_1 f_2 / \Delta$, де f_1 і f_2 – фокусні відстані об'єктиву і окуляра; Δ – відстань $F_1'F_2$ між заднім фокусом об'єктиву і переднім фокусом окуляра (оптичний інтервал), що називають *оптичною довжиною тубуса мікроскопа*.

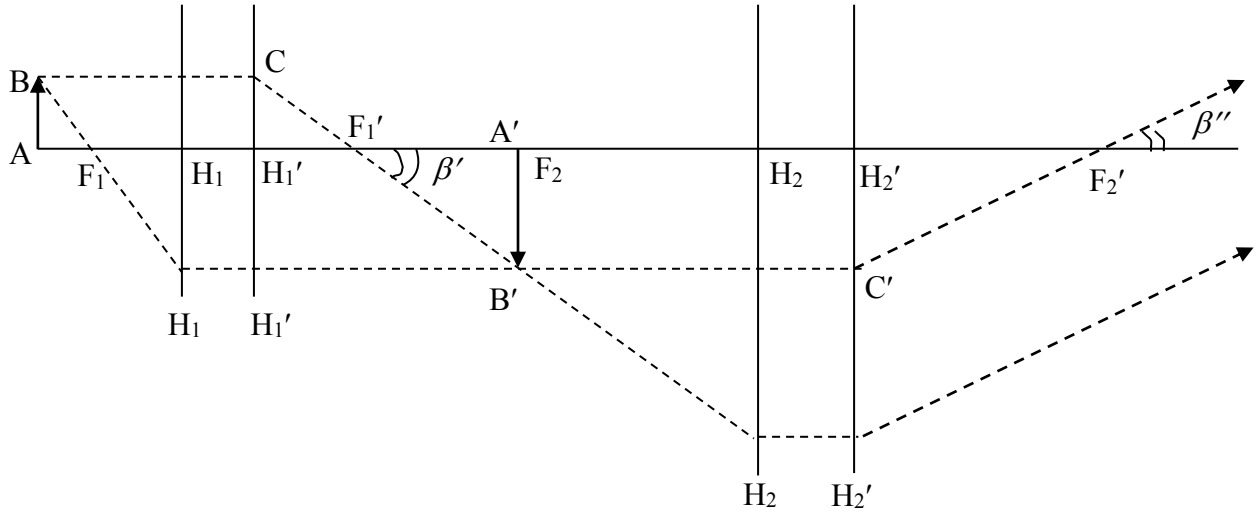


Рис. 4.2. Оптична схема мікроскопа [2]

Збільшення мікроскопа. Одержимо формулу для розрахунку величини збільшення (Г) мікроскопа. Для цього скористуємося побудовами на рис. 4.2.

З $\Delta F_1'A'B'$ одержимо співвідношення для кута зору, під яким видно

проміжне зображення $A'B'$:

$$\beta' = \frac{L'}{\Delta}, \qquad (4.1)$$

де L' – розмір проміжного зображення $A'B'$, створеного об'єктивом. З $\Delta CH_1'F_1'$

$$\beta' = \frac{L}{f_1}. \qquad (4.2)$$

З $\Delta C'H_2'F_2'$ одержимо співвідношення для кута зору, під яким видно зображення, що дає окуляр мікроскопа:

$$\beta'' = \frac{L'}{f_2}. \qquad (4.3)$$

Збільшення мікроскопа визначається відношенням кутів

$$\Gamma = \frac{\beta''}{\beta}, \qquad (4.4)$$

де $\beta = \frac{L}{a_0}$ – кут зору, під яким видно об'єкт неозброєним оком.

Розв'язуючи сумісно рівняння (4.1-4.4), одержимо збільшення мікроскопа

$$\Gamma = \frac{a_0 \Delta}{f_1 f_2}. \quad (4.5)$$

Оскільки збільшення об'єктиву $\Gamma_{об} = \frac{\beta'}{\beta}$, то з рівняння (4.2) і виразу для кута зору β одержимо збільшення об'єктиву

$$\Gamma_{об} = \frac{a_0}{f_1}. \quad (4.6)$$

З рівнянь (4.1) і (4.3) одержимо збільшення окуляру $\Gamma_{ок} = \frac{\beta''}{\beta'}$ у вигляді

$$\Gamma_{ок} = \frac{\Delta}{f_2}. \quad (4.7)$$

З рівнянь (4.6) і (4.7) видно, що збільшення мікроскопа визначається добутком збільшень об'єктиву і окуляру:

$$\Gamma = \Gamma_{об}\Gamma_{ок}. \quad (4.8)$$

Роздільна здатність мікроскопа – здатність одержувати роздільне

зображення мілких деталей предмету. *Кількісно роздільною здатністю мікроскопа називають величину, обернену найменшій відстані між двома точками, що сприймаються роздільно.*

Світло від освітлювача мікроскопа, попадає на мілкі деталі досліджуваного об'єкту і зазнає дифракцію.

1. Розглянемо випадок, коли освітлення об'єкту здійснюється паралельним пучком світла. При цьому, оскільки фронт хвилі є плоским, має місце дифракція Фраунгофера. Для спрощення будемо вважати, що об'єкт має просту форму у вигляді правильної дифракційної гратки P_1P_1(рис. 4.3).

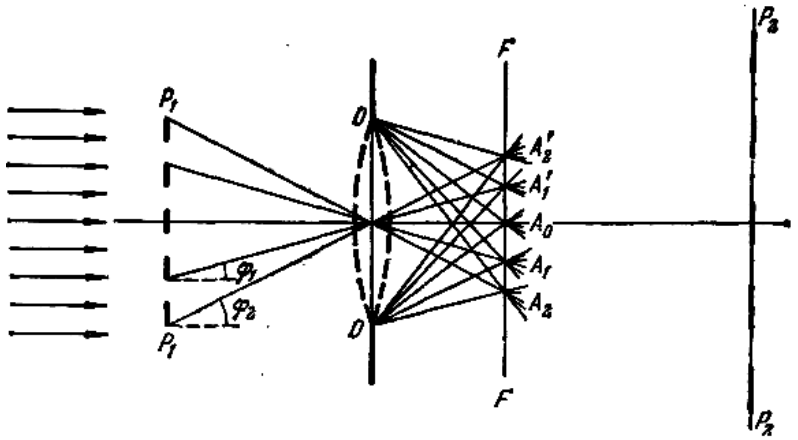


Рис. 4.3. До дифракційної теорії зображень Аббе [1]

Період гратки d є в даному випадку характеристикою мілкої деталі. За таких умов роздільна здатність мікроскопа визначається можливістю розрізняти гратку, тобто визначати мінімальне значення її періоду d. При дифракції в фокальній площині FF об'єктиву утворюються головні максимуми, кутові відстані між якими визначаються періодом гратки. За умови паралельності падаючих променів світла, умова утворення головних максимумів набуває вигляду $d\sin\varphi = m\lambda$, де λ – довжина хвилі, φ – кут дифракції, m – порядок дифракційного максимуму. На оптичній осі мікроскопа розташований нульовий максимум A_0. Максимуми m-го порядку (A_1, A_2, …) лежать за напрямами, що визначаються з співвідношення $\sin\varphi_m = \pm m\lambda_0 / d$. Оскільки всі дифракційні максимуми відповідають когерентним променям, то за фокальною площиною об'єктиву ці промені інтерферують між собою і формують зображення предмету.

Згідно з дифракційною теорією зображень Аббе, дифракційна картина, що одержується в фокальній площині FF об'єктиву, називається *первинним зображенням*, а картина в площині P_2P_2 зображення предмету – *вторинним зображенням*. Тільки повна сукупність дифракційних максимумів визначить вторинне зображення у повній відповідності з предметом. Однак, вхідна зіниця об'єктиву (оправа об'єктиву) обмежує число дифракційних максимумів. Аббе показав, що *для відповідності вторинного зображення предмету необхідно, щоб з первинного зображення проходили, принаймні, промені центрального і одного з перших головних дифракційних максимумів.*

Чим менший предмет і його деталі *d,* тим більші кути дифракції він зумовлює і тим ширшими повинні бути отвори оправи об'єктиву. Отвори об'єктиву визначаються кутом 2α між крайніми променями, що йдуть від предмету, розташованого у фокусі, до країв об'єктиву. Половина цього кута називається *апертурою*. Чим більшою є апертура ($n\sin\alpha$) порівняно з λ_0 / d, тим більше дифракційних спектрів високих порядків приймають участь у формуванні зображення, тобто точніше передається форма предмету, що спостерігається.

Таким чином, проведений розгляд формування зображення при освітленні предмету паралельним пучком світла вказує на те, що роздільна здатність мікроскопа визначається співвідношенням

$$\frac{1}{d} = \frac{\sin\alpha}{\lambda} = \frac{n\sin\alpha}{\lambda_0}, \quad (4.9)$$

де λ_0 – довжина хвилі у вакуумі, n – показник заломлення середовища, в якому знаходиться предмет.

2. На практиці освітлення об'єкту здійснюють не паралельними променями, а променями, що сходяться. В якості прикладу на рис. 4.4 показано конструкцію освітлювальної системи мікроскопа, що забезпечує спостереження об'єкту в променях, що сходяться. За таких умов поліпшується роздільна здатність мікроскопа. Якщо освітлювальний пучок падає на об'єкт під кутом α до оптичної осі мікроскопа і дифрагує під кутом α_0, то умова максимуму дифракції

при похилому падінні світла має вигляд:

$$\sin\alpha_0 - \sin\alpha = m\lambda / d. \quad (4.10)$$

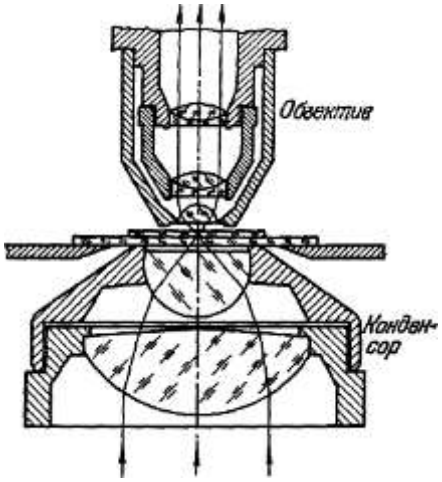


Рис. 4.4. Переріз конденсору і обєктиву мікроскопа [2]

.

Тоді умова, за якої хоча б перший дифракційний максимум попав в об'єктив, набуває вигляду: $\alpha = -U$, $\alpha_0 = U$ тобто $\alpha = -\alpha_0$ при $m = 1$ і (4.10) набуває вигляду

$$2\sin U \geq \lambda / d = \lambda_0 / nd,$$

звідки роздільна здатність мікроскопа

$$\frac{1}{d} \geq \frac{n\sin U}{0.5\lambda_0}. \quad (4.11)$$

де: $n\sin U = A$ – числова апертура об'єктиву.

Порівнюючи (4.11) з (4.9), бачимо, що роздільна здатність мікроскопа збільшується в 2 рази порівняно з умовами освітлення паралельним пучком світла.

Важливо також додати, що числова апертура може бути збільшена при використанні рідких прозорих середовищ – *імерсії*, якими заповнюється простір між об'єктивом і покривним склом. В якості імерсії використовують воду (n = 1.33), кедрове масло (n = 1.515) та ін.

4.2. Спеціальні прийоми оптичної мікроскопії

Вимірювання розмірів мікроскопічних об'єктів. З цією метою зручно використовувати окулярно-гвинтовий мікрометр. Цей пристрій встановлюється на місці окуляру. При обертанні гвинтового пристрою переміщується зображення перехрестя в полі зору об'єкта, що дозволяє відраховувати долі поділок мікрометра. Такі мікрометри

повинні бути попередньо калібровані.

Мікропроекція, мікрофотографія, електронний запис. Оскільки промені на виході звичайного мікроскопа паралельні, то в такому варіанті (рис. 4.2) він не дає дійсного зображення. Для одержання дійсного зображення необхідно зображення, створюване об’єктивом (A′B′ на рис. 4.2), розташувати далі від переднього фокусу окуляра. Для мікропроекції або мікрофотографування в схему мікроскопа вносять циліндричні вставки певної довжини. При електронному записі в цьому немає необхідності, оскільки використовується фокусуюча система веб-камери.

Метод світлого поля в прохідному світлі. Це найбільш поширений метод дослідження прозорих препаратів з включеними в них абсорбуючими (поглинаючими) частинками і деталями. Частинки поглинають і частково розсіюють падаюче світло, що й зумовлює виникнення зображення згідно з дифракційною теорією. Зазначений метод може бути корисний і при не абсорбуючих об'єктах, якщо вони розсіюють світловий пучок настільки сильно, що значна частина пучка не потрапляє в об'єктив. У цьому випадку світло повинне падати перпендикулярно до освітлюваного препарату.

Бічне освітлення. У деяких випадках для підсилення контрастності досліджуваних деталей світло спрямовується на об'єкт під деяким кутом. Ефект бічного освітлення досягається або зміщенням лінз конденсора відносно оптичної осі, або зміщенням джерела світла поза мікроскопом і освітленням зразка знизу з-під лінз об'єктиву. Внаслідок того, що більшість лінз об'єктиуа має невелику робочу відстань, цей метод можна застосовувати тільки при роботі з малими збільшеннями, коли використовуються об'єктиви з великою фокусною відстанню.

Метод темного поля (ультрамікроскопія). Якщо розміри досліджуваних об’єктів менші мінімально допустимих, враховуючи роздільну здатність мікроскопа, то повне зображення предмету (його форми і розмірів) одержати неможливо. Проте, саме існування таких частинок можна встановити за допомогою мікроскопа при

спеціальному способі спостереження. Цей спосіб, що називають *методом темного поля*, або *ультрамікроскопією*, оснований на явищі розсіювання світла на малих частинках, розміри яких можна порівнювати з довжиною хвилі. Схема розташування приладів при ультрамікроскопії показана на рис. 4.5.

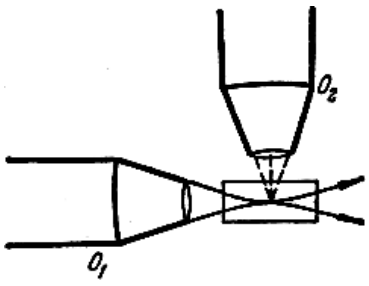


Рис. 4.5. Оптична схема ультрамікроскопії

Інтенсивний пучок світла концентрується за допомогою об'єктиву O_1 на камері, де можлива наявність ультрамікроскопічних частинок. При відсутності таких частинок світло від об'єктиву проходить у горизонтальному напрямку, не попадаючи в об'єктив O_2. Якщо ж на шляху променів присутні частинки, то світло розсіюється ними і попадає в об'єктив O_2. При цьому в полі зору мікроскопа спостерігається картина розсіяного, або дифрагованого світла, що дозволяє виявити наявність і переміщення частинок, але не дає точної інформації про їх форму і розміри. Розсіяння світла характерне для ультрамікроскопічних частинок. Для більш розмірних частинок характерна дифракція.

В ультрамікроскопії реалізовано принцип *темного поля*, який полягає в тому, що ми виключаємо з поля зору прямі промені оптичної системи і спостерігаємо лише розсіяні (дифраговані). На цьому принципі засноване застосування спеціальних конденсорів. В таких конденсорах освітлення препарату забезпечується таким чином, що інтенсивний пучок похило спрямованих променів безпосередньо в об'єктив не попадають. Центральні промені перекриваються непрозорою шторкою, а бокові зазнають повне внутрішнє відбивання і концентруються на об'єкті. Направлення бокових променів таке, що вони в об'єктив не попадають. Тільки промені, що зазнають розсіювання або дифракцію попадають в об'єктив мікроскопа. Якщо розміри частинки перевищують довжину

хвилі, то в об’єктив попадають одночасно дифракційні максимуми кількох порядків і формується повне зображення об’єкта.

Метод фазового контрасту. Описані вище методики можуть бути застосованими для спостереження мікрооб’єктів, що виділяються на всьому полі зору як наслідок своєї здатності інакше поглинати світло порівняно з оточуючим середовищем (абсорбційні структури). В біології часто виникають потреби спостерігати особливості так званих прозорих об’єктів, які виділяються від оточуючого середовища не поглинальною здатністю, а за показником заломлення (*рефракційні структури*). *Рефракційні структури вносять зміни в фази*, а не в амплітуди хвиль, а тому при звичайній (абсорбційній) мікроскопії їх неможливо контрастно спостерігати, оскільки приймачі випромінювання (в тому числі і око людини) реєструють інтенсивність світла (квадрат амплітуд), а не фази хвиль.

При освітленні рефракційних структур мікрообласті, де має місце відхилення показника заломлення від його значення для оточуючого середовища, стають центрами дифракції світла. Пояснимо різницю в фазах між прямим світлом (нульовий не дифракційний максимум) і дифрагованим світлом (світло дифракційних максимумів). Для цього уявимо об’єкт у вигляді однорідного прозорого середовища, окремі мікроскопічні ділянки якого, будучи також прозорими, дещо відрізняються за показником заломлення (рефракційна структура). Об’єкт освітлений за допомогою конденсора паралельним пучком світла. Якби різниці в показниках заломлення не було, то світловий потік проходив крізь препарат без відхилення, даючи не дифраговану хвилю P. В рефракційних структурах частина світла зазнає дифракції, тобто виникає відхилена (дифракційна) хвиля D, але більша частина (невідхилена хвиля S, що утворює спектр нульового порядку) пройде через об’єкт за первинним напрямком. При цьому хвиля S, зазнає порівняно з хвилею P, невеликого зміщення за фазою. Наприклад, запізнюється, якщо показник заломлення деякої мікрообласті більший, чим оточуючого середовища. Графік на рис. 4.6 показує цей невеликий зсув фаз між хвилями P і S. Різниця обох хвиль P і S являє

собою дифраговану хвилю D. Оскільки хвилі P і S близькі за амплітудою і мало відрізняються за фазою, то хвиля D буде мати невелику амплітуду і зміщена за фазою на $\pi/2$ по відношенню до S, а значить і до P.

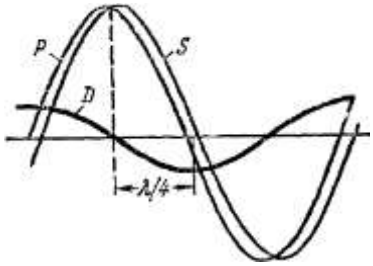


Рис. 4.6. Утворення дифрагованої хвилі D при спостереженні рефракційної структури

Змінивши фазу хвилі S на $\pm\pi/2$, ми складемо хвилі S і D так, щоб підсилити порівняно з хвилею P (фази S і D зрівнюються), або послабити порівняно з хвилею P (фази S і D протилежні). Таким чином одержимо контрастне зображення – світле або темне на оточуючому світловому полі.

Оскільки S і D сильно відрізняються за амплітудою (S>>D), то за допомогою фільтру слід ослабити інтенсивність S до рівня інтенсивності D. Тому платівка призначена для зміни фази хвилі S на $\pm\pi/2$ (*фазова платівка*), одночасно використовується і для відповідного ослаблення інтенсивності цієї хвилі. На рис. 4.7. показано оптичну схему пристрою фазового контрасту.

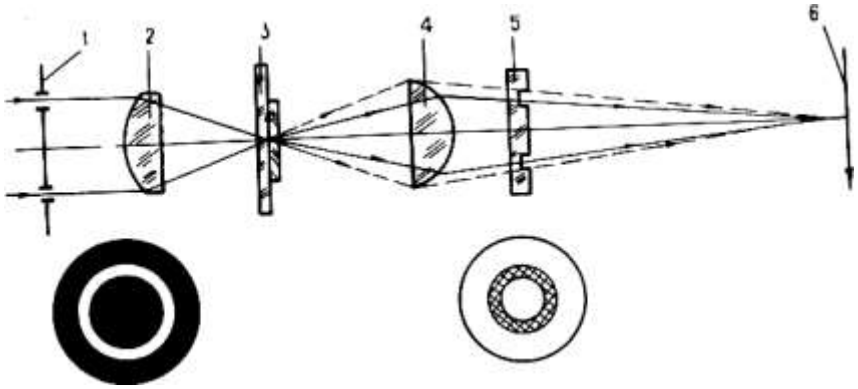


Рис. 4.7. Оптична схема пристрою фазо-вого контрасту [2]

Кільцева діафрагма 1 встановлюється замість звичайної ірисової діафрагми в передній фокальній площині конденсора 2. Світло проходить через препарат 3, попадає в об’єктив 4, у вихідній зіниці якого утворюється зображення кільцевої діафрагми 1. У вихідній зіниці фазового об’єктива розташована фазова платівка 5 с фазовим

кільцем. Фазове кільце являє собою витравлену на розраховану глибину і покриту тонким шаром алюмінію канавку (показана заштрихованою на рис. 4.7, внизу справа).

Фазове кільце повністю перекриває зображення кільцевої діафрагми конденсора (показана світлим кільцем на рис. 4.7, внизу зліва). Через фазове кільце проходить нульовий порядок дифракційного спектру (S – хвиля, показана суцільною лінією на рис. 4.7), який частково поглинається шаром алюмінію і зазнає зміни фази на 90^0. Світло, дифраговане препаратом (D-хвиля, показана на рис. 4.7. штриховою лінією), проходить мимо фазового кільця і не зазнає зміни фази.

За допомогою описаного фазового пристрою здійснюється позитивний фазовий контраст, за якого в площині зображення 6 ділянкам препарату з більшим показником заломлення відповідають більш темні області.

Дослідження в люмінесцентному світлі. Під мікроскопом у цьому випадку вивчається зелено-оранжево-жовте свічення об'єкта, яке виникає при освітленні спеціальними люмінесцентними освітлювачами, що дають синьо-фіолетове світло або УФ-випромінювання. При цьому збільшується гранична роздільна здатність мікроскопа і розширюються можливості мікроскопічних досліджень. Це відбувається внаслідок того, що елементи багатьох речовин (особливо органічні сполуки), поглинаючи УФ-випромінювання, випромінюють світло флуоресценції і стають видимими. Наприклад, клітини епідермісу насіння зазвичай мають синьо-блакитне свічення; механічні елементи кори – зеленувато-блакитне або ж зелене свічення; пилкові зерна квіток – жовте або голубувате свічення і т. ін.

Люмінесцентна мікроскопія застосовується у фармакогнозії для визначення автентичності лікарської рослинної сировини. Перевагою методу є можливість його застосування для вивчення сухого рослинного матеріалу, з якого готують товсті зрізи або препарати порошку і розглядають їх у падаючому світлі при освітленні

препаратів зверху, через опак-ілюмінатор або об'єктив.

Метод дослідження в поляризованому світлі. За допомогою аналізаторів і поляризаторів, включених в оптичну систему мікроскопа, вивчається зміна поляризації світла, що пройшло через препарат. Метод застосовується для вивчення анізотропних об'єктів, якими є деякі тканини і клітини тварин і рослин. Він особливо ефективний при проведенні аналізу органічних фармацевтичних препаратів і отрут і базується на комбінації двох методів: мікрокристалоскопічного і кристалооптичного. В основі застосування мікрокристалоскопічного методу лежить ідентифікація речовин за зовнішнім виглядом (форма, колір) і кристалооптичними константами кристалів – продуктів реакцій досліджуваної речовини з тим чи іншим реактивом. Мікроскопічний метод базується на використанні явища подвійного променезаломлення оптично анізотропних кристалів. Ознаками ідентифікації є морфологічні характеристики кристаликів – продуктів реакцій; форма, забарвлення, розмір, а також кристалооптичні константи: показники заломлення, знак подовження, кут згасання, плеохроїзм (зміна забарвлення кристала залежно від напрямку світлових коливань) та ін.

Контрольні питання та завдання

1. Розрахуйте, яким повинно бути збільшення об’єктиву мікроскопа, якщо збільшення окуляру рівне 5, для збільшення мікроскопа, рівного 200.
2. Вкажіть шляхи підвищення роздільної здатності оптичного мікроскопа.
3. Чому роздільна здатність електронного мікроскопа більша, ніж оптичного?
4. Для яких об’єктів використовується мікроскопія за методом світлого поля у прохідному світлі?
5. Який метод оптичної мікроскопії слід застосувати для виявлення мікрооб’єктів, розміри яких менші довжини хвилі оптичного випромінювання?

6. Поясніть різницю між абсорбційними і рефракційними об’єктами.
7. Яким чином здійснюється візуалізація рефракційних структур за методом фазового контрасту?
8. Вкажіть на особливості застосування люмінесцентної мікроскопії для аналізу мікрооб’єктів.
9. Для яких об’єктів застосовується мікроскопія з використанням поляризованого світла?
10. Яким чином забезпечується контрастування зображення при використанні поляризованого світла?

5. Спектральний аналіз в біомедичних дослідженнях

Спектральний аналіз *(спектроскопія)* – область фізики, що використовується для ідентифікації сполук, дослідження складу, будови і кількісного аналізу індивідуальних речовин та багатокомпонентних систем.

В органічній хімії або біохімії практично жоден експеримент не обходиться без застосування спектроскопічних методів. Вони широко використовуються для ідентифікації продуктів хімічних і ферментативних реакцій або складніших біологічних процесів, виявлення проміжних сполук (і тим самим для отримання цінної інформації про механізми перетворень), дослідження кінетики і стереохімії хімічних реакцій, просторової структури і динаміки молекул та надмолекулярних систем, з'ясування будови виділених природних сполук і т. ін.

Спектроскопія в оптичній області спектра (ультрафіолетова, видима, інфрачервона) використовується для визначення концентрації; ідентифікації речовини; визначення числа частинок у розчині.

5.1. Абсорбційна спектроскопія

Абсорбційна спектроскопія основується на дослідженні спектрів оптичного поглинання речовин. Існує кілька форм представлення спектрів поглинання. Проте, всі вони основуються на використанні закону Бугера-Ламберта-Бера:

$$I = I_0 e^{-\alpha d}, \quad (5.1)$$

де: I_0, I – інтенсивність світла що падає і проходить через досліджувану речовину; α – коефіцієнт поглинання, що є величиною оберненою відстані, на якій інтенсивність світла зменшується в e-разів; d – товщина кювети при дослідженні рідких зразків, або товщина поглинаючого шару при дослідженні твердих зразків.

В ряді випадків спостерігають відхилення від закону Бугера-Ламберта-Бера. Зокрема, такі відхилення мають місце, коли різні форми поглинаючих частинок знаходяться в рівновазі як, наприклад,

у випадку таутомерії або кислотно-лужної рівноваги у системах, що мають явно виражену тенденцію до асоціації або молекул розчиненої речовини між собою, або між молекулами розчиненої речовини і розчинника. Взаємодія розчиненої речовини з розчинником широко розповсюджена, і її сліди можна спостерігати чи не в кожному спектрі.

Величину $I / I_0 = \tau$ називають *коефіцієнтом пропускання*, а $D = \ln(I_0 / I)$ називають *оптичною густиною речовини*. Ці характеристики пов'язані простими співвідношеннями: $D = -\ln\tau = \alpha d$.

В біології, медицині та фармацевтичному аналізі частіше всього мають справу з розчинами. В такому разі коефіцієнт поглинання в (5.1) слід представляти у вигляді $\alpha = \varepsilon C$, де ε – молярний коефіцієнт поглинання – це оптична густина одномолярного розчину, вміщеного у кювету товщиною шару 1см; С – концентрація розчину у молях. За таких умов оптична густина розчинів, враховуючи (5.1), набуває вигляду:

$$D = \varepsilon C d \,. \quad (5.2)$$

Співвідношення (5.2) часто використовують для визначення концентрації речовини у розчинах шляхом вимірювання оптичної густини. Проте слід зауважити, що залежність оптичної густини від концентрації розчину є лінійною лише в обмеженому інтервалі концентрацій. В іншому разі, коли закон Бугера-Ламберта-Бера порушується, визначення концентрації речовини за вимірюванням оптичної густини розчину проводять шляхом побудови калібровочного графіку залежності *D(C),* користуючись розчинами відомої концентрації.

Абсорбційна спектроскопія використовує спектри поглинання у вигляді залежностей α, ε, τ, D від довжини хвилі або частоти.

Залежно від стану речовини спектри поділяються на лінійчаті (для газів при низькому тиску, що складаються з одноатомних молекул) та смугасті (для газів, парів, рідин, що складаються з багатоатомних молекул, твердих тіл). Якщо поглинач – тверде тіло (скло, пластмаси тощо), то області поглинання широкі і межа смуги

поглинання, як правило, широка. Для молекулярних рідин, розчинів і пари області поглинання спостерігаються у вигляді смуг, які несуть інформацію про будову досліджуваних речовин і їх концентрації. Зміни у спектрі дозволяють зробити висновки про процеси, які відбуваються у речовині.

Спектри поглинання речовин, що містяться в розчиннику, (наприклад, у водних розчинах) досліджуються методом відносних вимірювань. Суть методу полягає в тому, що проводяться вимірювання спектрів поглинання двох речовин: в одній кюветі знаходиться розчинник – еталон, а в другій – розчин досліджуваної речовини. При цьому відношення інтенсивності світла, що проходить через еталон (I_{em}), до інтенсивності світла, що проходить через розчин (I_p), дозволяє розрахувати спектр оптичної густини розчиненої речовини як залежність $D(\lambda) = \ln I_{em}(\lambda) / I_p(\lambda).$

В лабораторній діагностиці для вимірювання спектрів поглинання використовують спектрофотометри (рис. 5.1).

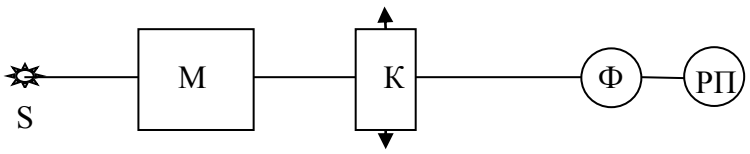


Рис. 5.1. Принципова схема спектрофотометра

Випромінювання джерела світла S проходить через монохроматор (М) і спрямовується на кювету, розташовану у кюветному відсіку (К). В кюветному відсіку розташовуються 4 кювети (одна – для розчинника-еталона, а три інші – для досліджуваних розчинів). Конструкція відсіку дозволяє здійснювати переміщення кювет відносно монохроматичного променя світла, що виходить з монохроматора. Світловий потік, що виходить з кювети, попадає на фотоелектричний перетворювач (Ф). Електричний сигнал з виходу перетворювача передається в реєструючий пристрій (РП) – вимірювальний прилад, або блок електронної системи обробки інформації.

Сучасні спектрофотометри дозволяють здійснювати якісний аналіз розчинів за наявністю характерних ліній поглинання. Крім того, вимірюючи оптичну густину розчинів відомої концентрації, здійснюють також кількісний аналіз речовин в досліджуваних розчинах.

При дослідженні лікарських органічних сполук важливе місце займає *молекулярний спектральний аналіз* (МСА). В його основі лежить якісне і кількісне порівняння спектра досліджуваного зразка зі спектрами індивідуальних речовин.

У спектрофотометричних методах дослідження використовують спектрофотометри – прилади, що дозволяють проводити аналіз як забарвлених, так і безбарвних сполук за вибірковим поглинанням монохроматичного випромінювання у видимій, ультрафіолетовій (УФ) та інфрачервоній (ІЧ) областях спектра.

Для збудження електронних переходів молекул необхідне видиме або ультрафіолетове випромінювання. Низькоенергетичне інфрачервоне випромінювання збуджує коливальні переходи в атомній підсистемі молекул, тоді як обертальні переходи, що мають місце при обертанні молекули як цілого, спостерігаються в нижчих енергетичних мікрохвильових і радіочастотних діапазонах.

Таким чином, природа смуг поглинання (молекулярних спектрів) в УФ- та видимій частинах спектра пов'язана з різними електронними переходами в поглинаючих молекулах та іонах (електронна спектроскопія). В ІЧ-області вона пов'язана з коливальними переходами в молекулах (коливальна спектроскопія). У МСА розрізняють також спектри комбінаційного розсіювання світла (КРС), а також спектри флуоресценції, про що буде сказано нижче.

Електронні спектри поглинання звичайно складаються з декількох широких смуг і не мають вузьких піків, оскільки будь-який електронний перехід супроводжується тими чи іншими змінами в обертальних або коливальних станах молекул. Найважливішою характеристикою смуг є довжина хвилі, при якій спостерігається максимум поглинання. Іноді, якщо сусідні смуги частково

перекриваються, вказують на положення мінімумів поглинання. Визначення положень екстремумів в спектрах поглинання дозволяє скласти паспорт фармацевтичної речовини.

Характер електронних спектрів поглинання молекул органічних речовин обумовлений трьома основними структурними елементами – зв'язуючими σ- і π-орбіталями, розпушуючими (антизв'язуючими) σ^*- і π^*-орбіталями, що характеризують збуджений стан, і незв'язуючими орбіталями неподілених пар електронів гетероатомів або *n*-орбіталями, які за визначенням не мають відповідного збудженого стану.

ІЧ-спектри поглинання органічних сполук дуже складні і не завжди піддаються однозначній інтерпретації. Враховуючи те, що вони несуть набагато більше інформації, ніж такі фізичні параметри речовини, як температура плавлення, показник заломлення або густина, роль ІЧ-спектроскопії в ідентифікації речовин та встановлення їх структури важко переоцінити. Важливою характеристикою спектрів, крім частот ліній поглинання, є також їх відносна інтенсивність, яку необхідно враховувати при аналізі спектра. Таким чином, ІЧ-спектр є свого роду паспортом органічної сполуки. Не завжди обов'язково мати зразок відомої сполуки для порівняння з невідомою, оскільки спектри досліджуваних речовин легко можна порівнювати з кривими поглинання наведених в атласах спектрів найбільш відомих сполук.

В якості інструментального методу аналізу ІЧ-спектроскопія використовується, в першу чергу, для виявлення певних функціональних груп у молекулі досліджуваної сполуки (-OH, - NH_2, -NO_2, =C=0, -C≡N та ін.), а також для ідентифікації сполук шляхом порівняння їх спектрів із спектрами автентичних зразків.

За допомогою кювет, виготовлених з хлориду натрію, можна реєструвати ІЧ-спектри газоподібних, рідких і твердих речовин. Лікарські препарати можуть вивчатися у формі паст, таблеток (у суміші з бромистим калієм), тонких шарів чистих рідин, твердих плівок (осаджених з розчинів при випаровуванні розчинника або

утворених шляхом охолодження з розплавів) та розбавлених розчинів у відповідних розчинниках. Тонкі таблетки і розчини дають найкращі результати. В інших випадках отриманню правильних результатів заважають такі ефекти, як розсіювання світла, міжмолекулярні взаємодії і зсув частоти, внаслідок відмінності в діелектричній проникності або поляризованості навколишнього середовища.

Спектроскопія комбінаційного розсіювання світла (КРС) та ІЧ-спектроскопія є ефективними методами дослідження будови молекул.

Спектри КРС дозволяють проводити якісний і кількісний молекулярний аналіз речовини, ідентифікувати сполуки і виявляти їх у сумішах, визначати молекулярні та атомні характеристики речовин їх пружні, релаксаційні та інші сталі. У ряді випадків ці спектри є єдиним джерелом інформації про заборонені переходи в молекулах. КРС-спектроскопія дозволяє розрізняти просторові ізомери молекул (кожен з яких має свій індивідуальний спектр), тобто дозволяє вирішувати тонке питання структурної хімії – відмінність цис- і транс-ізомерів. Обертальні спектри КРС дозволяють визначати довжини зв'язків та валентні кути в молекулах досліджуваних речовин. КР-спектри дають можливість оцінювати симетрію нормальних коливань, а також симетрію молекули в цілому та її структуру. На методі КР-спектроскопії базуються численні методи визначення параметрів макромолекул (наприклад, їх розмірів та маси), вивчення розмірів і форми дрібних частинок полімерних розчинів і т. ін.

Можливості методу КРС багато в чому повторюють можливості ІЧ-спектроскопії, розглянуті раніше, оскільки спектри КРС споріднені з ІЧ-спектрами. Однак, ці два типи спектрів мають різне походження і не дублюють один одного, оскільки визначаються різними правилами відбору переходів. Спільний розгляд КР-спектрів та ІЧ-спектроскопії дає набагато більше структурної інформації, ніж вивчення кожного спектра окремо.

Фізика КРС пов'язана з розділами коливань і хвиль, а також з квантовою теорією світла. Будь-яку молекулу можна уявити як

складний осцилятор, в якому відхилення атомів від положення рівноваги можна вважати зміщеннями вздовж зв'язку та зміною валентних кутів. Лінійні комбінації зміщень описують коливання молекули в цілому з частотами так званих нормальних коливань.

За допомогою спектра можна визначити сукупність частот нормальних коливань молекул. Для прикладних цілей велике значення має характеристичність багатьох частот коливань. Досвід показує, що в деяких нормальних коливаннях змінюється в основному одна з міжатомних відстаней або один валентний кут; водночас така частота мало змінюється в групі споріднених сполук, якщо тільки молекула містить цей зв'язок. Ця обставина і використовується в спектральному аналізі.

У рамках квантової теорії взаємодії випромінювання з речовиною одиничний акт розсіювання світла розглядається як поглинання частинкою речовини падаючого фотона (кванта світла) з енергією $h\nu$, а потім випромінюванням фотона з енергією $h\nu'$. Якщо енергія випроміненого фотона дорівнює енергії поглиненого (тобто при $\nu = \nu'$**),** розсіювання називають *пружним (релеєвським)*. Таке розсіювання буде когерентним з інтенсивністю $I \sim 1/\lambda^4$ (закон Релея). При розсіюванні світла молекулами поряд з релеєвськими (незміщеними) лініями в спектрі розсіювання з'являються лінії *непружного* розсіювання з частотами, відмінними від частоти падаючого випромінювання ($\nu \neq \nu'$). Причому частоти нових ліній в спектрі розсіювання є комбінаціями частоти падаючого світла і частот коливальних і обертальних переходів молекул, що розсіюють світло – звідси і походить назва "комбінаційне розсіювання світла". КРС найчастіше пов'язане з переходами між коливальними рівнями енергії молекули.

При поглинанні світла молекулами відбувається взаємодія електронів молекули з полем падаючої хвилі. Молекула, що перебуває в незбудженому стані, під дією кванта з енергією $h\nu$ через проміжний електронний стан, випускаючи квант $h(\nu - \nu_i)$, переходить у стан з коливальною енергією $h\nu_i$.

Цей процес зумовлює появу в розсіяному світлі так званої стоксової лінії з частотою ($\nu - \nu_i$). Якщо фотон потрапляє на вже збуджену молекулу, то одночасно з розсіюванням відбувається перехід молекули на нижчий енергетичний рівень. Цю "зайву" енергію забирає фотон, при цьому енергія випроміненого (розсіяного) фотона перевищує енергію поглиненого. Цей процес призводить до появи антистоксової лінії з частотою ($\nu + \nu_i$).

Таким чином, фотон з енергією $h\nu$ зникає і народжується фотон з енергією $h\nu_i$, а в спектрі розсіяного світла з'являються нові лінії, які супроводжують лінію основної частоти – *сателіти*. Червоні сателіти з'являються зі сторони менших частот ($\nu - \nu_i$), а фіолетові – зі сторони більших ($\nu + \nu_i$).

Якщо є ряд власних частот $\nu_1, \nu_2, \nu_3, \ldots$ коливань молекули, то в спектрі розсіяного світла повинні з'явитися всі комбінаційні частоти: $\nu \pm \nu_1$, $\nu \pm \nu_2$, $\nu \pm \nu_3$, ... Частоти розсіяного випромінювання залежать від частоти падаючого світла, але різниця між цими частотами є характеристикою речовини і не залежить від частоти збуджуючого випромінювання.

Зазвичай частоти в спектрі КРС відповідають частотам коливальних і коливально-обертальних рухів у молекулі (100-4000 $см^{-1}$), тобто лежать в ІЧ-діапазоні. Зіставлення спектрів ІЧ та КРС показує, що цілий ряд спектральних ліній збігається, тобто проявляються одні й ті самі частоти коливань речовини, тому спектри ІЧ та КРС доповнюють один одного. КРС має великі переваги в порівнянні з ІЧ-спектроскопією, оскільки перенесення вимірювання у видиму область призводить до спрощення вимірювальної апаратури. Частоти, які безпосередньо вимірювалися в ІЧ-спектрі, визначаються між основною і сателітними лініями приблизно з тією ж точністю.

До недоліків КР-спектроскопії слід віднести малу інтенсивність ліній, що залежить від частоти збуджуючого світла, а також наявність суцільного фону через розсіювання на неоднорідностях середовища і можливості флуоресценції досліджуваної речовини. Це призводить до підвищення вимог до можливостей реєстраційної апаратури.

За допомогою аналізу спектрів КРС досліджують тверді (у вигляді спресованих таблеток, суспензій і порошків, надається перевага крупнокристалічним) та газоподібні речовини, рідини і розчини.

Для спостереження спектрів КРС необхідно сконцентрувати інтенсивний пучок світла на досліджуваному об'єкті. Як джерело збуджуючого світла використовують ртутну лампу, а останнім часом – лазери. Розсіяне світло фокусується і реєструється фотографічним або фотоелектричним методом.

5.2. Люмінесцентна спектроскопія

Люмінесценція – це надлишкове над тепловим, спонтанне випромінювання світла з тривалістю післясвітіння, більшою періоду світлової хвилі.

В білках, наприклад, люмінесцентне світіння, як і оптичне поглинання, обумовлено хромофорами. Хромофори характеризуються наявністю певних ліній оптичного поглинання і випромінювання. Люмінесцентна спектроскопія основується на дослідженнях спектрів випромінювання. За розташуванням спостережуваних ліній випромінювання та їх яскравості здійснюють якісний і кількісний аналіз речовин.

Явищу люмінесценції передує збудження атомів (молекул) речовин. Після вимкнення джерела збудження люмінесценція продовжується протягом деякого проміжку часу, який залежить від природи речовини і змінюється в досить широких межах: від мільярдних часток секунди до кількох діб. За тривалістю "післясвітіння" люмінесценція поділяється на ***флуоресценцію*** (короткочасне "післясвітіння") і фосфоресценцію (тривале "післясвітіння"). Ці два види люмінесценції відрізняються не лише тривалістю світіння, але й механізмом випромінюванням квантів світла (переходами з різних енергетичних рівнів збудженої молекули). Речовини, що володіють здатністю до люмінесценції, називають *люмінофорами*.

Утворення електронно-збуджених молекул може бути не тільки

результатом поглинання квантів світла, але і наслідком хімічних реакцій, електричного розряду та ін. Залежно від джерела енергії при збудженні молекул можуть бути реалізовані різні види люмінесценції.

Люмінесценція, яка виникає в результаті освітлення речовини, носить назву *фотолюмінесценції*. Світіння, яке супроводжує хімічні реакції, називається *хемілюмінесценцією*. Світіння, яке випромінюють живі організми (світлячки, бактерії, деякі морські організми) внаслідок певних біохімічних реакцій, називають *біолюмінесценцією*. Відомі також явища електролюмінесценції, сонолюмінесценції, триболюмінесценції. У цих явищах фізичним чинником, який спричинює збудження молекул, є пропускання електричного струму, вплив ультразвуку, тертя поверхонь.

Є два основних механізми виникнення люмінесценції речовин, які спроможні її викликати (мономолекулярний і рекомбінаційний або бімолекулярний). ***Мономолекулярний механізм*** полягає в тому, що окремі молекули, атоми або йони речовини слабко взаємодіють між собою і тому при збудженні та випромінюванні поводять себе майже незалежно. При цьому всі процеси від моменту поглинання до випромінювання відбуваються в самих молекулах, атомах та йонах. Випромінювання таких речовин називають світінням дискретних центрів. Сюди належать, насамперед, гази і пари, молекули яких слабко взаємодіють між собою, а також рідини і розчини.

Рекомбінаційний (бімолекулярний) механізм світіння характеризується тим, що процес люмінесценції відбувається не в одній молекулі чи одному атомі або йоні, а в значному об'ємі речовини, наприклад, у цілому кристалі. У ньому відокремлюються позитивні і негативні заряди внаслідок збудження. А наступне їх з'єднання (рекомбінація) супроводжується світінням.

У незбудженому стані молекули з усіх можливих енергетичних рівнів знаходяться на найнижчому коливальному підрівні основного стану. В органічних молекулах, які володіють системою спряжених подвійних зв'язків, це є синглетний стан, при якому спіни електронів

на верхній заповненій орбіталі антипаралельні. Із основного стану молекула, поглинувши фотони відповідної енергії, може перейти на різні коливальні підрівні вищих електронних орбіталей.

Поглинання фотона відбувається за час порядку 10^{-15} с, а протягом наступних 10^{-12} с встановлюється теплова рівновага збудженої молекули з оточуючим середовищем. У стані рівноваги відносна заселеність підрівнів як у збудженому, так і в основному стані визначається рівнянням Больцмана

$$\frac{n}{n_0} = e^{-\Delta E/kT}, \quad (5.3)$$

де n_0, n – число молекул в основному та збудженому стані; ΔE – різниця енергій між рівнями; k – стала Больцмана; T – абсолютна температура.

В люмінесцентних молекулах збуджений (синглетний) стан відносно стабільний. У цьому стані електрон може знаходитись на орбіталі до 10^{-9}-10^{-8} с.

Головні характеристики різноманітних люмінесцентних речовин: вихід люмінесценції, закони затухання люмінесценції, спектри поглинання і випромінювання.

Енергетичний та квантовий вихід люмінесценції. Ступінь перетворення поглинутої енергії W_n в енергію люмінесценції $W_л$ характеризується енергетичним виходом люмінесценції:

$$\eta = \frac{W_л}{W_n}, \quad (5.4)$$

Енергетичний вихід люмінесценції зростає зі збільшенням довжини збуджуючої хвилі світла до певної межі, а досягнувши максимального значення, різко спадає до нуля.

Квантовим виходом люмінесценції називають відношення числа квантів, які випромінюються у вигляді люмінесценції $N_л$, до числа квантів, поглинутих речовиною N_n.

$$\eta_{кв} = \frac{N_л}{N_n}. \quad (5.5)$$

При фотолюмінесценції ця величина може приймати значення від 0

до 1. Енергетичний та квантовий вихід пов'язані між собою залежністю:

$$\eta = \frac{W_л}{W_п} = \frac{h\nu_л N_л}{h\nu_п N_п} = \eta_{кв} \frac{\nu_л}{\nu_п}. \quad (5.6)$$

Закони затухання люмінесценції. Інтенсивність затухання при *фосфоресценції* (I) змінюється з часом (t) за гіперболічним законом:

$$I = \frac{I_0}{(1+at)^n}, \quad (5.7)$$

де a, n –- константи; I_0 – інтенсивність фосфоресценції в момент припинення її збудження.

Для *флуоресценції* інтенсивність затухання зменшується за експоненціальним законом:

$$I = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}, \quad (5.8)$$

де I_0 – інтенсивність флуоресценції в момент припинення її збудження; τ – час збудженого стану; t – час затухання світіння.

Спектри люмінесценції. Під спектром люмінесценції (флуоресценції або фосфоресценції) розуміють залежність $I_л = f(\lambda)$ або $I_л = f(\nu)$, де $I_л$ – інтенсивність люмінесценції, виміряна при довжині хвилі λ або частоті ν.

Спектр люмінесценції залежить від природи речовини та виду люмінесценції. Спектр люмінесценції та його максимум зміщені в бік більших довжин хвиль відносно спектра поглинання. Ця залежність відома як *закон Стокса-Ломеля*, її можна пояснити на основі квантової теорії.

Оскільки енергія поглинутого кванта $h\nu_0$ частково переходить в інші види енергії, наприклад, у теплову, то енергія кванта люмінесценції $h\nu$ повинна бути менше $h\nu_0$. Отже, $\nu < \nu_0$, а $\lambda > \lambda_0$, де λ і λ_0 – довжини хвиль, що відповідають квантам, що випромінюються і поглинаються. В такому разі має місце так звана *стоксова люмінесценція*.

У випадку, коли квант поглинувся попередньо збудженою молекулою, може мати місце *антистоксова люмінесценція*, при якій $\lambda < \lambda_0$. В даному випадку енергія кванту люмінесценції включає не

тільки частину енергії, поглинутого квантом, але й енергію попереднього збудження молекули.

Проведення люмінесцентного аналізу. Прилади для проведення люмінесцентного аналізу називають *флуориметрами*. Принципова оптична схема флуориметра показана на рис. 5.2. Основними елементами флуориметра є: джерело світла, що збуджує люмінесценцію (S); фільтр ($Ф_1$), що виділяє зі спектру випромінювання джерела короткохвильове світло для збудження люмінесценції; запираючий фільтр ($Ф_2$), що перекриває доступ до монохроматору короткохвильового світла, але добре пропускає люмінесцентне випромінювання; кювета для досліджуваного розчину (К); монохроматор (М) або набір інтерференційних світлофільтрів; фотоелектричний перетворювач (Ф) і реєструючий пристрій (РП).

Джерелом світла слугує газорозрядна лампа, або лазерний світлодіод, що забезпечує потужне випромінювання в коротко-хвильовому діапазоні спектра. В якості фотоперетворювача використовують напівпровідникові діоди або фотоелектричні помножувачі. В сучасних флуориметрах реєструючий пристрій включає підсилювач електричного сигналу, спряжений з блоком обробки і зберігання інформації.

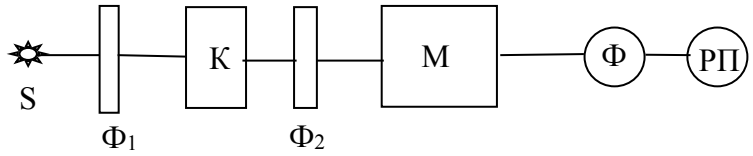


Рис.5.2. Принципова схема флуориметру

Спектральні дослідження люмінесценції часто доповнюються дослідженнями спектрів збудження. *Спектри збудження являють собою залежність інтенсивності люмінесцентного випромінювання від довжини хвилі, що збуджує світіння.* Схема для вимірювання спектрів збудження люмінесценції наведена на рис. 5.3.

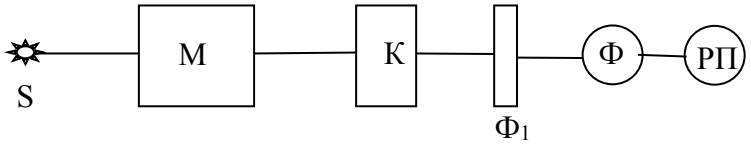


Рис. 5.3. Схема для вимірювання спектру збудження люмінесценції

Світло від джерела (S), що має неперервний спектр випромінювання, проходить через монохроматор (М), спрямовується на кювету (К) з досліджуваною речовиною. Фільтр ($Ф_1$) поглинає короткохвильове випромінювання джерела світла і пропускає більш довгохвильове люмінесцентне випромінювання, що далі спрямовується на фотоелектричний перетворювач (Ф). Залежність інтенсивності люмінесценції на різних довжинах хвиль збуджуючого світла вимірюється за допомогою реєструючого пристрою (РП).

Люмінесцентний аналіз. Оскільки люмінесцентне випромінювання володіє спектром, який є характерним для кожної речовини, то завдяки йому можна виявляти та досліджувати різноманітні об'єкти з допомогою люмінесцентної спектроскопії. Метод дослідження об'єктів, який полягає в спостереженні їх люмінесценції, називають люмінесцентним аналізом. Люмінесцентний аналіз дає можливість спостерігати як власне світіння досліджуваних об'єктів, так і світіння спеціальних люмінофорів, якими обробляють досліджуваний об'єкт. Розрізняють кількісний, якісний та сортовий люмінесцентний аналіз.

Кількісний люмінесцентний аналіз дає можливість визначати концентрації речовин у сумішах за інтенсивностями спектральних ліній. Він володіє високою чутливістю, яка сягає 10^{-10}г/см^3 при виявленні органічних речовин і використовується для контролю чистоти речовин. Використовується також ізотопний люмінесцентний аналіз, де за допомогою променю лазера збуджують люмінесценцію окремих ізотопів.

Якісний спектральний люмінесцентний аналіз дає змогу виявляти та ідентифікувати деякі речовини в сумішах. Даний метод полягає в тому, що за допомогою спектральних приладів вивчають розподіл енергії у спектрі люмінесценції речовин, а при відсутності люмінесцентних речовин їх виявлення проводиться за люмінесценцією продуктів взаємодії цих речовин з іншими люмінесцентними речовинами.

Сортовий люмінесцентний аналіз за характером люмінесценції

дозволяє розрізняти об'єкти, які видаються однаковими. Як приклад, уражена струмом тканина під дією УФ-випромінювання набуває яскравої люмінесценції зеленого кольору. Як правило, при сортовому люмінесцентному аналізі розглядається світіння досліджуваних об'єктів, які оброблені спеціальними речовинами.

Одним із методів люмінесцентного аналізу є ***люмінесцентна мікроскопія***, яка дає можливість спостерігати і фотографувати зображення об'єктів та вимірювати інтенсивність люмінесценції. Люмінесцентний аналіз знайшов широке застосування в різних галузях. В біології та мікробіології з допомогою люмінесценції можна спостерігати світіння окремих бактерій. В археології, опромінюючи ультрафіолетовим випромінюванням старовинні рукописи, можна читати на них стерті та зіпсовані місця. В палеонтології люмінесцентний аналіз дає можливість розглядати додаткові деталі відбитків доісторичних рослин та тварин, які включені в породу. Колір люмінесценції дозволяє відрізняти одні продукти від інших, виявляти фальсифікацію та домішки; в судовій експертизі – виявляти підробки документів, характер плям. Люмінесцентний аналіз порівняно з хімічним володіє рядом переваг:

- не вимагає значного впливу на досліджувану речовину, при якому міг би змінитися його склад, структура або агрегатний стан;
- дуже висока чутливість дозволяє виявляти мільярдні частки відсотка люмінесцентних домішок в різних середовищах, розчинах або сумішах;
- при люмінесцентному аналізі визначаються не хімічні елементи, з яких складається досліджувана речовина, а безпосередньо наявність тої чи іншої речовини, яка нас цікавить;

Одержання чіткого інтенсивного спектра флуоресценції, характерного для даної речовини, є головним завданням люмінесцентного аналізу.

5.3. Спектрометрія хімічних елементів

Спектрометрія являє собою метод виявлення і вимірювання концентрацій хімічних елементів в пробах.

Розрізняють *атомно-абсорбційний і атомно-емісійний спектральний аналіз*. Перший з них оснований на вимірюваннях спектрів поглинання атомів в пробах. При атомно-абсорбційному аналізі на фоні суцільного спектру джерела світла спостерігаються темні лінії поглинання хімічних елементів проби. Мала товщина спектральних ліній атомів домішок на яскравому фоні джерела світла суттєво обмежує поріг виявлення окремих елементів проби.

Такого недоліку позбавлені атомно-емісійні спектрометри. Принцип дії атомно-емісійного спектрометра оснований на вимірюванні спектрів випромінювання хімічних елементів. Таке випромінювання, як відомо, обумовлено переходами електронів зі збудженого в основний стан атома. В ранніх конструкціях атомно-емісійних спектрометрів використовувався самостійний розряд в парах проби, що аналізується. Проте, самостійний розряд в газовому середовищі є потужним джерелом суцільного фону, спектр якого займає весь робочий діапазон довжин хвиль. При збудженні проби в самостійному розряді на фотоприймач поступає випромінювання елемента, що аналізується, а також випромінювання суцільного фону газового розряду. При малих концентраціях досліджуваних елементів, флуктуації фону являються головним фактором, що встановлює межу виявлення елемента. Такі спектрометри мають межу виявлення елемента дещо нижчою порівняно з атомно-абсорбційним.

В новітніх атомно-емісійних спектрометрах використовується *несамостійний газовий розряд* в парах аналізованих речовин при відносно високому тиску парів в камері збудження. З урахуванням того, що енергія іонізації атомів гелію, що заповнюють вимірювальну камеру, складає біля 24 еВ, а енергія іонізації аналізованих елементів, як правило, не перевищує 11 еВ, підбирається така прискорювальна напруга в середовищі газового розряду, при якій відбувається ефективне збудження і навіть іонізація аналізованих атомів, але ще відсутня іонізація гелію, а значить, відсутній суцільний фон. В таких умовах виникає розряд тільки в парах аналізованої проби. Буферний

газ гелій участі в розряді не приймає, а завдяки значному тиску служить, в основному, для зменшення дифузії атомів проби. Завдяки можливості управління енергією електронів шляхом зміни величини прискорювальної напруги, виникає можливість селективного збудження окремих елементів проби, що мають відносно малу (порівняно з 24 еВ) енергію збудження. Мала величина (10 мкг) аналізованої проби в поєднанні з високою чутливістю спектрометра дають можливість визначення достатньо низьких концентрацій елементів в пробах. Зокрема, в атомно-емісійному спектрометрі СЭВ-30 межа виявлення атомів міді становить 0.1 мкг/дм^3.

В якості прикладу, розглянемо будову атомно-емісійного спектрометру СЭВ-30. Герметична вимірювальна камера забезпечена вікнами для спостереження і виводу випромінювання на монохроматор, а також люком для подачі проби. В вимірювальній камері розташовані дві спіралі з вольфраму. Одна з спіралей служить катодом-атомізатором, а друга – анодом. Камеру заповнюють гелієм до заданого тиску і проводять імпульсний нагрів катоду-атомізатора до температури 2000-3000 ^{0}C. Сухий залишок проби при цьому атомізується, і атомні пари утворюють хмаринку навколо катоду-атомізатора. Завдяки високому тиску гелію в камері, сповільнюється розсіювання цієї хмаринки і збільшується час перебування аналізованих атомів в зоні збудження. Одночасно з атомізацією проби відбувається емісія електронів з нагрітої спіралі катоду-атомізатора. В електричному полі між катодом-атомізатором і анодом електрони набувають енергію, необхідну для збудження або іонізації атомів аналізованих елементів. Оскільки енергія іонізації атомів гелію значно більша енергії іонізації атомів досліджуваних елементів, то оптична система спектрометра аналізує тільки випромінювання атомів аналізованих елементів.

Об’єктами дослідження в розглянутому спектрометрі можуть бути особливо чисті метали, сплави, вода, повітря, ґрунт, продукти, біологічні і медичні об’єкти. Управління приладом, обробка вимірювань та документування результатів здійснюється за

допомогою комп’ютера.

Контрольні питання та завдання

1. Вкажіть на причини, за яких має місце відхилення від закону Бугера-Ламберта-Бера.
2. Які методи дослідження застосовуються у випадку нелінійної залежності оптичної густини речовини від її концентрації?
3. Характеризуйте оптичні переходи в молекулах, що мають місце при УФ- та ІЧ-світлі, що поглинається речовиною.
4. Поясніть механізми утворення сателітів в спектрах комбінаційного розсіювання світла.
5. Поясніть відмінність механізмів мономолекулярної і рекомбінаційної люмінесценції.
6. Якими є закони затухання фосфоресценції і флуоресценції ?
7. Поясніть, чому час затухання при фосфоресценції значно перевищує час затухання при флуоресценції?
8. Характеризуйте основні методи флуоресцентного аналізу.
9. Наведіть приклади застосування флуоресцентного аналізу в фармації і біомедицині.
10. Поясніть відмінність методів атомно-абсорбційного і атомно-емісійного спектрального аналізу.

6. Поляриметричний аналіз оптично активних речовин

6.1. Фізичні основи поляриметрії

Поляриметрія – це метод дослідження, оснований на вимірюванні кута повороту площини поляризації плоско поляризованого світла при його поширенні в оптично активному середовищі. Площина, в якій розташовується вектор напруженості електричного поля електромагнітної хвилі та хвильовий вектор, що вказує напрям поширення хвилі, називається *площиною поляризації*. Якщо положення площини поляризації хвилі з часом не змінюється, то її називають *плоско поляризованою.*

При проходженні плоско поляризованої хвилі (світла) через деякі речовини, які називають *хіральними*, спостерігається поворот (обертання) площини поляризації. В фізичній оптиці такі речовини називають *оптично активними*. Більшість молекул органічних речовин є хіральними і, відповідно, проявляють властивості оптично активних речовин. Їх оптична активність обумовлена асиметричною будовою молекул, існуючих в двох формах – «правообертаючій» і «лівообертаючій». Право- і лівообертаючі молекули оптично активної речовини є *оптичними ізомерами*: вони являють собою дзеркальні відбитки одна одної. Фізичні і хімічні властивості чистих оптичних ізомерів абсолютно одинакові у відсутності будь-якого асиметричного агента, що впливає на дзеркальну симетрію молекул.

Обертання площини поляризації обумовлено особливістю явища подвійного променезаломлення в оптично активних речовинах. При поширенні світла в оптично активному середовищі утворюються дві хвилі, що мають праву і ліву циркулярну (колову) поляризацію, а не є лінійно поляризованими, як при звичайному подвійному променезаломленні. В таких хвилях кінець вектору напруженості електричного (магнітного) поля описує колову траєкторію в площині, перпендикулярній напряму поширення світла.

Обидві циркулярно поляризовані хвилі поширюються в однаковому напрямку, але з різною швидкістю. Знак кута повороту площини поляризації (β) залежить від співвідношення швидкостей ($\upsilon_л$

і $\upsilon_{пр}$) циркулярно поляризованих хвиль. При $\upsilon_{пр} > \upsilon_{л}$ оптично активна речовина називається правообертаючою, а при $\upsilon_{пр} < \upsilon_{л}$ – лівообертаючою. В першому випадку мається на увазі обертання площини поляризації за годинниковою стрілкою, в другому – проти.

Величина кута обертання залежить від природи і концентрації розчиненої ***речовини***, а також від природи розчинника. Тому поляриметрія в медико-біологічній та фармацевтичній практиці набула широкого застосування як для визначення концентрації речовин у розчинах, так і для встановлення їх достовірності.

Для розчинів кут обертання площини поляризації визначається за формулою Ж. Біо:

$$\beta = alC, \quad (6.1)$$

де a – питоме обертання, l – шлях, що проходить світло в оптично активному середовищі (довжина кювети), С – концентрація розчину.

Питоме обертання ***а*** *є характеристикою речовини*, а також має слабку залежність від довжини хвилі. Тому в поляриметрах, як правило, в якості джерела світла використовується натрієва лампа, що випромінює світло в області *D*-лінії спектру натрію (λ=589,3 нм).

6.2. Методика визначення кута обертання площини поляризації

Для вимірювання кута обертання площини поляризації оптично активними речовинами використовують *поляриметри*. У фармації їх називають *сахариметрами*. Шкали таких приладів калібрують у відсотках вмісту сахарів. В найпростішому варіанті поляриметр (рис. 6.1) містить джерело світла S (натрієва газорозрядна лампа),

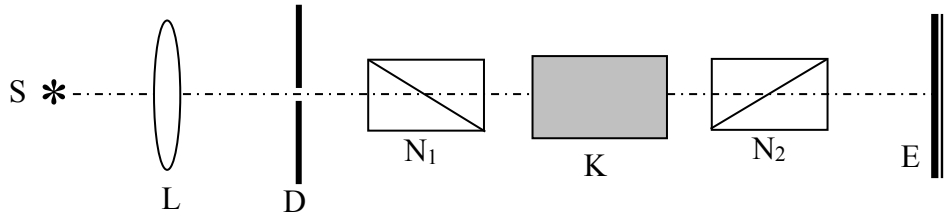


Рис. 6.1. Принципова оптична схема поляриметра

лінзу L, діафрагму D, два поляроїди: поляризатор N_1 і аналізатор N_2,

екран Е або окуляр для спостереження.

Між поляроїдами розташовується кювета К для розчину, що буде досліджуватись. У початковому положенні, коли кювета пуста, оптичні осі поляризатора і аналізатора схрещені, а тому, згідно з законом Малюса, світло не проходить через таку систему. При заповненні кювети досліджуваним розчином на виході оптичної системи спостерігається просвітлення. Це є наслідком обертання площини поляризації активною речовиною. При повороті аналізатора навколо світлового променю, як оптичної осі системи, можна досягти повного затемнення світла на екрані (як і до введення розчину в кювету). Це означає, що кут повороту аналізатора співпадає з кутом повороту площини поляризації досліджуваного розчину.

На практиці для підвищення точності вимірювань використовують оптичні схеми з *напівтіньовими поляризаторами*. Такі поляризатори складаються з двох поляроїдів з площинами поляризації P_1 і P_2, що складають між собою малий кут 2α (рис. 6.2).

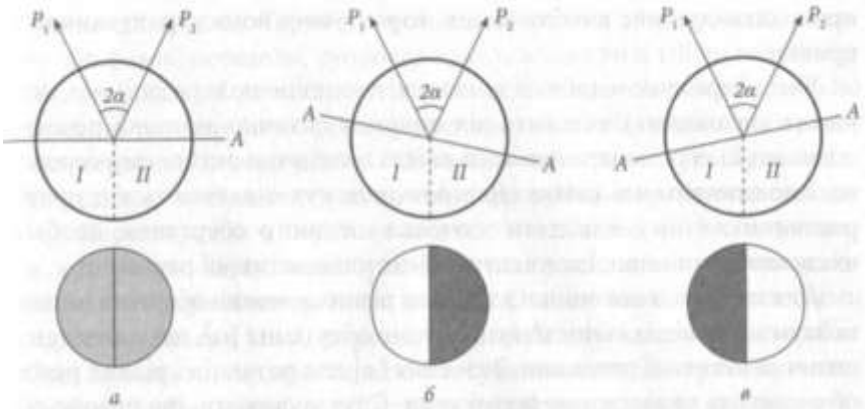


Рис. 6.2. Напівтіньові поляризатори: P_1 і P_2 - площини поляризації двох частин поляризатора; 2α - малий кут між ними [4]

Якщо площина поляризації аналізатора АА перпендикулярна бісектрисі кута 2α (рис. 6.2, *а*), обидві половини I і II поля зору мають однакову напівтіньову освітленість. При найменшому повороті аналізатора відносна освітленість I і II половин поля зору помітно міняється (рис. 6.2, б, *в)*.

В таких поляриметрах вимірювання зводяться до візуального вирівнювання освітленості двох половин поля зору і подальшого

зняття показників на шкалі кута обертання, що забезпечується ноніусом.

Якщо при поляриметрії вимірювання кута обертання поляризації проводиться з метою визначення концентрації речовини в розчині то з формули (1) одержимо

$$C = \frac{\beta}{al}. \quad (6.2)$$

Похибка визначення кута обертання в розглянутих поляриметрах складає ±0,02 град. Автоматичні поляриметри с фотоелектричною реєстрацією і використання лазерного випромінювання забезпечують точність вимірювання кута обертання до 10^{-7} град.

Контрольні питання та завдання

1. В чому полягає фізичний механізм обертання площини поляризації оптично активними речовинами?
2. Які речовини називають оптично активними?
3. Дайте означення поняттям «право- і лівообертаючі циркулярно поляризовані хвилі».
4. Як співвідносяться швидкості поширення право- і лівообертаючих циркулярно поляризованих хвиль в ізотропних і хіральних (оптично активних) речовинах?
5. Які фактори впливають на кут обертання площини поляризації?
6. Поясніть принципову оптичну схему поляриметру.
7. Чому в поляризаційних приладах переважно використовують напівтіньові поляризатори?
8. Поясніть методику визначення концентрації розчинів за обертанням площини поляризації.
9. Чому в поляриметричних дослідженнях важливо вказувати довжину світлової хвилі?

7. Рефрактометричний аналіз розчинів

7.1. Фізичні основи рефрактометрії

Рефрактометрія (от лат. *refractus* – заломлений) – метод аналізу, оснований на вимірюванні показника заломлення. *Заломлення* – зміна напряму прямолінійного поширення світла при переході з одного середовища в інше, що виникає з причини різної швидкості поширення світла в середовищах. Якщо промінь світла переходить з оптично менш густого середовища (з меншим показником заломлення) в оптично більш густе середовище (з більшим показником заломлення), то кут заломлення буде меншим кута падіння і навпаки.

Відношення синуса кута падіння променю до синусу кута заломлення дорівнює *відносному показнику заломлення*, що в офтальмології називають *індексом рефракції*. Індекс рефракції залежить від довжини хвилі. Така залежність називається дисперсією. Індекс рефракції можна розглядати як відношення швидкості світла у вакуумі до швидкості світла в досліджуваній речовині. В такому разі індекс рефракції є *абсолютним показником заломлення*.

На практиці визначають відносний показник заломлення (n_{21}), який є відношенням швидкості світла в повітрі (υ_1) до швидкості світла в досліджуваній речовині (υ_2). В такому випадку закон заломлення світла має вигляд:

$$\frac{\mathrm{Sin}\,\alpha}{\mathrm{Sin}\,\beta} = \frac{\upsilon_1}{\upsilon_2} = n_{21}, \quad (7.1)$$

де α, β – кути падіння і заломлення світла, відповідно.

При вимірювання показника заломлення слід враховувати наступні фактори, що впливають на його величину.

1. Природа речовин, а значить склад і будова молекул.

2. Температура: при її підвищенні показник заломлення зменшується з причини зменшення густини розчину, а при її зниженні – збільшується. Рекомендована температура для вимірювання ***n*** встановлена на рівні 20 ± 0,3 °С. Якщо ж вимірювання

показника заломлення проводяться при іншій температурі, то вноситься поправка:

$$n' = n^{20} + (20 - t) \cdot 0{,}0002, \quad (7.2)$$

де t – робоча температура в ^{0}C;

3. Довжина хвилі світлового потоку. В сучасних приладах вимірювання показника заломлення проводяться на довжині хвилі *D*-лінії спектру натрію (λ = 589,3 нм). Показник заломлення, виміряний при 20 °C і такій довжині хвилі, позначається індексом n_D^{20}.

4. Концентрація речовини (С) в розчині.

5. Природа розчинника.

Для рефрактометрії розчинів в широких діапазонах концентрацій користуються таблицями (графіками), наприклад, рис. 7.1, або емпіричними формулами. Рефракційні таблиці найбільш важливих (поширених на практиці) розчинів затверджуються міжнародними погодженнями і покладені в основу побудови шкал спеціалізованих рефрактометрів.

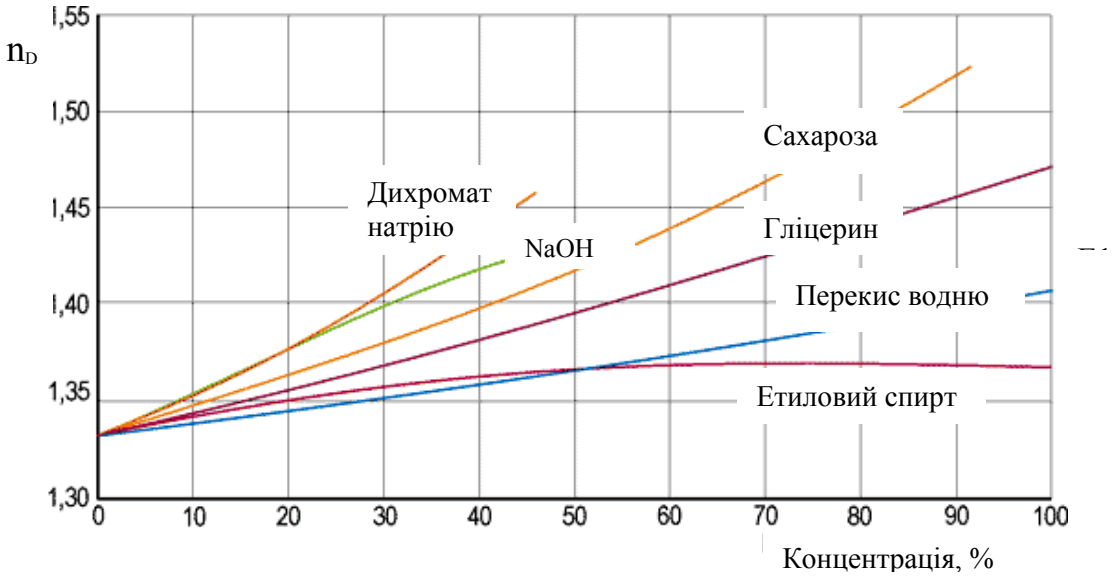


Рис. 7.1. Залежність показника заломлення для водних розчинів деяких речовин від концентрації [13]

Вплив температури на показник заломлення визначається двома основними факторами: зміною густини рідини і залежністю поляризуємості молекул від температури. Другий фактор стає суттєвим лише при високих температурах, а тому практично температурний коефіцієнт показника заломлення є пропорційним температурному коефіцієнту густини рідини. Для більшості рідин температурний коефіцієнт густини лежить в межах від – 0,0004 до – 0,0006 1/град. Важливим винятком є вода (–0,0001), і розбавлені водні розчини, наприклад, для гліцерину (–0,0002). Лінійна екстраполяція залежності показника заломлення від температури допустима лише в невеликих інтервалах температур (10 – 20°С). Точний розрахунок показника заломлення в широких температурних інтервалах проводиться за емпіричними формулами.

Зазвичай показник заломлення рідких і твердих тіл визначають за допомогою рефрактометрів з точністю 0,0001.

7.2. Методика рефрактометрії

Основними методами, що використовуються в рефрактометрії є:

- методи прямого вимірювання кутів заломлення світла при проходженні ним межі поділу двох середовищ;
- методи, що основуються на явищі повного внутрішнього відбивання світла (ПВВ);
- інтерференційні методи.

Розрахунок показника заломлення речовин методом прямого вимірювання кутів падіння і відбивання світла здійснюється за формулою (7.1). Більш зручним є метод розрахунку показника заломлення за виміряним кутом виходу β. Для цього досліджувану рідину наливають у тонкостінну призматичну кювету або призматичну виїмку в матеріалі з відомим показником заломлення n_0 (рис. 7.2).

При $\alpha = 90^0$ і $\gamma_1 = \gamma_2 = 45^0$ величина показника заломлення досліджуваної рідини n розраховується через виміряний кут виходу β за формулою:

$$n = \sqrt{n_0^2 + \sin\beta\sqrt{n_0^2 - \sin^2\beta}}. \quad (7.3)$$

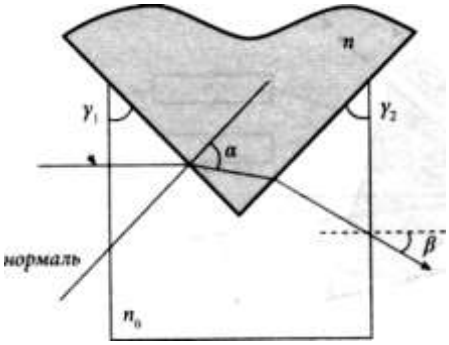


Рис. 7.2. Хід променю при розрахунку показника заломлення за виміряним кутом виходу

Метод що використовує явище повного внутрішнього відбивання.

При використанні для вимірювання показника заломлення явища ПВВ досліджувана рідина (чи тонкий твердий зразок) приводиться в оптичний контакт з еталонною призмою, що має досить великий відомий коефіцієнт заломлення n_0. На рис. 7.3 показано хід променів при заломленні на межі поділу речовина-призма, а потім на межі поділу призма-повітря при повному внутрішньому відбиванні.

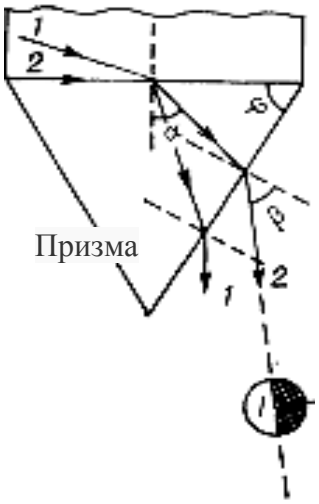


Рис. 7.3. Хід променів у схемі рефрактометрії, що ґрунтується на повному внутрішньому відбиванні

Промені (1 і 2), що падають на призму через досліджувану рідину під різними кутами, після заломлення залишаються всередині граничного кута заломлення α, що обмежений променем 2, для якого кут падіння рівний 90°. На виході з призми утворюється різка границя між світлою областю (I) і тінню (II), що спостерігається в зорову трубу.

За такою межею світла і тіні у рефрактометричній схемі визначається кут повного відбивання, що зв’язаний з відносним показником заломлення співвідношенням

$$\sin \alpha_{ПВВ} = n\,. \quad (7.4)$$

Користуючись графіком залежності показника заломлення від концентрації речовини в певних розчинниках, рефрактометрія вирішує обернену задачу: *визначення концентрації розчинів за вимірюванням відносних показників заломлення.*

Сучасні прилади дозволяють застосовувати освітлення рефрактометра білим світлом завдяки вбудованому компенсатору, відрегульованому таким чином, щоб відлік показника заломлення здійснювався для жовтої *D*-лінії натрію.

Серед рефрактометричних приладів, що використовуються в наукових дослідженнях, чільне місце займають рефрактометри Аббе. Проте, для практичних застосувань в фармації та медико-біологічних дослідженнях більш простими, компактними і дешевими є ручні рефрактометри, що спеціалізовані для певних речовин (розчини сахарів, масел і т. ін.)

Схема ручного рефрактометра показана на рис. 7.4. Основним оптичним елементом рефрактометра являється головна призма, на яку наноситься досліджувана речовина.

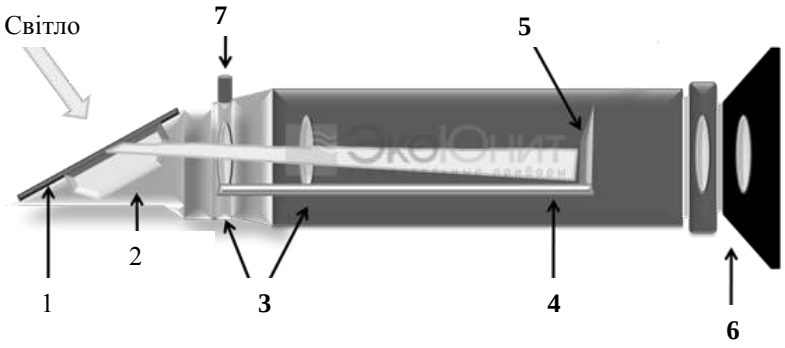


Рис. 7.4. Схема ручного рефрактометра

Тонкий шар рідини утворюється між покривним склом (1) і верхньою площиною головної призми (2). Головна призма виготовлена з матеріалу з високим показником заломлення. Завдяки цьому, світло, що падає, після проходження через досліджувану

речовину і призму заломлюється під достатньо великим кутом. Далі через систему лінз (3) світло попадає на калібровану шкалу рефрактометра (5), яка розглядається в окулярі (6). Для внесення поправки в калібровку приладу використовується гвинт (7).

Калібровка шкали приладу може бути проведена або в величинах відносного показника заломлення, або в значеннях концентрації речовини в певному розчині (наприклад, вмісту цукру у водному розчині). В залежності від кута заломлення межа світла і тіні може бути вище або нижче на шкалі приладу.

Розглянутий ручний рефрактометр враховує вплив температури за допомогою функції автоматичної компенсації температури. Всередині корпусу знаходиться біметалева пластина (4), що скорочується, або подовжується в залежності від зміни температури. Біметалева пластина з'єднана з оптичною системою рефрактометру, що забезпечує плавне переміщення її при зміні температури. Таким чином, вплив зміни температури на коефіцієнт заломлення речовини повністю компенсується.

Інтерференційні рефрактометри. Цей метод рефрактометрії оснований на використанні явища інтерференції світла. Висока точність методу дозволяє не тільки визначати показник заломлення речовини, а й реєструвати надзвичайно малі зміни цієї величини при зміні температури, тиску, протіканні реакцій і т. ін. Принципова схема інтерферометра, що використовується для вимірювання відносної величини показника заломлення, показана на рис. 7.5.

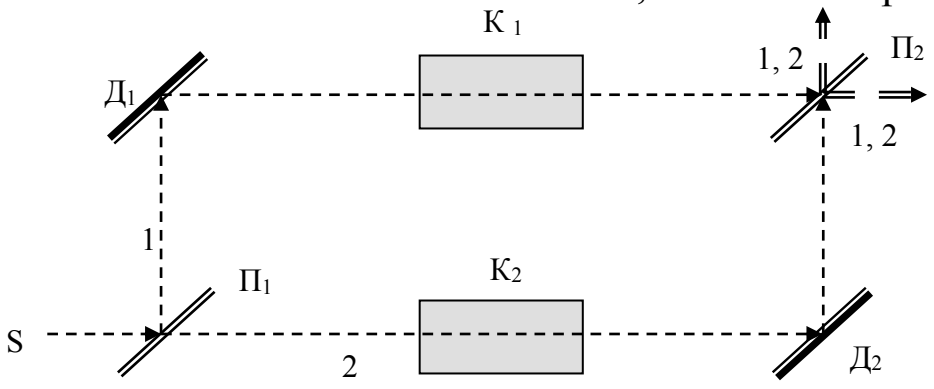


Рис. 7.5. Оптична схема інтерференційного рефрактометра[2]

Світловий промінь від когерентного джерела світла S поділяється

напівпрозорою платівкою $П_1$ на два промені (1, 2). Відбитий від дзеркала $Д_1$ промінь 1 проходить через кювету $К_1$. Промінь 2 проходить через кювету $К_2$, відбивається від дзеркала $Д_2$ і суміщається в платівці $П_2$ з променем 1. Результат інтерференції спостерігається за допомогою окуляру в одному з напрямів 1, 2.

Два пучки світлових променів при проходженні через кювети однакової довжини L, заповнені речовинами з різним показником заломлення, набувають різниці ходу, що визначається різницею показників заломлення речовин, що знаходяться в кюветах (наприклад, розчин і розчинник). Різницю показників заломлення визначають за кількістю порядків інтерференційної картини:

$$\Delta n = n_1 - n_2 = \frac{m\lambda}{L}, \quad (7.5)$$

де m – порядок інтерференції, λ – довжина хвилі.

Якщо ж в кюветі 1 змінюється, наприклад, температура то це викликає зміщення інтерференційної картини на певну кількість порядків. За величиною зміщення інтерференційної картини визначають зміну показника заломлення за наступною формулою:

$$n_x = n_0 + \frac{m\lambda}{L}, \quad (7.7)$$

де n_0, n_x – показники заломлення речовини при початковій і поточній температурі, відповідно; L – довжина кювет, m – зміщення інтерференційної картини, виражене в кількості інтерференційних смуг.

Інтерференційні рефрактометри використовують при вимірюванні показників заломлення газів та розведених рідин, або при визначенні малих змін величини n при протіканні динамічних процесів.

Контрольні питання та завдання

1. Які фізичні процеси використовуються в рефрактометрії?
2. Які фактори впливають на величину показника заломлення?
3. Поясніть механізми температурної залежності показника

заломлення.

4. Порівняйте різні методики рефрактометрії для аналізу прозорих речовин?
5. Як враховується зміна температури в автоматичних рефрактометрах?
6. Поясніть принцип дії інтерференційного рефрактометру.
7. Розрахуйте, наскільки зміниться показник заломлення повітря (Δn), якщо інтерференційний рефрактометр показує 10 інтерференційних смуг. Довжина кювети 10см, $\Lambda = 0{,}6$ мкм.

III. ЛАЗЕРИ В БІОЛОГІЇ І МЕДИЦИНІ

8. Особливості практичного застосування лазерного випромінювання

8.1. Властивості лазерного випромінювання

Перш ніж обговорювати особливості взаємодії лазерного випромінювання з біологічними об'єктами та нові можливості, що відкриваються в біології і медицини, розглянемо властивості лазерного випромінювання та їх принципові відмінності щодо випромінювання некогерентних джерел світла (ламп розжарювання, газорозрядних ламп, природного випромінювання сонця).

Монохроматичність і висока спектральна густина потоку енергії лазерного випромінювання забезпечують:

- проведення спектрального аналізу з розділенням, що на багато порядків перевищує роздільну здатність традиційних спектральних приладів;
- високу ступінь селективності збудження певного сорту молекул або їх частин (наприклад, хромофорів);
- можливість реалізувати інтерферометричні та голографічні методи діагностики.

Висока монохроматичність визначає значну спектральну густину потоку енергії випромінювання. Наприклад, для лазера з вихідною потужністю $P = 1$ Вт, шириною лазерної лінії $\Delta\nu = 1$ МГц, радіусом пучка $r = 2$ мм на довжині хвилі $\lambda = 500$ нм спектральна густина потоку енергії рівна $2{,}6 \cdot 10^7$ Вт/(нм·см^2). Для порівняння, аналогічна величина для сонячного випромінювання $1{,}3 \cdot 10^{-4}$ Вт/(нм·см^2).

Просторова когерентність. Лазери, як правило, випромінюють просторово-когерентні *гаусові пучки*. Таке випромінювання дає можливість одержати світлові пучки з високим ступенем їх направленості (колімування) і дозволяє фокусувати їх на об'єкті розмірами клітини. Це потрібно для дистанційного аналізу досліджуваних об'єктів, забезпечення локальності досліджень (наприклад, при внутрішньоклітинній хірургії) і ефективного

транспорту випромінювання оптичними волокнами світловодів. Такі можливості досліджень теплові джерела світла забезпечити не можуть.

Для більшості лазерів *розбіжність світлового променю* складає кілька тисячних радіана. Такий пучок можна сфокусувати до розмірів порядку десятих часток довжини хвилі. Ці властивості лежать в основі лазерної мікроскопії.

Лазери з поляризованим випромінюванням характеризуються **високим ступенем поляризації.** В залежності від конструкції резонатора, лазери можуть давати лінійно, циркулярно або еліптично поляризоване випромінювання.

Наприклад, резонатори з брюстерівськими віконцями газорозрядної трубки, або внутрішніми призмами, мають сталу лінійну поляризацію. Для He-Ne-лазерів червоного випромінювання ступінь лінійної поляризації (це відношення інтенсивності світла при взаємно ортогональних положеннях аналізатора) складає 500:1.

Передача лазерного випромінювання по волоконним світловодам круглого перерізу призводить до деполяризації випромінювання внаслідок збудження багатьох хвилеводних мод. В залежності від типу світловоду довжина, на якій виникає повна деполяризація випромінювання, змінюється від кількох десятків сантиметрів до кількох метрів. Порівняно широкі медичні світловоди з діаметром серцевини 400-1000 мкм мають малу довжину деполяризації (кілька десятків сантиметрів). Одномодові анізотропні світловоди з еліптичним перерізом серцевини і поперечним розміром порядку 5-7 мкм зберігають стан поляризації на відстанях кілька сотень метрів.

Надзвичайно висока інтенсивність лазерного випромінювання дозволяє сконцентрувати в малому об’ємі значну світлову енергію і, тим самим, викликати **багатофотонні та інші нелінійні процеси в біологічних тканинах**, **локальний тепловий нагрів, швидке випаровування, гідродинамічний вибух і т. ін.**

Характерною властивістю лазерів і лазерного випромінювання є можливість одержання **імпульсів пікосекундної і субпікосекундної**

тривалості. У видимій області одержані лазерні імпульси фемтосекундного діапазону (до 8 фс). Це дає можливість вивчати швидкі первинні фотобіологічні процеси в біології прямими методами, а також багатоступінчато збуджувати високі енергетичні стани молекул за час, значно менший часу релаксації якого завгодно проміжного стану. Для вивчення більшості швидких фотопроцесів в біології достатньо імпульсів тривалістю в кілька пікосекунд, проте, для вивчення ультрашвидких стадій перетворення енергії деякими біомолекулами необхідні субпікосекундні джерела (порядку 100 фс).

Здатність до перебудови довжини хвилі лазерного випромінювання в сукупності з високою монохроматичністю дозволяє використовувати лазери в якості спектрометрів з ультрависокою роздільною здатністю. Наявність лазерів на барвниках, що забезпечують перебудову довжини хвилі випромінювання від УФ- до ІЧ-області спектру, дозволяє селективно збуджувати практично будь-які стани біомолекул та їх окремих фрагментів.

Лазерне випромінювання, відбиваючись від шорсткої поверхні, формує так звану **спекл-картину**. Розсіяне такою поверхнею світло створює хаотично розподілені темні і світлі плями (спекли). Оскільки біологічні об’єкти в більшості мають шорстку поверхню, то вони завжди можуть формувати спекл-картину. Така картина несе інформацію про властивості поверхні об’єкта, що може використовуватись в діагностиці поверхневого стану тканин.

8.2. Особливості взаємодії оптичного випромінювання з біологічними об’єктами

Застосування оптичного випромінювання в біології і медицині засновано на використанні широкого кола явищ, пов’язаних з різноманітними проявами взаємодії світла з біологічними об’єктами. Оптичне випромінювання може поглинатись, відбиватись, розсіюватись, збуджувати люмінесценцію біологічного середовища, викликати фотобіохімічні реакції і, в кінцевому рахунку, викликати фізіологічний акт.

Прикладами дії низько інтенсивного світлового випромінювання можуть бути фотосинтез рослин і бактерій, а також механізм зору. Високо інтенсивне світлове випромінювання УФ-, видимого і ІЧ-діапазонів викликає руйнівну (деструктивну) дію на біологічні об’єкти.

Будь-який фітобіологічний процес можна представити наступною схемою (рис. 8.1): *поглинання квантів → фотохімічні реакції → хімічні і біохімічні реакції → фізіологічний акт.*

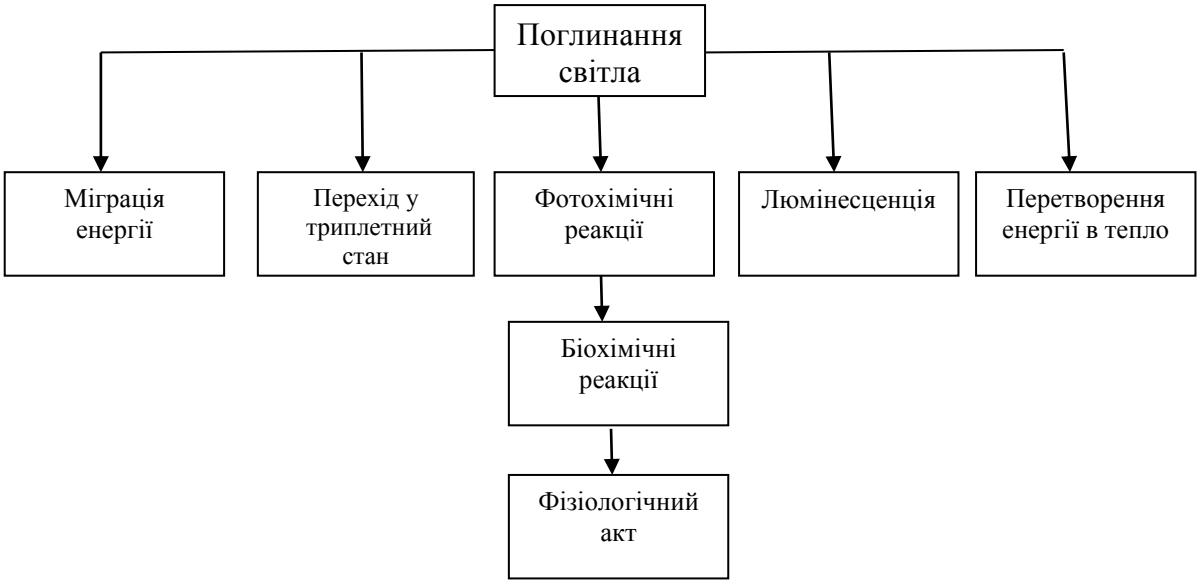


Рис. 8.1. Загальна схема стадій фотобіологічних процесів [7]

Як приклад фізіологічних актів можна назвати: виділення кисню при фотосинтезі, рух листочків рослин назустріч сонцю, реакція тварин на світло, летальність організму при сильному опроміненні і т. д. Наведений шлях фітобіологічного процесу не є єдиним. Енергія збудженої молекули може витрачатися ще по кількох напрямах, а саме: висвічуватися (люмінесценція), переходити в тепло, передаватись іншій молекулі (міграція енергії), молекула може переходити в триплетний стан. Після міграції енергії або переходу молекули в триплетний стан знову можуть відбутися подальші фотохімічні перетворення.

Ступінь гомеостазу живого об’єкту. Оскільки ми маємо справу з живим об’єктом, то крім фізико-хімічних проявів дії оптичного

випромінювання необхідно також враховувати його вплив на функціонування живої матерії. Цей вплив визначається ступенем гомеостазу живого об'єкту. *Ступінь гомеостазу характеризує стан і процеси, що забезпечують стійкість організму до зовнішніх впливів.* Ступінь гомеостазу є функцією еволюційного розвитку і виявляється самою низькою у біологічних молекул і самою високою у хребетних тварин. Світло малої інтенсивності не запускає адаптаційні механізми біосистеми. Це є рівень *взаємодій, що не збурюють живий організм*. Таке випромінювання використовується в *лазерній діагностиці* в біології і медицині.

При підвищенні інтенсивності світла спочатку зачіпається гомеостаз живої системи на локальному рівні, вмикаються загальні адаптаційні і регуляційні механізми живої системи, що призводить до повного її відновлення. Це область світлового випромінювання, що використовується для управління ходом біохімічних процесів в *лазерній терапії*.

При подальшому підвищенні інтенсивності світла відбуваються незворотні процеси, які наростають і призводять до руйнувань в системі. При помірних інтенсивностях світла об'єкт ще можна рахувати «живим», а при високих інтенсивностях відбувається руйнування тканин і об'єкт не може вважатись «живим». Світлове випромінювання високої інтенсивності використовується в *лазерній хірургії* молекул, клітин, тканин і органів.

Тривалість опромінення значною мірою визначає характер взаємодії світла з біологічними об'єктами. В залежності від тривалості світлового опромінення ступінь гомеостазу може бути різною.

В залежності від енергії в імпульсі, спектральної густини випромінювання, довжини хвилі порогова тривалість опромінення, за якої починають виникати морфологічні зміни, може бути різною для одного і того ж об'єкту. При цьому в залежності від періодичності світлових імпульсів можливі резонансні явища, оскільки період коливань фотовідзиву біологічних систем змінюється в межах від

10^{-3} до 10^{3} с.

Результати дії лазерного випромінювання на живий організм визначаються також фізичними властивостями окремих тканин організму (відбиваючої і поглинаючої здатності, теплоємності, теплопровідності, теплотою пароутворення, акустичними і механічними властивостями).

Поглинання оптичного випромінювання. У відповідності з загальними принципами фотобіології дія світла, в тому числі і лазерного випромінювання, повинна проявлятися тільки при наявності в клітинах відповідних молекул – *хромофорів*, *здатних поглинати світло певних довжин хвиль*. А тому важливою характеристикою біологічної системи є спектр поглинання, що узагальнює спектри поглинання молекул різних речовин, що входять в систему. Кожна з цих речовин, що утворюють біологічну систему, ферменти, гормони, вітаміни, пігменти і ін. – мають свій характерний спектр поглинання. Наприклад, у білків хромофорами є різні залишки амінокислот, що поглинають в УФ-області (λ = 0,20-0,40 мкм), нуклеїнові кислоти також поглинають в цій же області. Поглинання видимого випромінювання обумовлено такими біомолекулами як гемоглобін, хлорофіл, флавіни та ін. У зв'язку з цим, розглянемо поглинання світла наповненою кров'ю м'язовою тканиною (рис. 8.2).

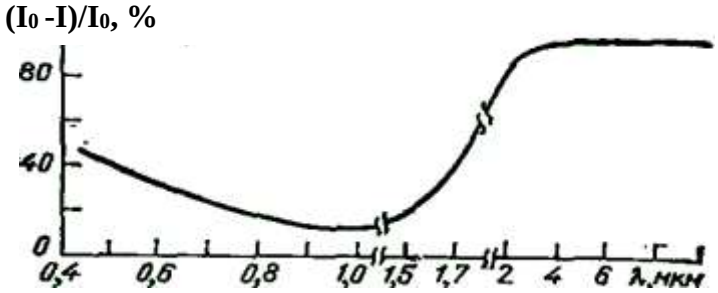


Рис. 8.2. Залежність частки світлового потоку, поглиненого наповненою кров'ю м'язовою тканиною товщиною 1 мм, від довжини хвилі [8]

Частка світлового потоку, поглиненого тканиною, оцінюється як відношення різниці інтенсивності світла, що падає (I_o), і світла, що виходить (I_o - I), до інтенсивності світла, що падає. Поглинання світла в УФ-діапазоні виникає за рахунок білків, що містяться в тканині. В

інтервалі довжин хвиль 0.45-0.50 мкм поглинання визначається гемоглобіном крові. Світло з довжиною хвилі 0.6-1.5 мкм відносно слабо поглинається і досить глибоко проникає в тканину. Втрати світлового випромінювання в цій області спектру значною мірою обумовлені процесами розсіювання на неоднорідностях тканин. Зростання світлових втрат на довжинах хвиль понад 1.5 мкм в основному зумовлено поглинанням молекулами води.

Відстань, на якій світлове випромінювання викликає біофізичну дію на живу тканину, називають *глибиною проникнення випромінювання.* Глибина проникнення лазерного випромінювання в біологічну тканину головним чином залежить від довжини хвилі, густини потоку випромінювання і властивостей біотканини. Глибину проникнення випромінювання змінюють шляхом відповідної зміни густини потоку енергії (потужності) випромінювання. Разом з тим, для запобігання ушкодження приповерхневого шару тканини потужним випромінюванням, в терапії використовують не неперервне, а імпульсне випромінювання. Таким чином, вибором потужності випромінювання і частоти проходження імпульсів можна досягти максимальної глибини проникнення випромінювання за даної довжини хвилі. Наприклад, лазерне випромінювання на довжині хвилі 1,06 мкм проникає в тканину на глибину 1 см. В області 4-6 мкм глибина проникнення зменшується за рахунок сильного поглинання молекулами води і становить 100-150 мкм. Як видно з рис. 8.2, найбільша глибина проникнення характерна для ІЧ-випромінювання в області 0.8-1.7 мкм. Для досягнення терапевтичної дози на глибині до 10 см застосовують лазерні джерела ІЧ-випромінювання потужністю в імпульсі 1-10 Вт і тривалістю 50-200 нс.

При розрахунку терапевтичної дози враховується, що не все випромінювання, що спрямовується на біологічну тканину, засвоюється (тобто поглинається) нею. Взаємодія лазерного випромінювання з біологічним об’єктом супроводжується супутніми оптичними ефектами: відбиванням (5-60 %), розсіюванням (5-35 %), поглинанням (20-60 %). При цьому терапевтичну дію викликає тільки

поглинання випромінювання.

8.3. Біофізичний механізм дії лазерного випромінювання на біологічні тканини

При розгляді питання про біологічну дію лазерного випромінювання слід виділити вплив низькоенергетичного та високоенергетичного випромінювання.

Дія низькоенергетичного випромінювання. У механізмі біологічної дії низькоенергетичного лазерного випромінювання виділяють декілька послідовних процесів.

1. ***Фізичні процеси*** мають місце при поглинанні енергії лазерного випромінювання біологічним об'єктом. У цій фазі всі процеси підпорядковуються фізичним законам, і на атомно-молекулярному рівні відбуваються такі реакції:

- поглинання світла лазерного випромінювання тканинними фоторецепторами;
- виникнення внутрішнього фотоефекту і його прояви (фотопровідність, фото - е. р. с.);
- електролітична дисоціація йонів (руйнування слабких міжмолекулярних зв'язків);
- електронне збудження атомів і молекул, на які подіяло лазерне випромінювання;
- міграція енергії електронного збудження;
- первинний фотофізичний акт; поява первинних фотопродуктів.

2. ***На клітинному рівні*** основними процесами вважають:

- зміну енергетичної активності клітинних мембран;
- активацію ядерного апарата клітин і системи ДНК-РНК-білок;
- активацію окисно-відновних, біосинтетичних процесів і основних ферментативних систем;
- збільшення утворення макроергів (АТФ).

3. ***На рівні органів (тканин)*** під впливом низькоенергетичного лазерного випромінювання:

- понижується рецепторна чутливість;
- зменшується тривалість запалення, проміжний набряк і

напруга тканин;

- підсилюється поглинання тканинами кисню;
- підвищується швидкість кровотоку;
- активізується транспортування речовин крізь судинну стінку.

4. ***Кінцевим фотобіологічним ефектом*** впливу низько-енергетичного лазерного випромінювання є реактивність цілісного організму або комплексу органів та систем (області діагностики, терапії).

При дії високоенергетичного лазерного випромінювання на тканини організму вони поглинають його та нагріваються (області терапії, хірургії).

Тепловий ефект лазерного випромінювання приводить до значного підвищення температури біологічної тканини. Причиною цього є концентрація лазерного випромінювання в точці малого розміру (діаметр світлової плями може сягати соті частки мікрона) та низька теплопровідність біологічних тканин. Вимірювання показали, що в точці поглинання тканиною лазерного променю може спостерігатись підвищення температури, що значно перевищує 100 ^{0}C. Слід відзначити, що вже при 60 ^{0}C наступає незворотна денатурація білків. Однак, першими при зростанні температури страждають ферменти, що є компонентами клітин. В результаті біохімічні реакції, що протікають в клітинах, повністю припиняються і клітина гине.

Специфічні властивості лазерного випромінювання визначають характерні особливості руйнування тканин при тепловому ефекті. Перш за все, для лазерного опіку характерна обмеженість області різкого підвищення температури – *локалізованість дії*.

На характер теплового руйнування біологічної тканини лазерним випромінюванням впливають як параметри випромінювання лазера (енергія випромінювання, довжина хвилі, режим роботи і інше), так і характеристики самої тканини – ступінь пігментації, мікроскопічна структура, густина тканини. Ефект носить вибірковий характер – максимальному тепловому руйнуванню підлягають біологічні

об’єкти, що містять молекули які найкраще поглинають випромінювання даної довжини хвилі. При великих потужностях випромінювання практично всі молекули гинуть.

При нагріванні тканини до 100 °С вода, яка міститься в клітинах, закипає, змінюється фазовий стан води і вона перетворюється в пару. Різко зростає тиск всередині клітини, що спричиняє тисячократне збільшення її об'єму. В результаті клітинна стінка руйнується і пара виходить назовні. Після випаровування клітинної рідини температура швидко підвищується до 300...400 °С. Тканина чорніє, обвуглюється і починає диміти. Нагрівання матеріалу швидке (вибухове), тому тепло не встигає передатися сусіднім ділянкам і зосереджується в зоні опромінення, що призводить до появи у товщі тканини механічної напруги, різкого теплового розширення тканини, яке поширюється в ній у вигляді *ударної* (вибухової) хвилі. В такому разі має місце ***ударний механізм дії*** лазерного опромінення на біологічну тканину.

Вибухова (ударна) хвиля, що виникає внаслідок явищ, описаних вище, має дуже велику руйнівну дію, яка до того ж ще підсилюється опором оточуючих тканин. Особливо інтенсивна ударна хвиля при дії лазерного випромінювання імпульсного характеру.

8.4. Лазери і лазерні системи для діагностики біологічних об’єктів

Складність і різноманіття біологічних об’єктів, значні розбіжності в характері їх взаємодії зі світлом визначають необхідність залучення широкого кола лазерів, що використовуються в біології і медицині. Такі лазери перекривають широкий діапазон довжин хвиль від 100 нм до 30 мкм. Рівні вихідної потужності лазерів неперервної дії і середні потужності імпульсних лазерів складають від кількох міліват до сотень ват. Тривалість імпульсів також змінюється в широкому діапазоні: від кількох мілісекунд до одиниць фемтосекунд, а ширина лінії випромінювання – від кількох герц до десятків гігагерц. Кутова розбіжність – від одиниць градусів у напівпровідникових лазерах до десятих часток мілірадіана у

газорозрядних. На рис. 8.3 показано рівні потужності і енергії випромінювання найбільш поширених лазерів.

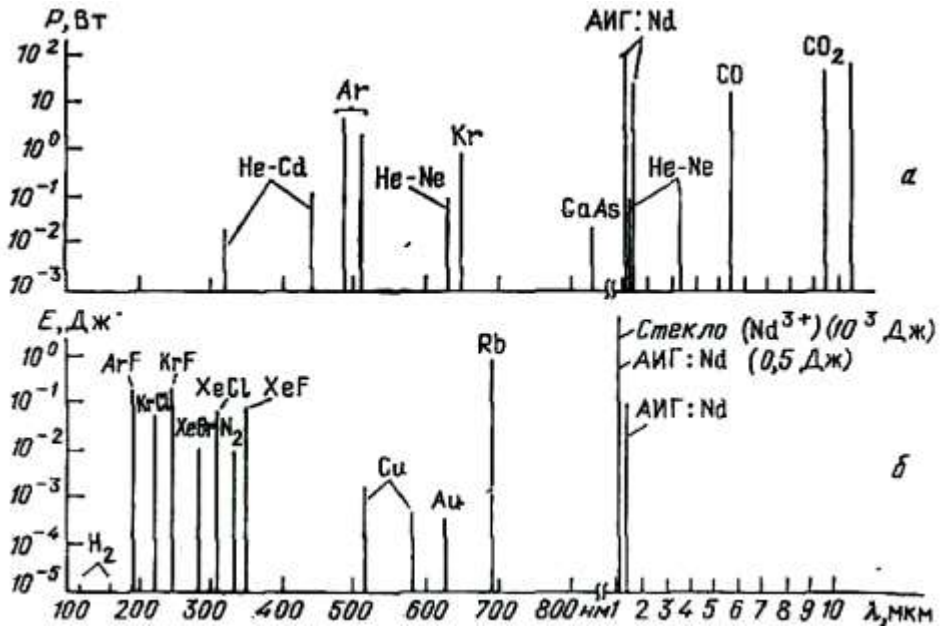


Рис. 8.3. Довжини хвиль випромінювання і рівні вихідної потужності неперервних (а) і енергія в імпульсі імпульсних (б) лазерів [8]

8.4.1. Газові лазери

Гелій-неонові лазери (He-Ne) працюють на збуджених атомах неону. Накачка здійснюється за допомогою тліючого розряду. Найбільш інтенсивними являються лінії випромінювання на довжинах хвиль 0.63; 1.15 і 3.39 мкм. Потужність червоного випромінювання на 0.63 мкм з одиниці довжини активного середовища (трубки) складає 50 мВт/м.

He-Ne лазери характеризуються високою стабільністю параметрів випромінювання та значним терміном роботи (до 10^4 год). Лазери випускаються двох типів – із зовнішніми і внутрішніми дзеркалами. В першому випадку для герметизації активного елементу використовуються віконця Брюстера і випромінювання лазера одержується лінійно поляризованим з високим ступенем поляризації (500**:**1). У другому випадку поляризація випромінювання стає круговою (l:1), при цьому вихідна потужність збільшується приблизно у 1,5 рази. Діаметр пучка для потужних лазерів червоного

випромінювання складає біля 2 мм, а кут розбіжності 1-3 мрад.

До недоліків He-Ne лазерів слід віднести малий коефіцієнт корисної дії (ККД), біля 0,1 %, та низький рівень вихідної потужності.

Імпульсні атомарні лазери мають більший ККД та вищий рівень середньої потужності порівняно з гелій-неоновим лазером. В якості активного середовища використовуються пари металів. Найбільш цікавими з точки зору практичного застосування є *лазери на парах міді і золота.* Ці лазери генерують інтенсивне випромінювання у видимому діапазоні довжин хвиль. Найбільш інтенсивними є зелена (0.51 мкм) і жовта (0.58 мкм) лінії мідного лазера та червона лінія (0.63 мкм) лазера, що працює на парах золота. Накачка таких лазерів здійснюється імпульсним газовим розрядом в суміші парів металу і буферного газу (гелію).

Середня потужність випромінювання мідних лазерів складає 8-40 Вт, частота проходження імпульсів 2-20 кГц, тривалість 5-50 нс, потужність в імпульсі сягає 200 кВт. Для лазерів на парах золота середня потужність в 4-8 раз менша. ККД мідного лазера 1 %, розбіжність пучка 2 мрад, діаметр пучка до 15 мм**.**

З точки зору діагностичного застосування в біології і медицині атомарні лазери цікаві тим, що вони є *самими потужними джерелами імпульсного випромінювання у видимій області.*

Йонні лазери на інертних газах (в більшості застосувань це аргонові і криптонові лазери) використовують для накачки дуговий розряд. Вони є *самими потужними лазерами неперервної дії видимого і ближнього УФ-діапазонів довжин хвиль.* Сумарна потужність на багатьох лініях Ar-лазера поблизу 0.50 мкм сягає 10-20 Вт, а в області 0.35мкм – 1-2 Вт. Потужність випромінювання Kr-лазера поблизу 0.65 нм не перевищує 1 Вт. Основні лінії випромінювання Ar-лазера перекривають діапазон 0.35-0.51 мкм (10 ліній), Kr-лазера – 0.35-0.80 мкм (14 ліній). ККД іонних лазерів не перевищує 0,1 %.

Йонні лазери на парах хімічних елементів теж є широко вживаними джерелами когерентного випромінювання у видимій і

УФ-областях спектру. Оскільки в якості активного середовища використовуються пари багатьох хімічних елементів (Cd, Zn, Se, Te і т. д.) в суміші з буферним газом гелієм, то набір ліній випромінювання виявляється значно ширшим, ніж у Kr- або Ar лазерів. При цьому потужність випромінювання дещо більша, ніж у He – Ne-лазерів.

Найбільш поширеними в практиці біомедичних застосувань є He-Cd і He-Se-лазери. Накачка таких лазерів здійснюється повздовжнім тліючим розрядом постійного струму. Випромінювання He-Cd-лазера здійснюється в синій (0.44 мкм) і УФ- (0.33 мкм) областях спектру, а випромінювання He-Se-лазера – більш чим на 19 лініях, що перекривають майже весь видимий діапазон.

He-Cd-лазер є перспективним для діагностики в біології і медицині – це мікрофлуориметрія, спектроскопія комбінаційного розсіювання, лазерні мікроскопи та ін. Потужність випромінювання промислових лазерів на довжині хвилі 0.44 мкм сягає 100 мВт, а в УФ-області (0.33 мкм) – 1-20 мВт. Термін роботи таких лазерів $(5\text{-}8)\cdot 10^3$ год.

Молекулярні лазери ІЧ-діапазону працюють на коливально-обертальних переходах молекул CO_2 і CO. CO_2-лазер випромінює на обертальних переходах в межах молекулярних смуг 9.4 і 10.4 мкм. Він може генерувати на багатьох лініях з цих смуг. Перебудова ліній генерації здійснюється за допомогою відбиваючої дифракційної гратки. Без дисперсійного елементу (дифракційної гратки) найбільше підсилення має лінія 10.6 мкм. Накачка лазера здійснюється повздовжнім тліючим розрядом постійного струму в багатокомпонентній газовій суміші CO_2-N_2-He-Xe. Вихідна середня потужність промислових лазерів складає 5-40 Вт, діаметр пучка 5-10 мм, розбіжність пучка 1-5 мрад, високий ККД 10-30 %.

CO-лазер працює в інтервалі довжин хвиль 5-6.5 мкм, ККД такого лазера ще більший (50-75 %), потужність порівнюється з CO_2-лазером. Активне середовище лазера містить суміш газів гелію, азоту, ксенону в кисню.

Близькі до CO_2- і CO-лазерів характеристики мають так звані *хімічні лазери.* Їх генерація здійснюється на коливально-обертальних переходах двоатомних молекул галогеноводневих сполук. Довжини хвиль ліній випромінювання таких лазерів: HF – 2,7 мкм; HC1 – 3,7мкм; HBr – 4,2 мкм; DF – 4,3 мкм. Хімічні лазери можуть працювати в імпульсному і неперервному режимах генерації, допускають дискретну перебудову довжин хвиль в межах коливально-обертальних смуг генерації.

Молекулярні лазери УФ-діапазону працюють на електронно-коливальних переходах**.** Найбільш застосованими в практиці медико-біологічних досліджень є імпульсні лазери на молекулах азоту, що випромінюють на довжині хвилі 0.34 мкм та водневі лазери, що випромінюють в області вакуумного ультрафіолету (0.12 і 0.16 мкм). КПД цих лазерів відносно низький (0,01-1 %), середня потужність 10^{-3}-1Вт, тривалість імпульсів 1-10 нс.

Ексимерні лазери. В якості активного середовища таких лазерів використовуються ексимери – молекули-димери, що існують тільки в збудженому стані і миттєво розпадаються в основному стані, що автоматично забезпечує інверсію заселеності енергетичних рівнів. Накачка таких лазерів здійснюється коротким поперечним розрядом. Ексимерні лазери мають значний ККД (1-15 %) і можуть перебудовуватись в межах 2-6 нм. Середні довжини хвиль ліній випромінювання ексимерних лазерів на галогенідах інертних газів: ArF – 193 нм, KrCl – 222 нм, KrF – 248 нм, XeBr – 308 нм, XeF – 351 нм, енергія в імпульсі 0,01-0,25 Дж, частота проходження імпульсів 100-150 Гц, тривалість імпульсу 4-20 нс, середня потужність 5-40 Вт. Ексимерні лазери набули широкого застосування в офтальмології.

8.4.2. Рідинні лазери на барвниках

Активні середовища лазерів на барвниках являють собою розчини органічних барвників, що розміщуються в спеціальних кюветах, або прокачуються на повітрі у вигляді струменя. Плавна перебудова довжини хвилі випромінювання для одного типу

барвника здійснюється за допомогою дисперсійного елементу всередині резонатора в межах кількох десятків нанометрів. Заміною барвника і джерела накачки здійснюється перебудова довжин хвиль у широкому спектральному діапазоні від УФ до ближнього ІЧ (0.34-0.96 мкм). За рахунок подвоєння та параметричного перетворення частот цей діапазон ще більше розширюється (0.21-0.38мкм і 1,0-3,1 мкм). Максимальний ККД рідинних лазерів на барвниках 0,08-0,8 %. Розбіжність пучка випромінювання в залежності від конструкції резонатора змінюється в межах 0,5-20 мрад.

Ефективна *накачка в імпульсному режимі забезпечується азотним, мідним і ексимерним лазерами*, а також випромінюванням *другої і третьої гармонік гранатового лазера* (532 і 355 нм). Ефективність перетворення УФ-випромінювання азотного лазера у видиме випромінювання лазера на барвниках складає біля 10 %.

Накачка мідним лазером потужністю 4 Вт дозволяє за допомогою чотирьох барвників перекрити діапазон довжин хвиль 0.53-0.71 мкм з середньою потужністю 6 Вт, забезпечити високу частоту повторення імпульсів (10 кГц) та малу розбіжність пучка випромінювання (3 мрад).

Лазери на барвниках є унікальними джерелами когерентного випромінювання *як в імпульсному, так і в неперервному режимі генерації*.

8.4.3. Твердотільні лазери

Рубіновий лазер є першим лазерним генератором, що випромінював світло у видимій області. Рубіновий лазер був розроблений американським фізиком Т. Мейманом у 1960 р. Активне середовище лазера являє собою рубіновий стрижень легований домішками хрому ($Al_2O_3:Cr$). Накачка здійснюється імпульсним випромінюванням спіральної або лінійної ксенонової лампи. Лазер випромінює в червоній області на довжині хвилі 0.69 мкм. Порівняно з іншими твердотільними лазерами рубіновий має низький ККД (0,1 %). Тривалість імпульсів в режимі вільної генерації складає 1-

3 мс, енергія в імпульсі – 1 Дж, частота проходження імпульсів – 1 Гц, розбіжність пучка – 1 мрад, діаметр 2-10 мм.

Неодимові лазери на скляній матриці працюють на силікатному або фосфатному стеклах. Індуковане випромінювання здійснюється на йонах неодиму Nd^{3+}. Довжина хвилі випромінювання лазера на силікатному склі 1.06 мкм, а на фосфатному – 1.05 мкм, тобто суттєво не залежить від матеріалу матриці. Лазери працюють в імпульсному режимі і характеризуються високим рівнем енергії випромінювання в імпульсі (до 10^3 Дж), малою частотою повторення імпульсів 1-2 Гц. В режимі вільної генерації діаметр пучка 5-10 мм, розбіжність 5-10 мрад.

Неодимові лазери на алюмоітрієвому гранаті (АІГ:Nd). Матричну основу таких лазерів складає кристал ітрій-алюмінієвого гранату ($Y_3Al_5O_{12}$), у якого частина йонів Y^{+3} заміщена йонами Nd^{+3}. В якості накачки використовують ксенонову або криптонову дугові лампи. Найбільш інтенсивною є лінія випромінювання на 1.06 мкм, генерація також може бути реалізована на лініях 0.95, 1.32 і 1.83 мкм, ККД лазера 2-2,5 %. Неодимові лазери на гранаті вигідно відрізняються від лазерів на склі тим, що можуть ефективно генерувати когерентне випромінювання як в імпульсному, так і в неперервному режимах. В неперервному режимі роботи такі лазери мають високу потужність випромінювання на 1.06 мкм до 250 Вт, а в імпульсному до 10^8 Вт при тривалості імпульсів 10^{-12} с.

Ербієві лазери (*АІГ:*Er^{3+}) є перспективними для біологічних досліджень. За своїми параметрами вони не поступаються неодимовим лазерам на гранаті. Важливо, що довжина хвилі випромінювання такого лазера (2,94 мкм) лежить в смузі нормальних коливань молекули води (λ_{max} = 2.94 мкм для «вільної» і λ_{max} = 3.05 мкм для «зв'язаної» води), що й визначає перспективність ербієвих лазерів для їх застосування в біології і медицині.

Волоконні лазери знайшли широке застосування в біології і медицині. Типовий медичний лазер використовує оптичні волокна (світловоди) з діаметром серцевини 7-10 мкм. Серцевина хвилеводу

може бути виготовлена з різних лазерних матеріалів. При цьому для волокон, активованих різними рідкоземельними елементами, довжину хвилі випромінювання можна підбирати в широких межах від УФ до ІЧ. Активне середовище такого лазера являє собою спіралеподібний світловод, розташований навколо лампи накачки, дистальний кінець якого довжиною 1-10 м виводиться в область взаємодії випромінювання з біологічним об'єктом.

Наприклад, при активації матеріалу волокна неодимом в режимі одиночних імпульсів вихідна енергія лазера на довжині хвилі 1.06 мкм складає 0.6-0.7 Дж при тривалості імпульсу 100-120 мкс.

Напівпровідникові інжекційні лазери (лазерні діоди) перекривають діапазон довжин хвиль випромінювання від 0.38 до 46 мкм, мають ККД до 20 %, компактні та прості конструктивно.

В найпростішому варіанті інжекційний лазер являє собою напівпровідниковий діод з *p*-*n*-переходом, в області якого при пропусканні інжекційного струму в прямому напрямі створюється інверсна населеність станів в зонах провідності та/або у валентній зоні. В лазерних діодах частіше використовують подвійні гетероструктури, в яких формуються два переходи між різними напівпровідниковими матеріалами. Товщина активного шару у таких лазерів 0.1-0.3 мкм, вони працюють при кімнатній температурі. Для розширення спектрального діапазону і зниження порогу накачки використовують потрійні і четверні напівпровідникові сполуки. Наприклад, лазери на основі $GaAs_{1-x}P_x$ перекривають діапазон від 0.64 мкм ($x = 0{,}4$) до 0.83 ($x = 0$). Короткохвильове випромінювання (УФ і синя області) напівпровідникових інжекційних лазерів одержано на так званих нітридних матеріалах та деяких напівпровідниках групи A_2B_6.

Для ІЧ-спектроскопії оптимальними є лазери на основі сполук свинцю і олова: $PbSi_{1-x}Se_x$, $Pbi_{1-x}Sn_xTe$ и $Pb_{1-x}Sn_xSe$ і аналогічних, для яких одержана генерація випромінювання в діапазоні 2.5-46.2 мкм. Головним недоліком застосування цих сполук є необхідність їх досить глибокого охолодження (20-40 К) при роботі в неперервному

режимі. Більш раціональною є робота ІЧ лазерних діодів в імпульсному режимі, коли для їх охолодження застосовується досить проста техніка – термоелектричні холодильники.

Завдяки впровадженню технології сфазованих напівпровідникових структур, що складаються з десяти і більше лазерів, досягнута можливість генерації випромінювання потужністю в кілька Вт. Використання таких структур дозволяє також фокусувати пучок лазерного випромінювання в пляму заданих розмірів та здійснювати сканування об’єкту на різних відстанях. Таким чином реалізується лазерний сканер, що діє аналогічно сканеру ультразвукового випромінювання в приладах УЗД.

Контрольні питання та завдання

1. Назвіть характеристики лазерного випромінювання, що визначають основні напрямки його застосування на практиці.
2. Які властивості лазерного випромінювання дозволяють використовувати його як оптичний скальпель при внутрішньоклітинних операціях?
3. З якою метою застосовуються в біології і медицині лазери з перебудовою частоти генерації?
4. Який з фізичних процесів є первинним в послідовності фотобіологічних процесів?
5. Який процес є заключним в послідовності фотобіологічних процесів?
6. Що характеризує ступінь гомеостазу живого об’єкту?
7. Як змінюється ступінь гомеостазу живого об’єкту при діагностичних, терапевтичних та хірургічних діях.
8. Які фактори визначають тривалість дії оптичного опромінення на біологічні тканини?
9. За яких умов досягається найбільша глибина дії оптичного випромінювання на біологічні тканини?

10. Чому на практиці частіше використовують імпульсні лазери, а не лазери неперервної дії?
11. Наведіть основні процеси, що характеризують механізми біологічної дії низькоенергетичного лазерного випромінювання.
12. Які ви можете назвати механізми дії високоенергетичного лазерного випромінювання на живі тканини?
13. Які лазери набули значного поширення в офтальмології?
14. Характеризуйте можливості застосування напів-провідникових лазерних систем в медичній і біологічній практиці.

9. Лазерні методи діагностики
9.1. Лазерна нефелометрія

Методи пружного розсіювання світла використовують для дослідження бактерій, формених елементів крові, тканин ока і т. ін. Такі біологічні об'єкти характеризуються різноманітністю форм (сфери, циліндри, диски, еліпсоїди і ін.) та розмірів (0.1-100 мкм). Оскільки досліджувані об'єкти співрозмірні, або значно перевищують довжину хвилі, то світлове випромінювання зазнає розсіювання Мі при взаємодії з вказаними частинками. Важливою характеристикою процесів розсіювання світла є його індикатриса – залежність інтенсивності розсіяного світла від кута розсіювання.

Відомо, що індикатриса розсіювання Мі, на відміну від розсіювання Релея (для частинок розмірами, меншими довжини хвилі), асиметрична (розтягнута в сторону напряму випромінювання). Крім того, якщо розміри частинок значно перевищують довжину хвилі, на індикатрисі розсіювання спостерігаються характерні максимуми.

Вимірювання індикатриси розсіювання полягає в освітленні об'єкта *паралельним* пучком світла і реєстрації інтенсивності світла, розсіяного під різними кутами. Для вимірювання індикатрис розсіювання світла використовують *нефелометри.* Важливо, що в нефелометрі використовується джерело світла з малим кутовим розкидом пучка і приймач з обмеженим кутом зору. Завдяки високій направленості та інтенсивності лазерних пучків використання лазерів в нефелометрах є найбільш оптимальним.

Лазерна нефелометрія є одним із найбільш поширених методів оптичного дослідження біологічних об'єктів. В залежності від розмірів частинок, що розсіюють світло, використовують наступні методи досліджень:

- *метод асиметрії індикатрис* застосовують для оцінки розмірів частинок в діапазоні 0,02-0,2 мкм, що полягає в реєстрації відхилення індикатриси розсіяння від симетричної форми у випадку розсіяння Релея;

- *метод повної індикатриси* застосовується для визначення розмірів частинок в діапазоні 0,1-10 мкм;
- *метод дослідження розсіювання світла на малі кути* застосовують для визначення розмірів і розподілу частинок за розмірами в інтервалі 1-300 мкм.

При рутинних дослідженнях використовують прилади з фіксованими кутами реєстрації розсіяного світла (45^0 або 90^0). Більш широкі можливості, що використовують в наукових дослідженнях, мають нефелометри зі змінним кутом реєстрації розсіяного світла.

Лазерна нефелометрія найшла широке застосування для визначення геометричних параметрів окремих компонент крові. Зокрема, сильна залежність індикатрис розсіювання від розмірів еритроцитів, виявлена в діапазонах кутів 0,5-35°, що дозволяє одержати функцію їх розподілу за розмірами. В той же час, нерівності поверхні («городчатість») патологічних еритроцитів з високою точністю встановлюються за значним зростанням інтенсивності розсіяного лазерного випромінювання при кутах, більших 90°.

Пружне розсіяння лазерного випромінювання використовується як метод дослідження деформованості еритроцитів. Цей метод, що одержав назву *екмацитометрії*, використовується для діагностики низки захворювань крові. При екмацитометрії лазерний промінь пропускають через суспензію еритроцитів, розташовану між прозорими циліндрами, що обертаються. На екрані спостерігають дифракційну картину, вигляд якої залежить від форми еритроцитів. При цьому недеформовані еритроцити дають картину розсіяння у вигляді концентричних кілець, а деформовані – у вигляді еліпсоїдів. Для оцінки концентрації різних форм еритроцитів використовується індекс недеформованих еритроцитів, що являє собою відношення числа деформованих до числа недеформованих еритроцитів.

Важливо, що використання в нефелометрах лазерів дозволило суттєво спростити оптичні пристрої, зменшити необхідну для досліджень кількість досліджуваних речовин, підвищити чутливість

приладу.

Слід відзначити, що, крім індикатриси розсіювання, важливою характеристикою розсіяного світла є його поляризація. Відомо, що при освітленні системи частинок неполяризованим світлом розсіяне світло стає частково поляризованим. Поляризаційні характеристики розсіяного випромінювання залежать від форми і розмірів частинок. Ця залежність теж може бути покладена в основу роботи *поляризаційних лазерних нефелометрів.*

9.2. Лазерна спектроскопія квазіпружного розсіяння світла

В цьому розділі розглянемо можливості використання лазерного квазіпружного розсіяння світла для вивчення динамічних характеристик біологічних мікрооб'єктів: коефіцієнтів дифузії, скоростей направленого транспорту і хаотичного руху, параметрів внутрішньо молекулярної и внутрішньо клітинної рухомості. За цими вимірюваними характеристиками можна розраховувати розміри, масу і ряд інших характеристик частинок, що розсіюють світло. Це область так званого квазіпружного розсіяння світла, обумовленого ефектом Допплера.

9.2.1. Вимірювання швидкостей потоків рідин і газів за допомогою лазерних допплерівських анемометрів

При розсіюванні світлового випромінювання на рухомих частинках, що знаходяться в потоках газів або рідин, виникає невелика зміна частоти розсіяного світла як результат квазіпружної взаємодії фотона і мікрочастинки. Причиною зміни частоти розсіяного світла в даному випадку є ефект Допплера. В найпростішому випадку, коли частинки рухаються в однаковому напрямку з постійною швидкістю, частота світла, розсіяного рухомою частинкою, визначається за формулою для повздовжнього ефекту Допплера:

$$\omega = \omega_0(1 \pm \frac{\upsilon}{c}\cos\varphi), \quad (9.1)$$

де: φ – кут розсіяння світла, υ – швидкість направленого руху частинки, c – швидкість світла у вакуумі, ω_0 – частота світла, що

падає на частинку.

Множину допплерівських зміщень частот $\omega_D = \omega - \omega_0$ розсіяного світла називають *допплерівським спектром*. Допплерівський спектр є наслідком того, що зміщення частот є лінійно зв'язаним зі швидкістю частинок, що розсіюються. Швидкості різних частинок відрізняються що й визначає форму допплерівського спектру. З іншого боку, використовуючи ефект Допплера, ми можемо визначати швидкості руху частинок, що розсіюються.

Для визначення швидкостей потоків газів і рідин використовують прилади, що називаються *лазерними допплерівськими анемометрами* (ЛДА). Принцип роботи цих приладів основується на реєстрації допплерівських зміщень частот (ω_D) випромінювання розсіяного рухомими частинками.

В якості прикладу розглянемо показану на рис. 9.1. диференціальну схему ЛДА, що застосовується в біомедичній практиці.

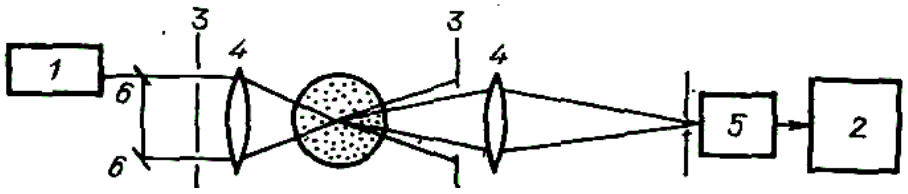


Рис. 9.1. Схема диференціального ЛДА [8]

В цій схемі вимірювальний об'єм формується перетином двох пучків лазера (1) однакової інтенсивності, утворених дзеркалами (6), і елементами приймаючої системи, що включає в себе в найпростішому випадку подвійну діафрагму (3) і лінзу(4).

Електричний сигнал на виході фотоприймача (5) є результатом складення на фотокатоді двох хвиль, розсіяних від обох зондуючих пучків. Цим хвилям відповідають частоти, що відрізняються за знаком кута розсіяння:

$$\omega_1 = \omega_0(1 + \frac{\upsilon}{c}\cos\varphi), \quad (9.2)$$

$$\omega_2 = \omega_0(1 - \frac{\upsilon}{c}\cos\varphi). \quad (9.3)$$

Таким чином, мова йде про складення на фотокатоді двох хвиль з близькими частотами внаслідок чого утворюється хвиля биття. Така хвиля характеризується двома частотами:

$$\omega_1 - \omega_2 = \omega_0 \frac{2\upsilon}{c} \cos\varphi = \omega_D \quad (9.4)$$

та

$$\omega_1 + \omega_2 = 2\omega_0. \quad (9.5)$$

Перша з цих хвиль є *низькочастотним спектром допплерівського зміщення*, а друга – високочастотною складовою, котра легко гаситься за допомогою спеціальних фільтрів.

На практиці обробка вихідного електричного сигналу спектрометра (блок (2) на рис. 9.1.) виконується аналоговими або цифровими методами.

Завдяки монохроматичності, когерентності і високій спрямованості лазерного випромінювання стало можливим здійснювати на практиці оптичну анемометрію.

В більшості випадків в приладах для дослідження біологічних об’єктів використовують неперервні одномодові *He-Ne* лазери. Потужності випромінювання таких лазерів достатньо для реєстрації інтенсивності розсіяного світла. Разом з тим невелика потужність гелій-неонових лазерів не вносить помітних змін в стан досліджуваного об’єкту.

9.2.2. Діагностика біологічних об’єктів на основі реєстрації швидкостей направленого руху

Вимірювання рухомості заряджених частинок в електричному полі. Одним з яскравих прикладів застосування спектроскопії квазіпружного розсіювання світла в біології і медицині є методика *електрофоретичного світлорозсіяння (ЕФС)*. Ця методика використовується для визначення рухомості заряджених світлорозсіювачих частинок (йонів) в електричному полі.

В одно- або двопроменевому ЛДА, що забезпечений низькочастотною системою обробки інформації, вставляється електрофоретична кювета з гомогенним розчином або суспензією досліджуваних частинок. Найпростіша кювета являє собою

спектрофотометричну комірку, в яку введені два близько розташованих платинових або палладієвих електрода. При підключенні різниці потенціалів в розчині виникає направлений рух заряджених частинок з дрейфовою швидкістю $\upsilon = \mu E$, де μ – електрофоретична рухомість (ЕФР), E – напруженість електричного поля. Відповідне допплерівське зміщення частоти пропорційне дрейфовій швидкості, а значить і електрофоретичній рухомості.

Таким чином, знаючи напруженість електричного поля в кюветі і вимірявши спектр допплерівського зміщення частот за методом ЕФС, можна прямо визначити величину дрейфової рухомості, а з неї встановити поверхневий потенціал частинок.

Визначення швидкісних характеристик потоків крові. Другим напрямом робіт, пов'язаних з реєстрацією направленого руху частинок, є *визначення швидкісних характеристик потоків крові:* середньої інтенсивності кровотоку, розподілу швидкостей за перерізом судини, інтенсивності турбулентних пульсацій та ін.

Для одержання значень швидкостей кровотоку і спрощення юстирування оптичної системи використовують схеми з опорним пучком. Конструктивно всі елементи оптичної схеми розташовують в модернізованій фундус-камері, що дозволяє порівнювати результати вимірювання швидкості кровотоку з використанням ЛДА і за методикою звичайної флуоресцентної ангіографії. Подібні системи мають загальний недолік: зміщення кровоносних судин з точки фокусування під час проведення вимірювань. Тому намагаються скоротити час вимірювань до 0,5 с і менше, або використовувати спеціальні компенсаційні схеми, що дозволяють в автоматичному режимі слідкувати за положенням променів на кровоносній судині з їх відповідною корекцією.

В офтальмології ЛДА може з успіхом використовуватися для встановлення відносної закупорки вен і артеріальної недостатності при захворюванні судин сітківки і інших діагностичних цілей.

9.2.3. Лазерна допплерівська спектроскопія живих клітин і діагностика внутрішньоклітинної рухомості

На цей час виконана значна кількість досліджень з розробки методів практичної реєстрації *рухомості живих клітин в суспензіях*: бактерій, сперматозоїдів тварин і людей, водоростей і ін. Така рухомість має характер не теплової дифузії, а випадкових переміщень з елементами прямолінійного, обертального і спірального рухів. Кожен з елементів цих рухів вносить свій вклад в допплерівське розширення спектрів. Тому точний опис світлорозсіяння перетворюється в складну багатопараметричну модель. Незважаючи на це, розроблені методики дозволяють одержати з експериментально виміряних спектрів розподілу швидкостей відносне число рухомих і нерухомих клітин і ряд інших параметрів.

Перше дослідження методу ЛДА для вирішення задач реєстрації *направленої внутріклітинної рухомості у* великих рослинних клітинах відноситься до 1974 р. Були одержані чіткі допплерівські спектри, що характеризують розподіл швидкостей стаціонарного руху частинок, що складають протоплазму цих клітин (ядер, мітохондрій і ін.). В наступній серії робіт була продемонстрована висока ефективність ЛДС як методу рішення задач біофізики – руху, що дозволяє здійснити реєстрацію нестаціонарних відгуків клітини на зовнішні подразнення. Це є важливим при вивченні *механізмів просторово-часової клітковой рухомості, її регуляції та ін.*

Особливістю лазерного внутрішньоклітинного зондування є те, що світло розсіюється не тільки рухомими внутрішньоклітинними органоїдами, а також нерухомими клітковими стінками. В першому випадку в розсіяному світлі з’являються допплерівські зсуви частот, в той час як в другому випадку частота розсіяного світла не міняється. Цей другий компонент розсіяного світла неминуче попадає на фотоприймач, що дозволяє використовувати його в якості опорного випромінювання (хвилі) і реалізувати схему *однопроменевого* ЛДС.

На рис. 9.2 зображена схема вимірювально-обчислювального комплексу для вивчення внутрішньоклітинної рухомості.

Випромінювання *He-Ne* лазера (1), ослаблене набором фільтрів (2), фокусується лінзою (3) на клітину (4), закріплену в кюветі (5) в спеціальних тримачах (6). Розсіяне світло поступає через систему лінз і діафрагм (7) на фотоелектронний помножувач ФЭП (8), що працює в режимі реєстрації струму.

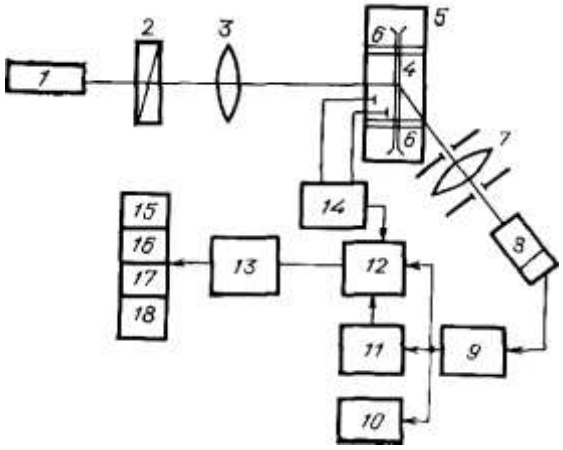


Рис. 9.2. Блок-схема вимірювально-обчислювального комплексу на базі однопроменевого ЛДС [8]

Схема комплексу передбачає наявність системи зворотного зв’язку (14). Сигнал після підсилення і фільтрації в низькочастотному підсилювачі (9) поступає паралельно на осцилограф (10) для візуального контролю, на аналізатор спектру реального часу (11), що має крім електронно-променевого індикатора цифровий вихід, і на аналого-цифровий перетворювач (АЦП) (12), що перетворює аналоговий сигнал в дискретні вибірки з програмно установленою частотою дискретизації і тривалістю. Ці вибірки поступають на ЕОМ (13) для спектральної обробки (15-18), яка виконується по ходу, або після запису вибірки в пам'ять.

На рис. 9.3. в якості прикладу приведений допплерівський спектр, одержаний від живої клітини.

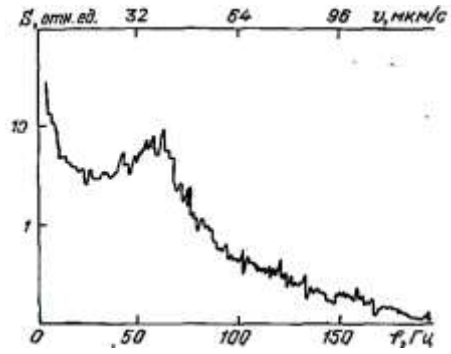


Рис. 9.3. Допплерівський спектр, одержаний від живої клітини дарової водорості зі стаціонарною течією протоплазми при кімнатній температурі [8]

Лазерна допплерівська мікроскопія. В приведених вище прикладах застосований для вимірювань спектрометр забезпечував локальність зондування біля 100 мкм, що було достатньо у зв'язку з порівняно великими розмірами досліджуваних об'єктів. При роботі з малими клітинами необхідно більш висока просторова роздільна здатність – порядку кількох мікрометрів. Це досягається в так званих *лазерних допплерівських мікроскопах (ЛДМ)* завдяки використанню короткофокусної оптики і спеціальної геометрії розташування оптичних елементів. В більшості випадків ЛДМ виготовляють на базі серійних оптичних мікроскопів, що робить їх компактними і легко налаштованими приладами.

За допомогою ЛДМ одержано ряд унікальних результатів: зареєстровано направлений рух частинок всередині одиночних соматичних клітин, проведено пряме спостереження накопичення δ-кристаліна в кришталиках ембріона курчати та ін.

9.3 Абсорбційні методи діагностики

9.3.1. Класифікація абсорбційних методів діагностики

При вирішенні ряду діагностичних задач в біології і медицині добре зарекомендували себе абсорбційні методи діагностики, основані на поглинанні світла біологічними об'єктами. Вони часто застосовуються в лазерній аналітичній спектроскопії або спектроскопії ультрашвидких процесів. Вказані методи відносять до засобів мікродіагностики, оскільки вони несуть інформацію про атомну і молекулярну структуру досліджуваної речовини. Схематично основні методи мікродіагностики показані на рис. 9.4.

Абсорбційно-трансмисійні методи діагностики основуються на поглинанні (абсорбція) квантів світла (перехід 1) і подальшій передачі (трансмісія) набутої енергії на виконання певних процесів. Поглинання квантів світла супроводжується оптичними переходами між основним S_0 і збудженими S_1 станами атомів і молекул.

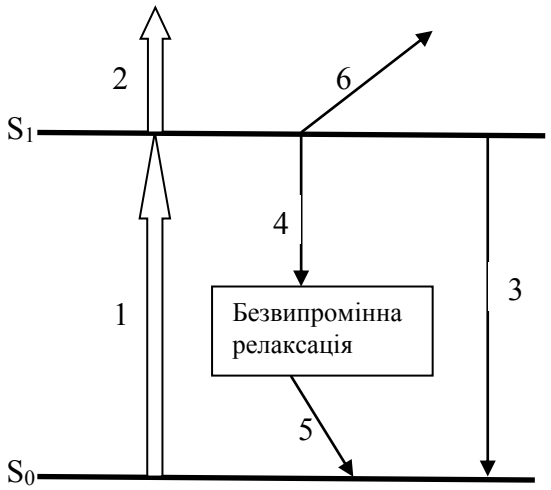


Рис. 9.4. Схематичне представлення основних методів мікродіагностики

Атомно-іонізаційні і *мас-спектрометричні* методи діагностики основуються на процесах поглинання квантів світла (перехід 2), що приводять до іонізації атомів речовини зі збудженого стану S_1.

Перехід зі збудженого S_1 в основний S_0 стан може відбуватися як випромінювально, так і безвипромінювально. У випадку випромінювального переходу (3) має місце флуоресценція, а відповідний діагностичний метод дослідження носить назву *лазерний флуоресцентний аналіз*. При *безвипромінювальній релаксації* енергія, що вивільнюється, йде на нагрів об'єкту (переходи 4, 5). На такому процесі основується *оптико-калориметричний метод діагностики*. Енергія, що вивільнюється при переході зі збудженого в основний стан, може також бути затрачена на протікання *фотохімічних процесів* (перехід 6), результат яких має діагностичну цінність.

До *абсорбційних методів* відносять як абсорбційно-трансмісійні, так і методи, основані на реєстрації поглиненої енергії шляхом вимірювання зміни температури об'єкту ΔT внаслідок його нагріву (*оптико-калориметричні методи*), або інтенсивності $I_ф$ його флуоресценції (*лазерний флуоресцентний аналіз).*

9.3.2. Абсорбційно-трансмісійний аналіз з використанням лазерів з перебудовою частоти

Трансмісійний метод. Вимірювання спектрів пропускання основується на реєстрації інтенсивностей світла, що падає і проходить в поглинаючому середовищі як функції довжини хвилі.

Закон Бугера (5.1) встановлює характер зміни світлового потоку, що поширюється в поглинаючому середовищі. Треба зауважити, що коефіцієнт поглинання $\propto$, що має розмірність, обернену відстані, на якій інтенсивність світла зменшується в е-разів, можна подати у вигляді:

$$\alpha(\lambda) = \sigma(\lambda)N \quad , \qquad (9.6)$$

де: $\sigma(\lambda)$ – ефективний переріз поглинаючих частинок (см^2); N – їх концентрация (см$^{-3}$). Для середовищ, що слабо поглинають світло (майже прозорих біологічних середовищ) в рівнянні (5.1), одержимо наближене співвідношення $\exp[-\alpha(\lambda)d] \cong 1 - \alpha d$, з якого коефіцієнт поглинання можна представити у вигляді

$$\alpha(\lambda) \cong [I_0(\lambda) - I(\lambda, z)] / I_0(\lambda)d = \Delta I(\lambda, z) / I_0(\lambda)d \, , \qquad (9.7)$$

де ΔI – зміна інтенсивності світла при його поширенні в поглинаючому середовищі.

Порогова чутливість абсорбційного методу визначається здатністю реєструючої апаратури визначати найменшу величину $\Delta I_{min} / I_0$. Чутливість методу може бути представлена по-різному: порогова чутливість за оптичним поглинанням

$$\Delta I_{\min} / I_0 = (\alpha d)_{\min} \, , \qquad (9.8)$$

або за коефіцієнтом поглинання

$$\alpha_{\min} = (1/d)\Delta I_{\min} / I_0 \, . \qquad (9.9)$$

Зазвичай система реєстрації з використанням лазерів забезпечує значення $\Delta I_{min} / I_0 = 10^{-5}$.

З рівнянь (9.6) і (9.9) одержимо співвідношення для мінімальної концентрації молекул, що можуть проявляти себе в процесах поглинання світла:

$$N_{\min} = (1/\sigma d)\Delta I_{\min} / I \, , \qquad (9.10)$$

а також відповідну мінімальну концентрацію домішкових молекул, що містяться в розчині:

$$C_{\min} = \frac{N_{\min}}{N_0} = (1/\sigma d N_0)\Delta I_{\min} / I \, , \qquad (9.11)$$

де N_0 – концентрація молекул розчинника.

При $\sigma = 10^{-17}$ см^3, d = 10 см, $N_0 = 10^{18}$ см$^{-3}$ и $\Delta I_{min} / I = 10^{-5}$ маємо

$N_{min}=10^{11}$ см$^{-3}$; $\alpha_{min}=10^{-6}$ см$^{-1}$; $C_{min}=10^{-7}$ (100 ppb). Це є залишковою характеристикою однієї речовини в іншій: ppm (млн$^{-1}$, частин на мільйон, мкг/г); ppb (млрд$^{-1}$, частин на мільярд, нг/г); ppt (трлн$^{-1}$, частин на трильйон, пг/г).

В нелазерних спектрофотометрах використовуються широкосмугові джерела світла, а перебудову за довжинами хвиль здійснюють за допомогою призм або дифракційних ґраток. Для вузьких ліній поглинання чутливість залежить не тільки від здатності приладу зареєструвати малу зміну ΔI на фоні значного сигналу, що пройшов через середовище, а й від роздільної здатності приладу. Звичайно межа чутливості досягається при $\Delta I / I > 10^{-4}$.

Використання лазерів дозволяє:

- суттєво підняти спектральну роздільну здатність методу, а значить визначити форму і структуру ліній поглинання молекул;
- для вузьких ліній поглинання дещо підняти чутливість;
- в деяких випадках спростити і здешевити експериментальну установку, оскільки монохроматор, при наявності лазера з перебудовою довжин хвиль, вже не потрібен;
- за рахунок високої спектральної густини випромінювання лазерів знизити вплив шумів пристрою фотоелектричного перетворення сигналу;
- за рахунок високої направленості і просторової когерентності лазерного випромінювання здійснити дистанційне вимірювання поглинання. У випадку слабкого поглинання в газах і рідинах можна застосовувати *багатоходові кювети*, що нараховують до 30–100 проходів, а також порожнисті скляні і кварцові оптичні волокна довжиною до 150 м.

Переваги лазерних джерел світла особливо проявляються в ІЧ-області спектру при дослідженні окремих обертальних ліній коливальних смуг, які звичайними спектральними приладами не розділяються.

Застосування багатоходових кювет, модуляційних і диференціальних методик вимірювання корисного сигналу

дозволяють суттєво підняти чутливість методу.

Таким чином, була реалізована рекордна для ІЧ-спектрометрів на інжекційних лазерах порогова чутливість $\alpha_{min}=3\cdot10^{-10}$см$^{-1}$. Для лазерних спектрометрів висока когерентність світла стає сильною перепоною з причини прояву інтерференційних ефектів в оптичній схемі приладу. Саме цим і обмежується досягнуте значення α_{min}.

Метод поглинання в об'ємі резонатора. Суттєве підвищення чутливості методу (в 10^2–10^5 разів) можна досягти, коли кювета з досліджуваною речовиною розташовується безпосередньо в об'ємі резонатора лазера. При цьому, по-перше, автоматично реалізується число проходжень (до кількох сотень, якщо досліджуваний об'єкт не вносить значних втрат). По-друге, завдяки характерній для лазерів залежності вихідної потужності від втрат в резонаторі позбавляється основна причина малої чутливості абсорбційного методу, оскільки фактично вимірюється не відношення $\Delta I/I$, а саме значення ΔI.

Розглянутий метод перспективний для реєстрації дуже слабких ліній поглинання речовин, що забруднюють атмосферу, короткоживучих продуктів хімічних (біохімічних) реакцій, радикалів і нестабільних молекул. Для одержання високочутливих спектрометрів, що працюють за принципом вимірювання поглинання в середині резонатора, більш підходящими є лазери з перебудовою частот з широкими лініями і значним запасом підсилення. В видимій області – це лазери на барвниках, в ІЧ-області – лазери на центрах забарвлення.

9.3.3. Абсорбційна спектроскопія ультрашвидких процесів

Методи ультрашвидкої піко- и субпікосекундної лазерної спектроскопії дозволяють проводити дослідження динаміки внутрішнього руху біомолекул. За допомогою цих методів досліджуються надшвидкі процеси коливального і електронного збудження біомолекул, а також динаміка хімічних реакцій з їх участю.

Абсорбційні методи дозволяють визначати повний час релаксації

біомолекул до основного стану, час їх коливальної релаксації, швидкість передачі збудження в суміші біомолекул, швидкість передачі заряду між біомолекулами в суміші акцепторів і донорів, динаміку фотодисоціації біомолекул в розчині, швидкість конфірмаційних змін і ін. Характерні часові інтервали процесів, що розглядаються, знаходяться в досить широкому діапазоні: 0,6-200 пс, необхідний діапазон довжин хвиль лазерного випромінювання для їх дослідження складає 460-880 нм.

Основна ідея абсорбційної спектроскопії з використанням надкоротких імпульсів полягає в тому, щоб відійти від прямих вимірювань тривалості імпульсу, що пройшов через поглинаюче середовище. Тому застосовують два послідовних світлових імпульса, перший з яких (*імпульс, що збуджує*) переводить біомолекули з основного в збуджений стан, а другий, затриманий на піко- або субпікосекундний інтервал часу, так званий *вимірювальний (пробний) імпульс*, реєструє зміну спектру поглинання досліджуваного об'єкта. В даному разі інерційний фотодетектор фіксує ті зміни в спектрі поглинання, котрі виникли за час, що визначається часовою затримкою пробного імпульсу.

Можливі найрізноманітніші схеми реалізації цієї ідеї. Так, наприклад, при дослідженні швидкостей орієнтаційної і обертальної релаксації, а також швидкості передачі електронної енергії молекул в рідинах використовується *поляризаційний метод*. Він оснований на аналізі анізотропії в середовищі за допомогою вимірювання поглинання пробного імпульсу для різних взаємних орієнтацій поляризації імпульсу, що збуджує, і пробного імпульсу.

Найбільшого поширення при вивченні фотохімічних процесів перебудови структури біомолекул одержав так званий метод *диференціальної абсорбційної спектроскопії*, який основується на реєстрації диференціальних спектрів поглинання, що являють собою різницю між спектрами поглинання до збудження і спектрами, зареєстрованими в різні проміжки часу після збудження. Зміна оптичної густини досліджуваного об'єкта $\Delta D(\lambda,t)$ визначається

співвідношенням $\Delta D(\lambda,t) = -\lg(E/E_0)$, де $E = I/I_o$ і $E_0 = I^*/I^*_o$ – це відношення інтенсивностей світла, що вийшло з поглинаючого середовища, і світла, що падає на об'єкт при збудженні і без збудження.

9.3.4. Класифікація калориметричних методів діагностики

Калориметричні методи мікродіагностики (спектроскопії) основані на поглинанні світла з переходом до збудженого стану молекул і наступної безвипромінної релаксації, що приводить до нагріву зразка. Інформаційним параметром є зміна температури зразка ΔT. Очевидно, що ступінь нагріву визначається поглинальною здатністю речовини, інтенсивністю світла і ефективністю процесів, що конкурують (флуоресценція, фотохімічні і фотоелектричні ефекти). Все це і визначає переваги калориметричних методів, головним з'являється можливість дослідження поглинання світла середовищами, що сильно розсіюють світло, особливо це стосується біологічних і медичних задач. Вказані методи дозволяють досліджувати непрозорі (оптично густі), а також об'єкти, що мають незначну флуоресценцію, контролювати протікання фотохімічних і фотоелектричних процесів. Оскільки вимірюваним параметром є температура, то в якості детекторів застосовуються неселективні приймачі, а значить, відсутні обмеження з боку приймача щодо довжин хвиль випромінювання

Оптико-калориметричні методи мають багато модифікацій в залежності від способів реєстрації змін температури. Можливі безпосередні вимірювання температури за допомогою контактних сенсорів і супутніх змін об'єму зразка. В такому разі реалізується *оптико-термічний метод діагностики*. Більш перспективним являється метод *оптико-термічної радіометрії*, заснований на вимірюванні інтенсивності теплового випромінювання нагрітого лазерним випромінюванням тіла.

Завдяки своїй простоті, надійності, високій чутливості і універсальності найбільш широкого поширення одержав *оптико-*

акустичний метод. Він полягає в перетворенні теплових коливань в акустичні і наступній їх реєстрації мікрофоном, або яким завгодно іншим приймачем акустичних коливань.

Контрольні питання та завдання

1. Які оптичні явища використовуються в нефелометрії?
2. Чому в якості джерела світла в нефелометрах доцільно використовувати лазери?
3. Які основні методики дослідження використовуються в практичній нефелометрії?
4. Вкажіть можливі області застосування нефелометрії.
5. Поясніть принцип дії диференціального ЛДА.
6. Опишіть методику визначення рухомості іонів за допомогою ЛДА.
7. Які області застосування має лазерна допплерівська мікроскопія?
8. Опишіть схему лазерної мікродіагностики, показану на рис. 9.4.
9. Які супутні процеси супроводжують поглинання світла мікрооб’єктами?
10. Для яких об’єктів використовується трансмісійний метод аналізу?
11. В чому переваги методу, основаному на реєстрації поглинання світла об’єктом, що знаходиться в середині резонатора**?**
12. Вкажіть області застосування абсорбційної спектроскопії ультрашвидких процесів.
13. Для яких об’єктів застосовують калориметричні методи діагностики?
14. В чому полягають оптико-калориметричні методи діагностики і які їх модифікації ви знаєте?

Література

1. Ваксман Ю. Ф. Медицинская оптика.- Одесса: ОНУ, 2016.-94 с. http://phys.onu.edu.ua/uk/navchalnometodychnaliteratura/bakalavra
2. Ваксман Ю. Ф. Оптика: Навчальний посібник. - Одеса: Астропринт, 2001.- 320 с.
3. Глоба И. И. Оптические методы и приборы контроля качества фармацевтических товаров. - Минск: БГТУ.-2014.- 218 с. globa_opticheskie-metody-i-pribory_farmacevtika
4. Илларионова Е. А., Сыроватский И. П. Метод поляриметрии. Применение в фармацевтическом анализе. - Иркурск: ИГМУ.- 2017.- 30 с. https://mir.ismu.baikal.ru/src/downloads/57607-bc2_metod_polyarimetrii.pdf
5. Илларионова Е. А., Сыроватский И. П. Метод флуориметрии. Применение в фармацевтическом анализе.- Иркурск: ИГМУ.- 2017.- 42 с. https://mir.ismu.baikal.ru/src/downloads/fd548250_metod_fluorimetrii.pdf
6. Косяченко Л. А. Основи інтегральної та волоконної оптики. - Чернівці: Рута. - 2008. – 346 с.
7. Личковський Е. І., Тіманюк В. О., Чалий О. В., Лях Ю. Є., Животова О. М. Біофізика. Фізичні методи аналізу та метрологія. - Вінниця: Нова Книга, 2014. – 464 с.
8. Приезжаев А. В. и др. Лазерная диагностика в биологии и медицине. М.: Наука. - 1989. – 237 с.
9. Птащенко О. О. Основи квантової електроніки. Навчальний посібник. Одеса: Астропринт, 2010. – 390 с.
10. Сергиенко Н. М. Офтальмологическая оптика. М.: Медицина, 1991. – 144 с.
11. Тамарова Р. М. Оптические приборы для исследования глаза. М.: Медицина. - 1982. – 176 с.
12. Урмахер Л. С., Айзенштат Л. И. Оптические средства коррекции зрения. М.: Медицина, 1990. – 252 с.
13. https://atago-russia.com/primenenie/primenenie-refraktometrov-v-farmatsevtike

Навчальне видання

Ваксман Юрій Федорович

ОПТИЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ В БІОМЕДИЧНІЙ І ФАРМАЦЕВТИЧНІЙ ПРАКТИЦІ

НАВЧАЛЬНИЙ ПОСІБНИК

В авторській редакції

Підп. до друку 14.02.2022. Формат 60х84/16.
Ум.-друк. арк. 8,08. Тираж 20 пр.
Зам. № 2424.

Видавець і виготовлювач
Одеський національний університет
імені І. І. Мечникова

Україна, 65082, м. Одеса, вул. Єлісаветинська, 12
Тел.: (048) 723 28 39. E-mail: druk@onu.edu.ua
Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 4215 від 22.11.2011 р.