

**Одесский национальный университет имени И. И. Мечникова**  
**Учебно-научный центр медицинской и биологической физики**

**Кафедра экспериментальной физики**

## **МЕДИЦИНСКАЯ ОПТИКА**

Учебное пособие  
для студентов физического факультета  
специализации «Медицинская физика»

Одесса - 2016

Печатается по решению Ученого  
Совета физического факультета

Составитель:

Доктор физико-математических наук, профессор  
Ваксман Юрий Федорович

В учебном пособии рассмотрены основные вопросы офтальмологической оптики: оптическая система глаза и ее особенности; глаз как центрированная оптическая система, основные функции зрения, aberrации оптической системы глаза, клиническая рефракция глаза. Представлены разнообразные методы офтальмоскопических исследований и офтальмоскопические системы. Значительное внимание уделено приборам подбора и контроля средств коррекции зрения.

Рассмотрены специальные методы оптической микроскопии, а также методики спектрального анализа, используемые в биологии и медицине.

Детально рассмотрены процессы и механизмы взаимодействия лазерного излучения с биообъектами. Анализируются особенности лазерного излучения, используемые в лазерной диагностике и лечении. Рассмотрен широкий круг оптических квантовых генераторов, нашедших применение в биологии и медицине.

Пособие предназначено для студентов физического факультета, изучающих курс «Медицинская оптика».

## Содержание

	Стр.
1.Офтальмологическая оптика .....	5
1.1.Оптическая система глаза и ее особенности.....	5
1.1.1.Строение глаза человека .....	5
1.1.2. Характеристика основных элементов оптической системы глаза.....	6
1.2. Законы геометрической оптики в офтальмологии .....	8
1.3.Функции зрения .....	13
1.4. Аберрации оптической системы глаза .....	15
1.5. Клиническая рефракция глаза .....	21
2. Основы офтальмоскопической техники.....	24
2.1.Принцип работы офтальмоскопических систем .....	24
2.2. Методы устранения световых рефлексов .....	28
2.3. Методы измерения на глазном дне .....	32
2.4. Поляризационные офтальмоскопические приборы .....	34
2.5. Приборы для флуоресцентной ангиографии .....	38
2.6. Приборы для биомикроскопии глаза.....	40
3. Приборы для подбора и контроля средств коррекции зрения .....	44
3.1. Офтальмометры .....	44
3.2. Рефрактометры .....	48
3.3. Приборы для контроля средств коррекции зрения .....	49
4. Оптическая микроскопия.....	52
4.1.Оптическая схема, увеличение и разрешающая способность биологического микроскопа.....	52
4.2.Некоторые специальные приемы оптической микроскопии .....	56
5.Спектральный анализ в биомедицинских исследованиях .....	59
5.1.Абсорбционная спектроскопия. ....	59
5.2. Люминесцентная спектроскопия. ....	60
5.3.Спектрометрия химических элементов.....	61
6. Оптические квантовые генераторы в медицине.....	63
6.1.Свойства лазерного излучения.....	63

6.2. Особенности взаимодействия оптического излучения с биологическими системами ...	65
6.3. Механизмы взаимодействия лазерного излучения с живыми тканями .....	69
6.4. Лазеры и лазерные системы для диагностики биологических объектов .....	71
6.4.1. Газовые лазеры .....	72
6.4.2. Жидкостные лазеры на красителях.....	76
6.4.3. Твердотельные лазеры .....	77
6.4.4. Перестраиваемые лазерные источники света .....	79
7. Лазерные методы диагностики .....	80
7.1. Лазерные методы, основанные на упругом рассеивании света .....	80
7.1.1. Лазерная нефелометрия .....	80
7.1.2. Проточные анализаторы микрочастиц .....	82
7.2. Лазерная спектроскопия квазиупругого рассеяния .....	83
7.2.1. Измерение скоростей потоков жидкостей и газов при помощи лазерных доплеровских анемометров .....	83
7.2.2. Диагностика биологических объектов на основе регистрации скоростей направленного движения.....	85
7.2.3. Лазерная доплеровская спектроскопия живых клеток и диагностика внутриклеточной подвижности .....	86
7.3. Абсорбционные методы диагностики .....	88
7.3.1. Классификация абсорбционных методов диагностики .....	88
7.3.2. Абсорбционно-трансмиссионный анализ с использованием перестраиваемых лазеров.....	90
7.3.3. Абсорбционная спектроскопия быстропротекающих процессов.....	92
7.3.4. Классификация калориметрических методов диагностики .....	93

## 1.Офтальмологическая оптика

### 1.1.Оптическая система глаза и ее особенности

Глаз человека является своеобразным оптическим прибором, занимающим в оптике особое место. Это объясняется, во-первых, тем, что многие оптические инструменты рассчитаны на зрительное восприятие, во-вторых, глаз человека (и животного), как усовершенствованная в процессе эволюции биологическая система, приносит в рамках бионики некоторые идеи по конструированию и улучшению оптических систем.

#### 1.1.1.Строение глаза человека

Собственно глазом (рис.1.1) является глазное яблоко, имеющее не совсем правильную шаровидную форму: передне–задний (сагиттальный) размер у взрослого в среднем 24,3 мм, вертикальный — 23,4 мм и горизонтальный — 23,6 мм.

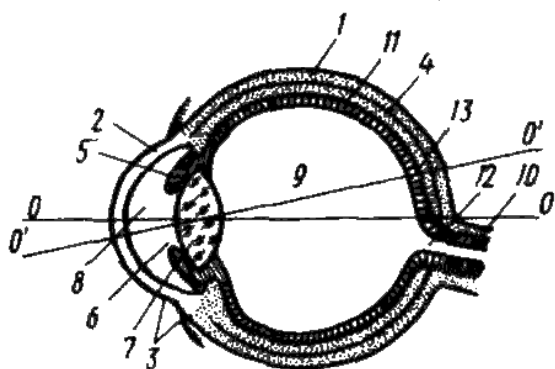


Рис.1.1 Строение глаза.

Стенки глаза состоят из трех concentрических оболочек: наружной, средней и внутренней. Наружная белковая оболочка — **склера** (1) в передней части глаза превращается в прозрачную выпуклую роговую оболочку — **роговицу** (2). По оптическим свойствам роговица, — наиболее сильно преломляющая часть глаза. Она является как бы окном, через которое в глаз проходят лучи света. Показатель преломления вещества роговицы  $n_{\text{рог.}}=1,38$ . Наружный покров роговицы переходит в **конъюнктиву** (3), прикрепленную к векам. К склере прилегает **сосудистая оболочка — хориоидея** (4), внутренняя поверхность которой выстлана слоем темных пигментных клеток, препятствующих внутреннему диффузному рассеянию света в глазу. В передней части глаза сосудистая оболочка переходит в **радужную оболочку** (5), в которой имеется круглое отверстие — **зрачок** (6). Непосредственно к зрачку с внутренней стороны глаза примыкает **хрусталик** (7) — прозрачное и упругое тело, подобное двояковыпуклой линзе. Показатель преломления вещества хрусталика  $n_{\text{хр.}}=1,45$ .

Между роговицей и хрусталиком расположена **передняя камера** глаза (8), она заполнена **водянистой влагой** — жидкостью, близкой по оптическим свойствам к воде. Вся внутренняя часть глаза от хрусталика до задней стенки занята прозрач-

ной студенистой массой, называемой *стекловидным телом* (9). Показатель преломления стекловидного тела такой же, как и у водянистой влаги:  $n_{ст.т.} = n_{вод.вл.} = 1.336$ .

*Зрительный нерв* (10) входит в глазное яблоко через заднюю стенку. Разветвляясь, он переходит в самый внутренний слой глаза – *сетчатку* – *ретину* (11), являющуюся световоспринимающим (рецепторным) аппаратом глаза. Сетчатка состоит из нескольких слоев и неодинакова по своей толщине и чувствительности к свету. В ней находятся светочувствительные зрительные клетки, периферические концы которых имеют различную форму. Продолговатые окончания называют палочками, конусообразные – колбочками. Длина палочек 60–80 мкм, диаметр около 1,8 мкм, для колбочек соответственно 35 и 5–6 мкм. На сетчатке глаза человека расположено около 130 млн. палочек и 7 млн. колбочек.

В месте вхождения зрительного нерва находится не чувствительное к свету *слепое пятно* (12). В середине сетчатки, чуть ближе к височной области, лежит самое чувствительное к свету *желтое пятно* (13), центральная часть которого имеет диаметр около 0,4 мм (это так называемая *макулярная область*).

Колбочки и палочки распределены по сетчатке неравномерно. Колбочки расположены главным образом в центральной части сетчатки, в желтом пятне, в центре желтого пятна находятся исключительно колбочки, на краях сетчатки – только палочки.

### 1.1.2. Характеристика основных элементов оптической системы глаза

**Роговица.** Диаметр роговицы взрослого человека колеблется от 10 до 12 мм. Роговица более выпукла, чем остальная поверхность глазного яблока. Радиус кривизны передней поверхности роговицы составляет в среднем 7,7 мм, задней поверхности – около 6,8 мм. Толщина роговицы в центре около 0,6 мм, на периферии – до 1 мм. Форма передней поверхности роговицы отличается от сферы. Со сферой практически совпадает только центральная часть диаметром около 4 мм. Дальше от центра появляется ряд неровностей, заметно уменьшается кривизна, что дало основание считать форму роговицы близкой к эллипсоиду или другой кривой второго порядка. К вопросу о форме роговицы мы вернемся при рассмотрении аберраций глаза, так как именно форма передней поверхности роговицы, граничащей с воздухом, больше всего влияет на сферическую аберрацию глаза.

Изолированная роговица, окруженная с обеих сторон воздухом, рассеивает свет, т. е. является отрицательной линзой. В живом глазу с воздухом граничит только передняя поверхность роговицы, задняя же соприкасается с водянистой влагой передней камеры, показатель преломления которой мало отличается от такового для роговицы. В этих условиях роговица работает как сильная собирающая линза, при этом переднее и заднее фокусные расстояния ее различаются:  $f = -17,1$  мм, а  $f' = 22,8$  мм. Преломляющая сила роговицы как составляющей оптической системы глаза, равна примерно 40Дптр.

**Хрусталик.** Хрусталик имеет форму двояковыпуклой линзы с закругленными краями. У детей он бесцветен и эластичен, у взрослых более упруг, к старости становится жестким, мутноватым, приобретает желтоватый оттенок. Хрусталик

образован прозрачными волокнами эпителия, более плотными в центральной части и более мягкими на периферии. В связи с этим *в середине ядра показатель преломления хрусталика выше, чем на периферии, на 1,5%*. Диаметр хрусталика 8–10 мм, радиус кривизны передней поверхности в среднем 10 мм, задней – 6 мм. Считается, что обе поверхности хрусталика представляют собой части правильной сферы. В действительности они ближе к кривым второго порядка. Кривизна обеих поверхностей в центре больше, чем на периферии, т. е., как и у роговицы, центральная часть хрусталика почти сферическая, а по краям уплощается.

Оптическая (преломляющая) сила изолированного хрусталика, составляет 102 дптр, фокусное расстояние его равно 9,8мм. Хрусталик, находящийся в естественных условиях, окруженный водянистой влагой и стекловидным телом, имеет фокусное расстояние 70 мм и оптическую силу всего 20 дптр.

Таким образом, несмотря на то, что изолированный хрусталик является более сильной положительной линзой, чем изолированная роговица, *элементом наибольшей оптической силы в глазу человека служит роговица.*

*Спектр пропускания* для различных глаз может отличаться весьма значительно. Зависит он и от возраста. Замечено, что к старости, когда хрусталик желтеет и пропускает меньше голубого и зеленого света, объекты представляются наблюдателю более желтыми. Этим иногда объясняют изменение цветовой гаммы в картинах в зависимости от возраста художника.

**Оболочки глаза.** Общеизвестна аналогия глаза и фотоаппарата. Так же как в фотоаппарате, в глазу отделы, функция которых заключается в формировании и приеме изображения, отделены от постороннего света «кожухом» – стенками глазного яблока. Стенки эти образуются тремя оболочками (рис.1): наружной (склера), средней –сосудистой (хориоидея) и внутренней–сетчаткой (ретины), служащей светочувствительным слоем.

Однако в отличие от фотокамеры, стенки которой совершенно непрозрачны и свет попадает на светочувствительный слой пленки только через объектив, оболочки глаза пропускают на сетчатку некоторую часть света не через зрачок, а через склеру – твердую соединительную оболочку толщиной от 0,5 до 1 мм. При освещении склеры очень ярким светом (например, при *диафаноскопии*) хорошо видно, как светится внутренняя поверхность глазного яблока. Этого света не хватает обычно для офтальмоскопии, но вполне достаточно для выявления опухолей и других изменений плотности, толщины и пигментации оболочек глаза. Такое различие в прозрачности “кожуха” глаза и фотокамеры является весьма существенным при рассмотрении глаза как оптической системы. Интересно также, что малая прозрачность глазного яблока обусловлена в основном оптической плотностью не склеры, а хориоидеи. Хориоидея – это мягкая сосудистая оболочка, состоящая из сети кровеносных сосудов, питающих глаз. Со стороны, обращенной к сетчатке, она покрыта слоем *пигментного эпителия*, служащего главной защитой глаза от постороннего света. Именно благодаря поглощению в пигментном эпителии внутренняя поверхность глазного яблока имеет очень малый коэффициент отражения (5–10%). В различных участках хориоидеи пигментация неодинакова.

Так, в области заднего полюса, где сосуды расположены гуще, пигментация сильнее, поэтому невооруженному глазу эта часть оболочки представляется пятнисто-коричневой. Темное пятно выделяется также в области центральной ямки. При увеличении, например при офтальмоскопии, здесь заметна мелкая пятнистость, вызываемая неодинаковой пигментацией клеток. Таким образом, *одно из существенных отличий оптической системы глаза от фотокамеры – частичная проницаемость оболочек глаза для света.* В результате этого, при определенных условиях возникают помехи в виде вуали, что снижает контрастность изображения на сетчатке.

## 1.2. Законы геометрической оптики в офтальмологии

При условиях, когда диаметр зрачка превышает 2мм, дифракционные эффекты отсутствуют, и процесс распространения света в оптической системе глаза вполне можно описать, основываясь на законах геометрической оптики. Рассмотрим наиболее характерные примеры применения (проявления) законов преломления и отражения света в офтальмологии.

**Рефракция (преломление) света.** Под преломлением света понимают изменение направления светового луча на границе раздела двух сред. В офтальмологии, в отличие от физики, вместо «преломления» используется термин «рефракция», что в переводе с латинского означает «ломать, разламывать». Рассмотрим рефракцию света в равнобедренной призме с малым углом при вершине (рис.2).

Призма изготовлена из стекла с показателем преломления  $n$  и находится в воздухе. Угол  $\theta$  при вершине призмы мал (меньше  $6^0$ ), что позволяет заменить значения тригонометрических функций на значения соответствующих углов, выраженные в радианах.

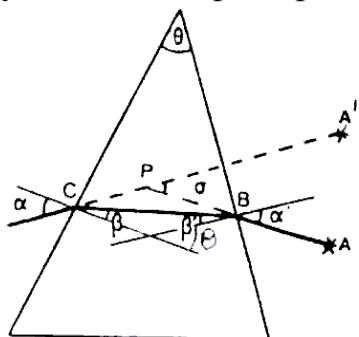


Рис.1.2. Ход лучей в призме.

Для расчета отклоняющего действия призмы запишем следующие уравнения:

$$\alpha/\beta = n; \quad \beta'/\alpha' = 1/n; \quad \theta = \beta + \beta'; \quad \varphi = \alpha - \beta + \alpha' - \beta'.$$

Решение этих уравнений позволяет получить формулу для угла отклонения света призмой:

$$\sigma = (n - 1)\theta. \quad (1.1)$$

Как видно из (1.1), отклоняющее действие данной призмы определяется только углом  $\theta$  и не зависит от угла падения светового луча. Это правило сохраняет свою силу при величине угла  $\theta$  не более  $6^0$ .

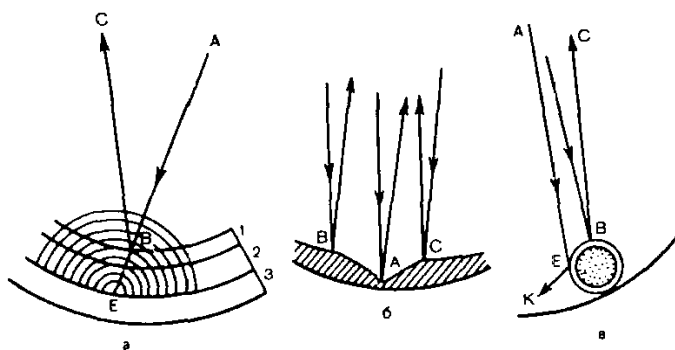
В офтальмологии сила рассмотренных призм измеряется в *призменных диоптриях*. Призма, обладающая силой в 1призменную диоптрию (1дптр  $\Delta$ ), отклоняет световой луч на 1см на расстоянии 100см от призмы. Призма в 2 и 3 дптр отклоняет луч на 2 и 3см на расстоянии 100см. Если необходимо вычислить угол

отклонения  $\varphi$  по значению призмных диоптрий ( $W$ ), то расчет выполняют по формуле  $\text{tg } \sigma = W/100$ .

Призмы с малым углом при вершине (призмные очки) используют для коррекции зрения в случае, если изображение объекта, создаваемое глазом, смещено вне области наилучшего зрения – макулы. Наборы пробных оптических линз обычно снабжают призматическими стеклами различной силы.

**Рефлексы (отражения) глазного дна.** В офтальмологии, в отличие от физики, вместо «отражения» используют термин «рефлексы». В объеме глазного яблока имеют место как зеркальные, так и диффузные рефлексы. При диффузном отражении каждая точка отражающей поверхности является источником вторичных волн, распространяющихся во всех направлениях. При этом значительная часть световой энергии поглощается поверхностью.

Рассмотрим рефлексы глазного дна, наблюдаемые при помощи офтальмоскопа (прибора для наблюдения глазного дна). Как известно, задний полюс глаза представлен тремя оболочками (рис.3,а): сетчаткой (1), сосудистой оболочкой (2) и склерой (3).



**Рис.1.3.** Диффузное отражение на глазном дне (а); зеркальное отражение на макулярной области (б); зеркальное отражение на сосуде (в).

На границе между стекловидным телом и сетчаткой лежит внутренняя пограничная мембрана – прозрачная пленка, плотно прилегающая к сетчатке и имеющая больший показатель преломления, чем стекловидное тело. Поэтому на границе между стекловидным телом и сетчаткой, а точнее между стекловидным телом и внутренней пограничной мембраной создаются условия для зеркального отражения. Луч АВ, падающий на глазное дно, частично отражается в направлении ВС. Основная же часть световой энергии распространяется глубже, проходит прозрачную сетчатку, сосудистую оболочку и достигает поверхности склеры. Каждую точку склеры, например т.Е, можно рассматривать как точечный источник диффузно отраженного света, распространяющегося в обратном направлении и проходящего через кровь сосудистой оболочки словно через красный фильтр. Таким образом, *при офтальмоскопии белым светом диффузно отраженный свет имеет красный тон, а свет, отраженный от зеркальной внутренней пограничной мембраны, остается белым.*

При офтальмоскопии большое внимание уделяют *рефлексам* глазного дна, создаваемым зеркально отраженным светом. Эти рефлексы несут информацию о природе явлений в сетчатке и собственно сосудистой оболочке.

**Рассмотрим некоторые рефлексы глазного дна.** Центральный отдел глазного дна имеет сложный рельеф, схематически показанный на рис.1.3,б. Макулярная

область (область желтого пятна) представлена воронкообразным углублением ВАС, в центре которого имеет углубление А с очень малым радиусом кривизны—центральная ямка желтого пятна. Свет от офтальмоскопа, падающий на середину центральной ямки, отражается в обратном направлении в сторону зрачка, поэтому врач замечает в середине центральной ямки светлое пятнышко – *фовеолярный рефлекс*. По краям макулярной области возвышение сетчатки выравнивается в плато, ширина которого у отдельных лиц варьирует и образует вал эллиптической формы. Отраженные от вала лучи обуславливают офтальмологическую картину *макулярного рефлекса*. При этом можно наблюдать наружный макулярный рефлекс—более широкое кольцо бликов.

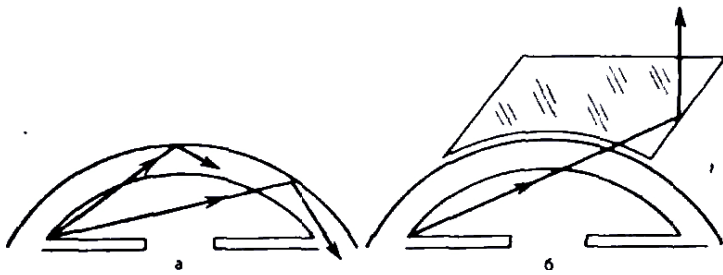
При патологических процессах на глазном дне нормальные рефлексы могут исчезать или появляются новые рефлексы в тех местах, где в норме их не наблюдают. Патологические рефлексы являются следствием изменения рельефа глазного дна. *Точечные рефлексы*, единичные или групповые, указывают на возвышение сетчатки, например, на наличие очага диффузного воспаления, а каждый рефлекс соответствует вершине возвышения. *Круговые и полукруговые рефлексы* образуются на границе возвышения и западения уровня сетчатки и т.д.

Зеркальное отражение создает рефлексы не только на сетчатке, но и на сосудах. На середине сосудов наблюдают *световые дорожки*, возникающие потому, что только здесь отраженные лучи направляются в обратном направлении к глазу наблюдателя (рис.1.3,в). Лучи, падающие на края сосудов, отражаются в разные стороны и не попадают в глаз наблюдателю. Следует отметить, что при расширенном зрачке создаются более благоприятные условия для выхода отраженных лучей из глаза, поэтому удается наблюдать большое количество более ярких рефлексов, как на сосудах, так и на сетчатке.

**Полное внутреннее отражение.** В офтальмологической технике широко используются оптические системы, работающие на основе полного внутреннего отражения. Примером могут служить различные призмы, световоды. Явление полного внутреннего отражения имеет место в тканях глаза и может играть положительную и отрицательную роль. В офтальмологии известен феномен *дирекционной чувствительности сетчатки*. Он состоит в том, что лучи, направленные вдоль оси колбочек, вызывают гораздо более сильное восприятие света, чем лучи идущие под значительные (более  $10^0$ ) углом к оси колбочек. Доказано, что показатель преломления вещества колбочки превышает показатель преломления окружающей жидкости в 1.022 раза. Таким образом, при малых углах падения, реализуется полное внутреннее отражение света от боковых поверхностей колбочки. Лучи, направленные под значительным углом к оси колбочки, рассеиваются в окружающей жидкости и не вызывают фотохимической реакции.

Полное внутреннее отражение является причиной того, что без специального оснащения мы не можем видеть детали угла передней камеры глаза. Лучи, выходящие из передней камеры глаза (рис.1.4,а), достигают передней поверхности роговицы под углом, превышающим предельный угол полного внутреннего отражения, поэтому они не выходят в глаз наблюдателю, а отражаются в сторону радужки. Угол передней камеры глаза можно рассмотреть при помощи *гониоскопа*

(рис.4,б), контактирующего с поверхностью роговицы и снимающего перепад показателя преломления для роговицы и воздуха.



**Рис. 1.4.** Полное внутреннее отражение луча, идущего от угла передней камеры глаза (а); ход луча при гониоскопии (б).

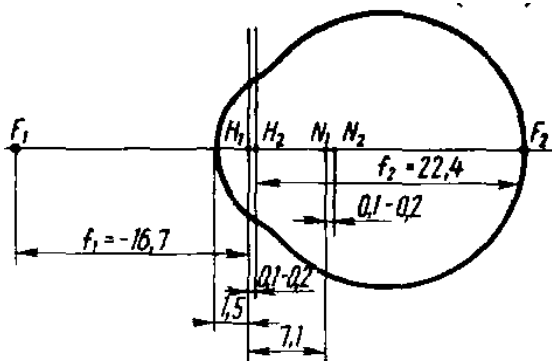
Луч от угла передней камеры глаза беспрепятственно проходит в корпус гониоскопа и, отразившись на его грани, направляется в глаз наблюдателя.

**Глаз как центрированная оптическая система.** Глаз может быть представлен как центрированная оптическая система, образованная роговицей, жидкостью передней камеры и хрусталиком (четыре преломляющие поверхности) и ограниченная спереди воздушной средой, сзади – стекловидным телом. Оптическая сила такой системы рассчитывается из формулы для сложной центрированной системы:

$$D = D_{\text{рог.}} + D_{\text{хр.}} - \frac{d}{n} D_{\text{рог.}} D_{\text{хр.}}, \quad (1.2)$$

где:  $d$  – оптический интервал (расстояние между второй главной плоскостью роговицы и первой главной плоскостью хрусталика);  $n$  – показатель преломления стекловидного тела;  $D_{\text{рог.}}$ ,  $D_{\text{хр.}}$  – оптическая сила роговицы и хрусталика.

Главная оптическая ось  $OO$  (рис.1.5) проходит через геометрические центры роговицы, зрачка и хрусталика.



**Рис.1.5.** Глаз как центрированная оптическая система.

Кроме того, различают еще *зрительную ось*  $O'O'$  глаза, которая определяет направление наибольшей светочувствительности и проходит через центры хрусталика и желтого пятна. Угол между главной оптической и зрительной осями составляет около  $5^\circ$ .

На рис.1.5 показаны фокусы, главные точки и плоскости, узловые точки и плоскости для некоторого усредненного нормального глаза (расстояния указаны в миллиметрах).

На практике строгий расчет центрированной оптической системы глаза часто заменяется более простыми моделями «схематического глаза».

**«Схематический глаз» по Гюльстранду.** Гюльстранд еще в 1909 г. создал модель глаза – «схематический глаз». Эта модель позволяет получать ориентиро-

точные данные о положении и величине изображения на сетчатке глаза, работающего как без каких-либо дополнительных систем, так и совместно с оптическими приборами. В модели использованы *усредненные значения* основных параметров глаза: показателей преломления прозрачных сред, их толщины (расстояния от вершины роговицы), радиусов кривизны поверхностей. Для большего упрощения расчета Гульстранд вычислил для «усредненного» глаза положения главных и узловых точек, переднее и заднее фокусные расстояния и преломляющую силу роговицы, хрусталика и полной системы глаза. Так как для глаза пространство предметов (воздух) и пространство изображений (среды глаза) заполнены веществами с различными показателями преломления, то главные и узловые точки не совпадают друг с другом, а переднее и заднее фокусные расстояния отличаются между собой. Узловые точки неаккомодированного глаза лежат на расстоянии 7 и 7,7 мм от вершины роговицы, главные точки - на расстоянии 1,35 и 1,65 мм от этой вершины.

**Редуцированный глаз.** Еще более упрощенной моделью является редуцированный глаз, в котором две главные точки заменены одной. В этом случае вся оптическая система глаза изображается эквивалентной системой, имеющей лишь одну преломляющую поверхность, которая разделяет две среды - воздух и стекло-видное тело. В часто используемом при расчетах редуцированном глазу по Вербицкому радиус кривизны роговицы  $r = 6,8$  мм, показатель преломления  $n = 1,4$ , а длина глаза - 23,4 мм. Следует отметить, что эти величины выбраны не совсем точно. Как редуцированный, так и «схематический» глаз по Гульстранду не воспроизводят aberrаций живого глаза. Усредненные aberrации реального глаза хорошо воспроизводятся моделью в том случае, если передняя поверхность роговицы принята параболоидом вращения.

Наибольшее преломление света в оптической системе глаза происходит на внешней границе роговицы. Оптическая сила роговицы равна приблизительно 40Дптр, хрусталика - около 20Дптр, а всего глаза - около 60Дптр. Значения фокусных расстояний глаза рассчитываются из соотношений

$$f_1 = 1/D; \quad f_2 = n_{ст.т.}/D, \quad (1.3)$$

где  $f_1$  и  $f_2$  – передний и задний фокусы глаза.

Различно удаленные предметы должны давать на сетчатке одинаково резкие изображения. Из формулы

$$f_1 / a_1 + f_2 / a_2 = 1 \quad (1.4)$$

видно, что это можно осуществить либо изменяя расстояние  $a_2$  между главной плоскостью и сетчаткой аналогично тому, как это делают в фотоаппаратах, либо изменяя кривизну хрусталика и, следовательно, фокусные расстояния  $f_1$  и  $f_2$ . Поскольку расстояние от объекта до глаза обычно значительно превышает величину фокусного расстояния глаза ( $a_1 \gg f_1$ ), то  $a_2 \cong f_2$ . Таким образом, резкость изображения в плоскости сетчатки устанавливается путем изменения фокусного расстояния  $f_2$ , что обеспечивается изменением радиуса кривизны хрусталика.

**Диоптрика.** В офтальмологии для оценки оптической силы линз, призм и других преломляющих поверхностей используют диоптрийные единицы. Для линз

величина, выражающая преломление в диоптриях, обратно пропорциональна фокусному расстоянию, выраженному в метрах. Если преломляющая поверхность не является линзой, то диоптрия обратно пропорциональна характерному расстоянию (расстоянию схождения лучей, расстоянию отклонения лучей в призме и т.п.).

### 1.3. Функции зрения

Основными функциями зрения являются: аккомодация, адаптация (световая чувствительность), свето- и цветоощущение, острота зрения, поле зрения, бинокулярное стереоскопическое зрение.

**Аккомодация.** *Способность глаза давать на сетчатке резкие изображения предметов, находящихся на различных от него расстояниях, называют аккомодацией.* Кривизна преломляющих поверхностей хрусталика изменяется в процессе аккомодации под воздействием аккомодационной мышцы. Пределы аккомодации глаза, обеспечивающие возможность ясного видения различно удаленных объектов, ограничивают ближайшей и дальнейшей точками ясного видения. Положение *ближайшей точки ясного видения* характеризуется наименьшим расстоянием  $a_1$ , ближе которого глаз уже не может отчетливо видеть объект при наибольшем напряжении аккомодационной мышцы. Положение *дальнейшей точки ясного видения* характеризуется наибольшим расстоянием  $a_2$ , с которого глаз способен отчетливо видеть объект при полном покое аккомодационной мышцы. Расстояние между ближайшей и дальнейшей точками ясного видения глаза, выраженное в диоптриях и определяющее предел аккомодации глаза, называют *объемом аккомодации*:

$$A = 1/a_1 - 1/a_2 = A_1 - A_2. \quad (1.5)$$

Когда предмет расположен в бесконечности, то его изображение в нормальном глазу находится на сетчатке. Хрусталик при этом аккомодирован на бесконечность и его оптическая сила наименьшая. Если предмет приближается к глазу, то у хрусталика увеличивается кривизна; чем ближе предмет, тем больше оптическая сила глаза, ее изменения происходят приблизительно в пределах 60–70 Дптр.

У взрослого здорового человека при приближении предмета к глазу до расстояния 25 см аккомодация совершается без напряжения глаз чаще всего аккомодирует именно на это расстояние, называемое *расстоянием наилучшего зрения*.

Для рассматривания еще более близких предметов приходится уже напрягать аккомодационный аппарат. Наиболее близкое расположение предмета от глаза, при котором еще возможно четкое изображение на сетчатке, называют *ближней точкой глаза* (ближняя точка ясного видения). Расстояние до ближней точки глаза с возрастом увеличивается, то есть глубина аккомодации уменьшается.

**Адаптация.** Световая чувствительность определяется палочками и колбочками. Роль палочек и колбочек различна. Палочки при сумеречном освещении образуют особое вещество – зрительный пурпур, которое разлагается при воздействии сильного света. Палочки не воспринимают различия цветов. Колбочки менее чувствительны к свету и приспособлены к яркому освещению, когда палочки не функционируют. Колбочки воспринимают различные цвета и приспособлены к

дневному зрению. При воздействии сильного света в одном из слоев сетчатки-пигментном начинают перемещаться пигментные зерна, которые поглощают свет и тем самым предохраняют глаз от ослепления. *Способность глаза приспособливаться (видеть при различных освещенностях) называется адаптацией.* Время световой адаптации составляет около 5 мин, а темновой – от 30 до 60 мин.

**Свето- и цветоощущение.** Под *светоощущением* понимают способность глаза воспринимать световое излучение интегральное по всем длинам волн, а под *цветоощущением* – способность глаза различно реагировать на раздражение сетчатки световыми волнами различной длины. График спектральной чувствительности глаза известен. Он локализован в области от 400 до 700 нм и имеет максимум на длине волны 555 нм. При слабом освещении (в темноте) максимум спектральной чувствительности глаза смещен в синюю область (510 нм) и объект виден в сине-сером цвете.

**Острота зрения.** Размер изображения на сетчатке зависит не только от размера предмета, но и от его удаления от глаза, т.е. от угла, под которым виден предмет. В связи с этим вводят понятие *угла зрения*. Это угол между лучами, идущими от крайних точек предмета через совпадающие узловые точки (рис.6). Из рисунка видно, что, во-первых, один и тот же угол зрения  $\beta$  может соответствовать разным предметам  $KM$  и  $QP$ , и, во-вторых, что угол зрения вполне определяет размер изображения на сетчатке:

$$b = l\beta, \quad (1.6)$$

где  $l$  — расстояние между единой узловой точкой  $N$  и сетчаткой ( $l \cong 17$  мм). Формула (6) получена в предположении, что угол зрения мал.

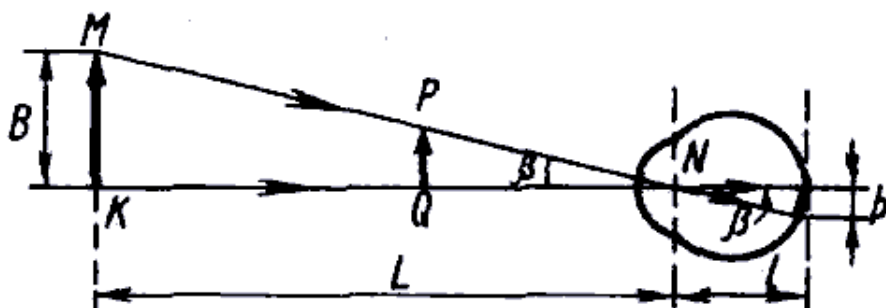


Рис.1.6. К рассмотрению угла зрения.

Из рис.1.6 легко установить связь между размером  $B$  предмета, расстоянием  $L$  его от глаза, точнее от узловых точек, и углом зрения  $\beta$ :

$$B = L\beta. \quad (1.7)$$

С учетом (1.6) и (1.7), получим соотношение для расчета размеров изображения

$$b = lB/L. \quad (1.8)$$

Для характеристики разрешающей способности глаза используют *наименьший угол зрения*, при котором человеческий глаз еще различает две точки предмета. Этот угол приблизительно равен  $1'$ , что соответствует расстоянию  $B$  между точками, равному 70 мкм, если они находятся на расстоянии наилучшего зрения. Размер изображения  $b$  на сетчатке в этом случае равен 5 мкм, что соответствует *среднему расстоянию между двумя колбочками на сетчатке*. Поэтому если изображение двух точек на сетчатке займет линию короче 5 мкм, то эти точки не раз-

решатся, т.е. глаз их не различает.

Такое же значение наименьшего угла зрения будет получено, если учесть ограничения, которые накладывает дифракция света. Поражает целесообразность природы — ничего лишнего: *число колбочек, приходящихся на единицу площади сетчатки, отвечает предельным возможностям геометрической оптики.*

В медицине разрешающую способность глаза оценивают **остротой зрения**. За норму остроты зрения принимается единица, в этом случае наименьший угол зрения равен 1'.

При отклонениях острота зрения во столько раз меньше нормы, во сколько раз наименьший угол зрения больше минуты. Если наименьший угол зрения равен 4', то острота зрения равна  $1:4=0,25$ .

В отдельных случаях глаз человека различает и более мелкие величины, чем те, которые соответствуют углу 1'. Так, например, смещение движущихся предметов заметно, когда оно достигает 20" по дуге, несовпадение двух тонких линий обнаруживается уже при угле 12" между ними и т.д.

Из-за неравномерного распределения палочек и колбочек по сетчатке разрешающая способность (острота зрения) будет также изменяться и резко падать при удалении от желтого пятна к периферии, где она очень незначительна. Разрешающая способность глаза зависит также от диаметра зрачка глаза (чем больше диаметр зрачка, тем меньше острота зрения), от контрастности предмета и фона и от освещенности (оптимальная освещенность 150-300лк).

**Поле зрения.** Совокупность точек пространства, воспринимаемых глазом одновременно, называется полем зрения. Статическая граница поля зрения для неподвижного глаза: 60° вверх, 75° вниз, 60° внутрь и 100° наружу. При этом в поле зрения различают три зоны: центральная зона; зона ясного зрения и зона периферического зрения. Однако, в процессе зрения глаз не остается неподвижным и поэтому часть пространства, охватываемая центральной зоной зрения, значительно больше.

**Бинокулярное стереоскопическое зрение.** Поле зрения, видимое одновременно двумя глазами, называется бинокулярным. Величины объектов и их взаимное расположение определяются одним глазом ориентировочно по изменению величины аккомодации и яркости. Восприятие глубины пространства двумя глазами дает точное представление о размерах и взаимном расположении объектов в пространстве. Чувствительность при зрении двумя глазами очень велика. Так при величине углового параллакса больше 10" можно судить о различии расстояния между двумя точками.

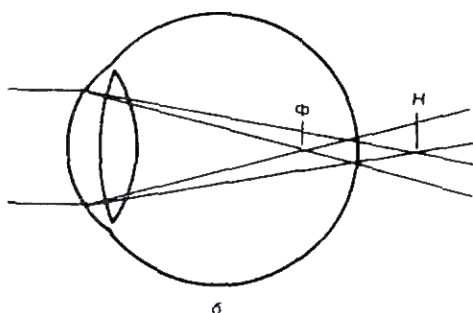
#### 1.4. Аберрации оптической системы глаза

В этом параграфе речь будет идти об основных оптических несовершенствах здорового глаза.

**Хроматическая аберрация.** Она обусловлена неодинаковым коэффициентом преломления лучей с различной длиной волны. Коротковолновые (фиолетовые) лучи преломляются сильнее, чем длинноволновые (красные), вследствие чего на сетчатке отсутствует точечный фокус (рис.1.7). Если фокус синих лучей совмес-

титель с сетчаткой, то изображение точки будет окружено красным ореолом. И, наоборот, при совмещении с экраном фокуса красных лучей, изображение точки будет окружено синим ореолом. Наименьшие круги светорассеяния и наилучшее качество изображения возникают в том случае, если плоскость изображения располагается между фокусами красных и фиолетовых лучей.

Выраженность хроматической aberrации пропорциональна диаметру зрачка. Оценка влияния хроматической aberrации на качество изображения человеческого глаза связана с определенными трудностями, например с неодинаковым поглощением средами глаза различных монохроматических лучей. Влияние хроматической aberrации зависит также от вида используемого освещения, а при естественном освещении—от погоды и времени суток, так как указанные условия определяют спектральный состав дневного света.



**Рис.1.7.** Формирование фокуса на сетчатке при хроматической aberrации.

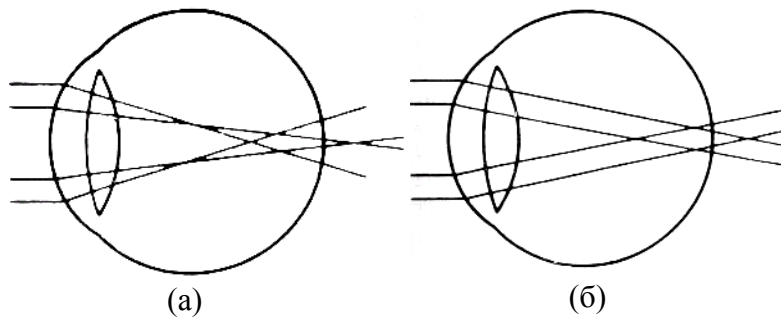
Разница между положением фокусов  $\Delta f$  для фиолетовых и красных лучей в 1,3Дптр ( $\Delta f \cong 0.4\text{мм}$ ) была достаточно точно установлена еще Т. Юнгом. Если на сетчатке фокусируются лучи, относящиеся к середине спектра, то образуются *круги светорассеяния*. Однако светорассеянию вследствие хроматической aberrации не придается особого значения, поскольку световая энергия в кругах светорассеяния распределяется крайне неравномерно. Расчеты показывают, что при диаметре зрачка 2 мм 70% световой энергии концентрируются на поле диаметром всего 5 мкм.

Хроматическая aberrация не оказывает существенного влияния на центральное зрение. Определение остроты зрения в монохроматическом свете, а также использование специальных оптических систем, исправляющих хроматическую aberrацию глаза, не способствовали существенному повышению центрального зрения.

**Сферическая aberrация.** Под сферической aberrацией понимают различную силу преломления лучей, проходящих через центральные и периферические отделы оптической системы или какой-либо преломляющей поверхности. Например, лучи, идущие через периферический отдел обычной двояковыпуклой линзы, имеют более короткое фокусное расстояние по сравнению с лучами, проходящими ближе к оптической оси (рис.1.8). Чем шире диаметр диафрагмы, тем больше отрицательное действие сферической aberrации на качество изображения.

Следует отметить, что понятие «сферическая aberrация», часто используемое в литературе по офтальмологии, к человеческому глазу неприменимо. Это объясняется, прежде всего, тем, что эта aberrация, как правило, несферическая, так как она выражена в неодинаковой степени в различных меридианах и даже пределах

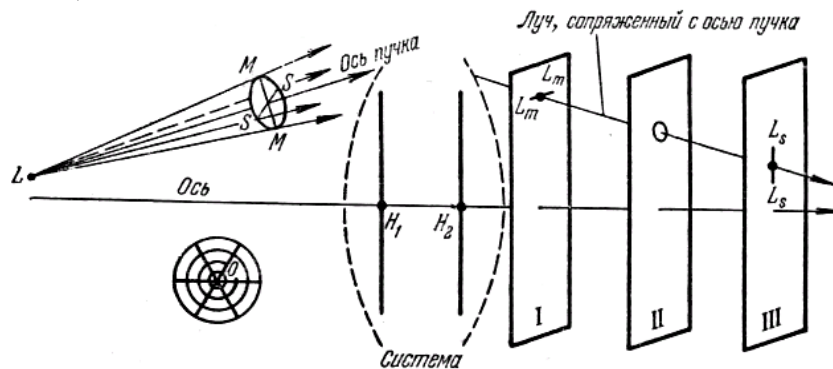
одного меридиана в противоположных направлениях от оптической оси, например, влево и вправо от нее.



**Рис.1.8.** Ход лучей при сферической аберрации по правилу(а) и против правила(б).

Кроме того, глаз человека наделен способностью, не свойственной искусственным оптическим системам. Она выражается в том, что периферические зоны оптической системы глаза имеют более слабую рефракцию, чем центральные, в связи с наличием ядра хрусталика с большим показателем преломления. Таким образом, сферическая аберрация, присущая искусственным оптическим линзам, в человеческом глазу представлена в искаженном виде: она асимметрична, т. е. по сути, является *сферической аберрацией против правила*. Ход лучей с учетом сферической аберрации против правила показан на рис.8,б. Принимая во внимание широкое распространение термина «сферическая аберрация» и используя его для обозначения неадекватного преломления в центре и на периферии, необходимо помнить о своеобразии этого феномена в человеческом глазу.

**Физический астигматизм** – это астигматизм наклонных пучков. Он заключается в том, что лучи одного и того же пучка, исходящие из точки и идущие в двух взаимно перпендикулярных плоскостях, после преломления в линзе, теряя гомоцентричность, не собираются в точку, а образуют две точки схода. Представим себе пучок лучей, исходящих из т.  $L$  и падающий на оптическую систему под углом к ее оси. Рассмотрим лучи как бы выделенные узкой крестообразной диафрагмой, кресты которой направлены вдоль меридиональной и сагиттальной плоскостей (рис.1.9).



**Рис.1.9.** Астигматизм наклонных пучков (LMM-меридиональное сечение; LSS-сагиттальное сечение).

Из такой диафрагмы выйдет плоская ленточка лучей  $MM$  и  $SS$ , расположенных в соответствующих плоскостях. Эти ленточки лучей из-за различия кривизны по двум взаимно перпендикулярным направлениям преломляются по-разному, и в результате изображением  $L$  становятся две линии  $L_m L_m$  и  $L_s L_s$  на двух взаимно перпендикулярных фокальных плоскостях I и III. Причем эти две фокальные плоскости не совпадают. В плоскости II, расположенной между этими фокальными плоскостями изображение точки имеет вид эллипса. Следовательно, в случае астигматизма наклонных пучков изображение точки имеет вид *пятна рассеяния*, форма которого зависит от положения экрана наблюдателя.

**Физиологический астигматизм.** *Под физиологическим следует понимать такой астигматизм оптической системы глаза, при котором сохраняется нормальная острота зрения и не возникают астенотические (болезненные) явления.* Физиологический астигматизм свойствен каждому глазу и обусловлен несколькими основными факторами: астигматизмом косо падающих лучей, асферичностью преломляющих поверхностей, децентрованием преломляющих поверхностей и неравномерностью оптической плотности преломляющих сред. Коротко характеризуем эти факторы.

1. Астигматизм косо падающих лучей (наклонных пучков) связан с несовпадением оптической и зрительной осей. В глазу человека угол между зрительной и оптической осями в среднем составляет  $5^\circ$ , что обуславливает астигматизм наклонных пучков в 0,5 дптр. Предметы, которые проецируются на периферию сетчатки, подвержены гораздо большему влиянию астигматизма косо падающих лучей.

2. Преломляющие поверхности роговицы и хрусталика не имеют правильной сферической формы. Астигматизм роговицы нормальных глаз не превышает 1 дптр, и причина его возникновения заключается в деформации глазного яблока в связи с неравномерностью роста последнего. Астигматизм роговицы в течение жизни претерпевает изменения. Кроме того, форма роговицы может изменяться под влиянием физиологических факторов. Например, прищуривание вызывает деформацию роговицы и усиление преломления в горизонтальном меридиане иногда до 1–1,5 дптр.

Хрусталиковый астигматизм находится в пределах 0,5–0,6 дптр. Установлено, что роговичный астигматизм в определенной мере корригируется хрусталиковым астигматизмом, который, по-видимому, имеет динамическую природу, т. е. обусловлен неравномерным напряжением ресничной мышцы.

3. Несовпадение оптической и зрительной осей касается ориентации всей оптической системы глаза относительно положения центральной ямки. Кроме того, преломляющие поверхности хрусталика не центрированы относительно положения преломляющих поверхностей роговицы. В смещении хрусталика имеют значение два обстоятельства: поворот на  $3-5^\circ$  вокруг вертикальной оси и на  $0-3^\circ$  вокруг горизонтальной оси. При этом нередко оптическая ось хрусталика расположена под углом свыше  $10^\circ$  к оси роговицы.

4. Преломляющие среды глаза представлены живыми тканями, не обладающими идеальной прозрачностью и гомогенностью. Это обстоятельство способствует

ухудшению качества изображения на глазном дне. Гельмгольц впервые описал *лучистые фигуры светорассеяния* в условиях оптимальной коррекции. По его мнению, *лучистая структура фигур светорассеяния является выражением дельчатости преломляющих сред*. Плотность хрусталика неоднородна в центре и на периферии, особенно у лиц зрелого и пожилого возраста.

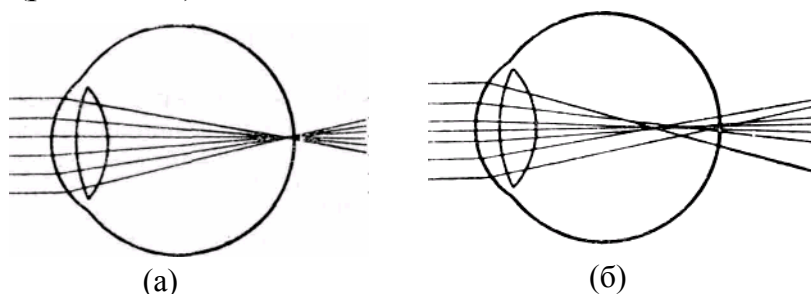
Исследования показывают, что *структура физиологического астигматизма меняется беспорядочно*. Это означает, что различные элементы зрачковой области характеризуются несистематическим изменением преломления.

*Беспорядочность структуры физиологического астигматизма обуславливает невозможность корригирования его цилиндрическими или контактными линзами*. Последние способны исправить роговичный астигматизм, но хрусталиковый компонент физиологического астигматизма приобретает существенную значимость и его эффект при использовании контактных линз сохраняется в полной мере.

Описанные выше оптические недостатки глаза человека суммируются, частично компенсируют друг друга и в конечном счете формируют оптическое несовершенство, обозначаемое как *физиологический астигматизм*.

Установлена четкая зависимость между степенью физиологического астигматизма и остротой центрального зрения.

**Качество изображения на сетчатке.** Лучи света, пройдя оптическую систему глаза и преломившись в ней, сходятся в фокусе. Если бы глаз обладал идеальной оптической системой, лучи от светящейся точки, расположенной в пространстве перед глазом, пересекались бы в фокусе—точке бесконечно малой величины (рис.1.10,а) и на сетчатке возникало бы идеальное по качеству изображение.



**Рис.1.10.**Ход лучей в схематическом глазу (а) и в глазу с физиологическим астигматизмом (б).

Даже в схематическом глазу с его сферическими и центрированными преломляющими поверхностями при положении фокуса на сетчатке образуются круги светорассеяния диаметром 4–6 мкм. В живом глазу, наделенном большим числом оптических несовершенств, среди которых наибольшее значение имеет физиологический астигматизм, в области фокуса происходит беспорядочное преломление лучей с образованием гораздо больших по диаметру фигур светорассеяния (рис.1.10,б). Критерием качества изображения на сетчатке является диаметр фигур светорассеяния, а также характер распределения освещенности на площади этих фигур. Чем больше фигуры светорассеяния, тем более расплывчатым оказывается ретиальное изображение рассматриваемых объектов.

**Глубина фокусной области.** Предположим, что задний фокус совпадает с сетчаткой. Это не означает, что легкие смещения фокуса кпереди и кзади обязательно приведут к ухудшению качества изображения. Каждая оптическая система об-

ладает глубиной фокусной области, под которой понимают небольшой отрезок прямой, лежащий на оптической оси в области фокуса, в пределах которого смещения экрана (сетчатки) не вызывают изменения качества изображения. Глубина фокусной области в глазу человека считалась настолько ничтожной, что ей не придавалось никакого значения. Например, в справочнике М. Я. Кругера (1968) указывается, что при диаметре зрачка 4 мм глубина фокусной области равна 0,031Дптр. В клинических условиях величина глубины фокусной области фактически не учитывалась. Следует подчеркнуть, что расчет глубины фокусной области производили на основе схематического глаза. В человеческом глазу фокусная область представляет собой узел беспорядочного пересечения лучей. Выше уже упоминалось о минимальных фигурах светорассеяния, т. е. о поперечных сечениях фокусной области. Теперь рассмотрим продольный разрез фокусной области—ее глубину. Если сделать большое число сечений фокусной области, то мы получим серию фигур светорассеяния неправильной формы (рис.11).

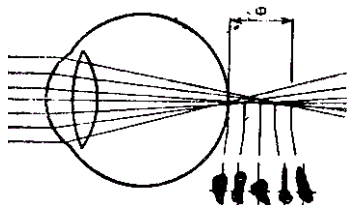


Рис.1.11. Структура фокусной области (Ф).

В середине будут располагаться близкие по величине, форме и распределению световой энергии фигуры светорассеяния. Теоретически из всех сечений фокусной области можно найти одно, которое обеспечивает самые благоприятные условия для качества ретинального изображения. Если сетчатка займет положение этого сечения, то острота зрения должна быть самой высокой. Легкое смещение фокусной области кпереди или кзади приводит к изменению фигур светорассеяния, но столь незначительному, что практически качество изображения остается неизменным. Острота зрения может ухудшаться, например с 1,35 до 1,32, однако в целом условия центрального зрения сохраняются в таком диапазоне, который находится вне пределов индивидуальной чувствительности человека и не воспринимается как снижение зрения.

Сколько глаз, столько же наблюдают всевозможных сочетаний мелких оптических несовершенств и столько же вариантов пересечения лучей в фокусной области. Более того, физиологические изменения роговичного астигматизма при мигании изменяют структуру пересечения лучей в течение часов и даже минут. Структура фокусной области изменяется при малейшем напряжении или расслаблении аккомодации, что связано с перестройкой внутри хрусталикового преломления светового пучка. Изменение анатомо-оптической структуры глаза в возрастном аспекте обуславливает изменение фокусной области в течение жизни.

Зрачок, ограничивая диаметр пучка лучей, входящих в глаз, оказывает большое влияние на формирование узла световых лучей в фокусной области. Показано, что при уменьшении диаметра зрачка фокусная область удлиняется. Глубину фокусной области обычно определяют экспериментально. Например, при диаметре зрачка 2мм она составляет 0.88–1.0мм, а при диаметре зрачка 6мм— 0.30–0.36мм.

Анализируя влияние глубины фокусной области на качество зрения, следует иметь в виду следующее. В отличие от светочувствительной пластинки фотокамеры рецепторный слой сетчатки значительно растянут в глубину. Толщина световоспринимающего слоя равна примерно 0,06мм. Смещение плоскости изображения в этих пределах не должно быть воспринято глазом, что дает эффект глубины фокуса до 0,2Дптр.

### 1.5. Клиническая рефракция глаза

В зависимости от положения заднего фокуса относительно сетчатки в состоянии покоя аккомодации различают три вида клинической рефракции: эметропию, миопию и гиперметропию. Фокусную область обозначим как **клинический фокус**. Глубину и ширину клинического фокуса определяют оптические аберрации. Если глаз наделен физиологическим астигматизмом, то клинический фокус имеет характеристики, свойственные нормальному глазу. В случае оптических аберраций, превышающих физиологический уровень, в глазу формируется ненормальный клинический фокус—более широкий и более вытянутый вдоль оптической оси.

*Под эметропией следует понимать такой вид рефракции, при котором клинический фокус совпадает с сетчаткой.* Так как клинический фокус обладает определенной протяженностью, то бывает несколько вариантов эметропии: сетчатка пересекает клинический фокус посередине, ближе к его заднему или переднему краю.

При **миопии** клинический фокус располагается перед сетчаткой, а оптическая система представляет собой сложный миопический астигматизм. При **гиперметропии** клинический фокус вынесен за сетчатку, а оптическая система представлена сложным неправильным астигматизмом.

**Астигматизм.** Астигматизм не выделяется в отдельный вид клинической рефракции, однако, имеет большое клиническое значение. Теоретической моделью хода лучей в астигматическом глазу считают коноид Штурма, показанный на рис.1.12.

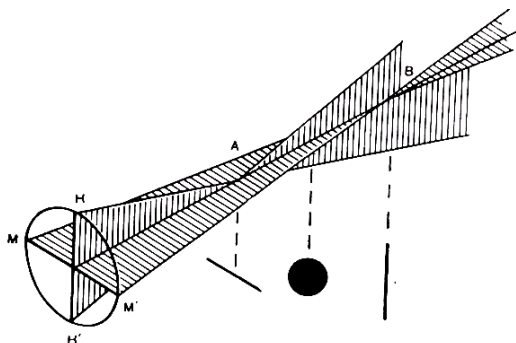


Рис.1.12 . Коноид Штурма.

Коноид имеет два главных сечения  $KK'$  и  $MM'$ . Щелевой пучок света, проходящий в глаз соответственно сильному в оптическом отношении сечению  $KK$ , преломляется в точке  $A$ . Щелевидный пучок света, проходящий в оптически слабом

сечении  $MM'$ , преломляется в точке В. Если в глаз направить пучок света через весь зрачок, а сетчатку разместить соответственно в точке А, возникает изображение горизонтальной линии – передней фокальной линии. Если сетчатка пересекает т.В, то получается изображение вертикальной линии – задней фокальной линии. При движении сетчатки от т.А к т.В на ней образуются эллипсы, а посередине между точками – правильный круг светорассеяния.

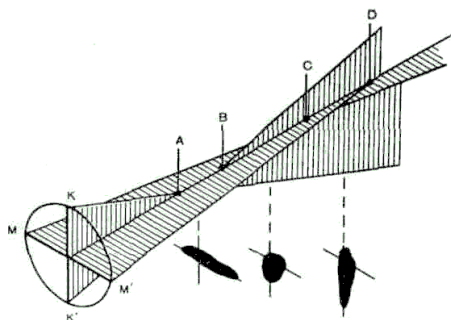
**Коррекцию астигматизма**, согласно коноиду Штурма, следует представлять таким образом. Цилиндрическое стекло должно по силе строго соответствовать степени астигматизма, а ось цилиндрического стекла – точно совпадать с одним из главных сечений астигматического глаза. Соблюдение указанных условий позволяет создать точечный фокус и обеспечить нормальную остроту зрения. В цилиндрической линзе, как и в астигматическом глазу, имеет место плавный переход рефракции от одного меридиана к другому.

Опыт показывает, что коноид Штурма лишь приближенно отражает структуру астигматизма живого глаза. Основные отличия астигматического глаза от коноида Штурма состоят в следующем:

- в пределах одного меридиана рефракция имеет различные значения;
- перепад преломления от одного меридиана к другому происходит не плавно, а скачкообразно.

Каждый астигматический глаз обладает неповторимыми особенностями. В центральных и периферических отделах оптической системы структура астигматизма может существенно отличаться.

Принимая во внимание недостатки коноида Штурма, рассмотрим коноид, позволяющий более точно представить ход лучей в астигматическом глазу. В модифицированном коноиде (рис.1.13) имеется два главных сечения  $MM'$  и  $KK'$ . Вследствие неравномерности преломления в вертикальном главном сечении  $KK'$  целевидный пучок света преломляется не в одной точке, как это имеет место в коноиде Штурма, а на отрезке оптической оси АВ. Аналогичное положение складывается для лучей, проходящих через горизонтальное главное сечение  $MM'$ . Они пересекутся на отрезке оптической оси CD. Если в глаз направить свет через весь зрачок и разместить сетчатку где-то между точками А и В, то получится изображение горизонтально расположенной полосы, ширина которой может быть больше или меньше в зависимости от степени неравномерности преломления в вертикальном сечении.



**Рис.1.13.** Модифицированный коноид Штурма с учетом компонента неправильного астигматизма.

Чем больше неравномерность преломления, тем больше дистанция между точками А и В и тем шире передняя фокальная полоса. При положении сетчатки в любой точке между пунктами С и D получим изображение вертикальной полосы, ширина которой обусловлена степенью неравномерности преломления в вертикальном сечении. Перемещение сетчатки от одной фокальной полосы к другой приводит к образованию асимметричных фигур светорассеяния.

Действие корригирующего цилиндра сводится к тому, что преломление двух главных сечений выравнивается. На коноиде это выражается в совмещении отрезков АВ и CD, а результате чего образуется одна зона беспорядочного пересечения лучей—клинический фокус. Цилиндрическое корригирующее стекло по своим оптическим характеристикам соответствует коноиду Штурма и приспособлено для коррекции только идеально правильного астигматизма. Как бы тщательно не подбиралась цилиндрическая линза, она способна нейтрализовать только правильный астигматизм. Неправильный компонент астигматизма полностью сохраняет свое отрицательное влияние на изображение на сетчатке.

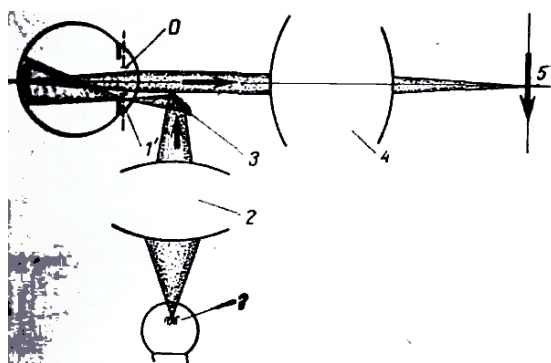
## 2. Основы офтальмоскопической техники

### 2.1. Принцип работы офтальмоскопических систем

Офтальмоскопия – это наблюдение глазного дна. Строение глазного яблока таково, что дно нормального глаза можно увидеть без каких либо дополнительных оптических устройств. Действительно, в плоскости, на которую в данный момент глаз аккомодирован, всегда расположено очень слабое по яркости изображение глазного дна. Проблема состоит лишь в том, что яркость изображения глазного дна недостаточна для наблюдения.

Очевидно, что наблюдение глазного дна требует таких условий освещения, при которых обеспечивается максимальное попадание светового потока внутрь глаза. Это требование выполняется специальными приборами для исследования глазного дна (офтальмоскопами). Приборы обеспечивают также минимальное попадание в наблюдательную систему светового потока, отраженного роговицей и другими поверхностями сред исследуемого глаза.

**Основные особенности офтальмоскопических систем.** Под офтальмоскопическими системами подразумевают как визуальные, так и фотографические системы для исследования глазного дна. Любая офтальмоскопическая система (рис.2.1) включает в себя два канала –осветительный (2) и канал (4), формирующий изображение глазного дна, для краткости в дальнейшем будем называть его **оптическим**. Поток от источника света (1) пройдя канал 2, входит через зрачок в глаз и освещает глазное дно. Свет, падающий на глазное дно, частично поглощается его тканями, частично отражается от них (в основном диффузно), выходит обратно через зрачок глаза и попадает в оптический канал (4), который формирует изображение глазного дна на приемнике излучения.

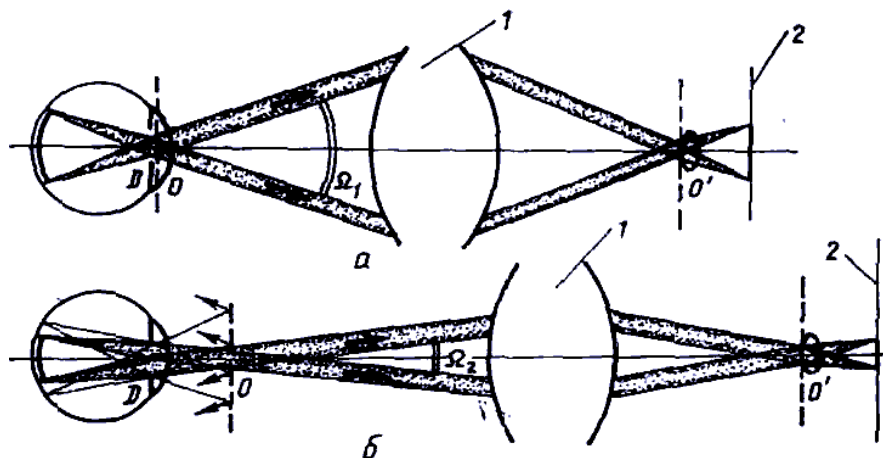


**Рис.2.1.** Принципиальная схема прибора для исследования глазного дна.

1-источник света; 2-осветительный канал; 3 - разделительное зеркало; 4-оптический канал, формирующий изображение глазного дна (с фокусировкой для аметропических глаз); 5 - приемник излучения: глаз наблюдателя, фотопленка или веб-камера для наблюдения глазного дна; O – входной зрачок прибора; 1' - изображение источника света, служащее выходящим зрачком осветительного канала.

**Оптический канал.** Принципиальная схема оптического канала приведена на рис.2.2. Без исследуемого глаза оптическая система офтальмоскопа представляет собой оптическую систему с повышенным диапазоном фокусирования. В рабочем состоянии к этой системе подключается оптическая система исследуемого глаза. Совместно эти две системы работают как микроскоп с малым увеличением или сильная лупа. Входной зрачок офтальмоскопа вынесен вперед, в процессе работы он должен быть совмещен с плоскостью зрачка исследуемого глаза. Только при

этом условии может быть использовано все поле зрения прибора. При удалении входного зрачка офтальмоскопа от исследуемого глаза поле срезается и наблюдатель может осмотреть все поле, только перемещая глаз в плоскости выходного зрачка офтальмоскопа. Такое наблюдение называют наблюдением по методу замочной скважины. Оно снижает эксплуатационные качества прибора, однако иногда применяется для упрощения конструкции, например в ручных офтальмоскопах.



**Рис.2.2.** Схема оптического канала офтальмоскопа

1- оптическая система (офтальмоскопическая линза); 2 - приемник излучения: глаз наблюдателя, экран или фотопленка; O - входной зрачок офтальмоскопа; O' - выходной зрачок офтальмоскопа; D - зрачок исследуемого глаза;  $\Omega$  - угол поля зрения.

а - правильное положение: входной зрачок офтальмоскопа O совпадает с плоскостью зрачка исследуемого глаза (а приемнике изображается все поле  $\Omega_1$ , обеспечиваемое системой);

б - неправильное положение: офтальмоскоп слишком удален от исследуемого глаза, его входной зрачок O не совпадает со зрачком глаза. Во входной зрачок офтальмоскопа попадает только часть светового потока, идущего от глазного дна. На приемнике изображается только часть поля  $\Omega_2$ .

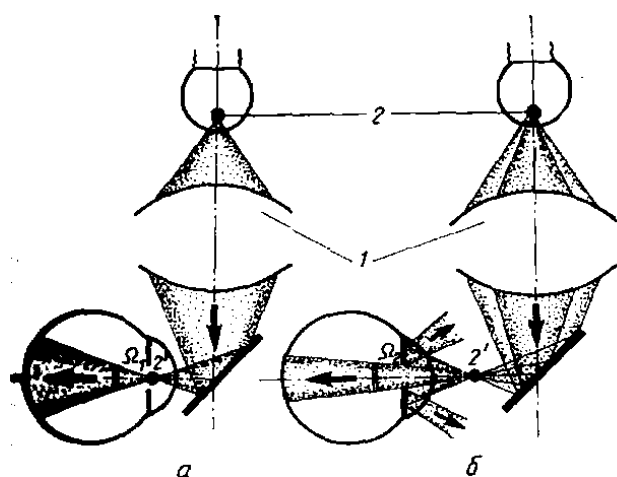
В этих приборах телескопическая система отсутствует и наблюдение ведется только через оптическую систему исследуемого глаза, как через лупу.

Работая по принципу лупы, глаз исследуемого не может, естественно, обеспечить наблюдателю такую же, как при работе с лупой, наводку на резкость. Однако такая наводка необходима вследствие вариабельности рефракции глаз пациента и врача. Действительно, когда мы хотим рассмотреть какой-либо предмет в лупу, мы выбираем такое расстояние между лупой и объектом, при котором последний виден наиболее резко. Для наблюдателя с нормальным зрением предмет расположен при этом примерно в фокальной плоскости лупы, при миопии — ближе, а при гиперметропии — дальше от нее.

Таким образом, добиться резкого изображения можно изменением положения лупы, без применения каких-либо дополнительных оптических элементов. При офтальмоскопии это невозможно: уменьшение или увеличение расстояния между исследуемым глазом и офтальмоскопом не сказывается на резкости изображения глазного дна. Оно влияет только на величину видимого поля и на полноту устра-

нения рефлексов. При рассматривании глазного дна пациента резкое изображение получается только при полном соответствии глаз пациента и врача, т. е. если миопия одного компенсируется эметропией другого или при эметропии обоих глаз. Небольшая степень аметропии пациента может быть компенсирована аккомодацией наблюдателя. Если аметропия значительна и не компенсирована обратной аметропией врача, то в ход лучей приходится вводить дополнительные элементы, корригирующие недостатки глаза. Отсюда еще одна особенность приборов для исследования глазного дна — наличие в них коррекционных систем, обеспечивающих резкое изображение глазного дна при различных степенях аметропии

**Осветительный канал.** Схема осветительной системы офтальмоскопа приведена на рис.2.3. Осветительный канал офтальмоскопа напоминает проекционный фонарь, используемый для демонстрации диапозитивов. В этом приборе конденсор формирует изображение источника света во входном зрачке, проекционного объектива, на экране освещается равномерное поле, ограниченное кадровой рамкой.



**Рис. 2.3.** Схема осветительного канала офтальмоскопа.

1—осветительная система; 2 - источник света; 2' - изображение источника света, служащее выходным зрачком системы;  $\Omega_1$  - угловая величина освещенного поля при совмещении изображения источника с плоскостью зрачка исследуемого глаза;  $\Omega_2$  - угловая величина освещенного поля при несовпадении изображения источника с плоскостью зрачка исследуемого глаза.

*а* - правильное положение: источник проецируется на зрачок глаза. Весь световой поток прибора проходит в глаз. На глазном дне равномерно освещено большое пятно.

*б* - неправильное положение: изображение источника удалено от зрачка глаза. Часть потока срезается радужной оболочкой. На глазном дне поле уменьшено и освещено неравномерно.

При офтальмоскопии роль проекционного объектива играет оптическая система глаза. В осветительной системе офтальмоскопа, так же как в проекционном фонаре, изображение источника служит выходным зрачком и должно проецироваться в плоскость зрачка исследуемого глаза. Совмещение выходного зрачка осветительной системы офтальмоскопа с плоскостью зрачка исследуемого глаза необходимо для того, чтобы на глазном дне полностью было освещено обследуемое поле. При удалении изображения источника от глаза радужная оболочка начинает срезать падающий на нее поток, и освещенное поле становится меньше (см. рис.2.3). Кроме того, вместо равномерно освещенного круга на глазном дне появляется размытое изображение нити лампы, что затрудняет исследование. Глазное дно служит как бы экраном. На него проецируется круглая диафрагма поля зрения, установленная в осветительном канале офтальмоскопа. В некоторых прибо-

рах эта диафрагма бывает сменной, разных диаметров. Иногда вместо круглой устанавливают щелевую диафрагму. В некоторых офтальмоскопах, так же как в проекционном фонаре, на освещенное поле проецируется какой-либо диапозитив — шкала, сетка или тесты для диагностики и лечения косоглазия.

Теоретически прибор, настроенный на исследование эметропического глаза, должен давать резкое изображение диафрагмы и шкал в бесконечности. Тогда после прохождения сред глаза их изображение будет проецироваться на сетчатку и врач одновременно будет видеть резкими и глазное дно, и круг, ограничивающий освещенный участок, и шкалы или тесты (если они установлены в приборе). Практически же, если вместо исследуемого глаза перед офтальмоскопом установить экран, например, лист белой бумаги, то при удалении его от офтальмоскопа на 0,5—1 м на нем будут резко видны изображения диафрагм и шкал (рис.2.4). Диафрагма, изображение которой отнесено на такое расстояние, проецируется на глазное дно с достаточной резкостью. Поэтому, это расстояние можно считать в данном случае «оптической бесконечностью».

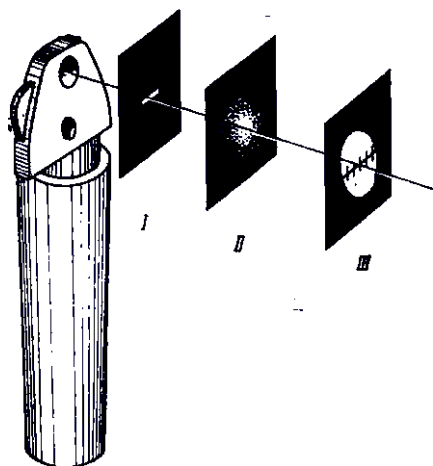
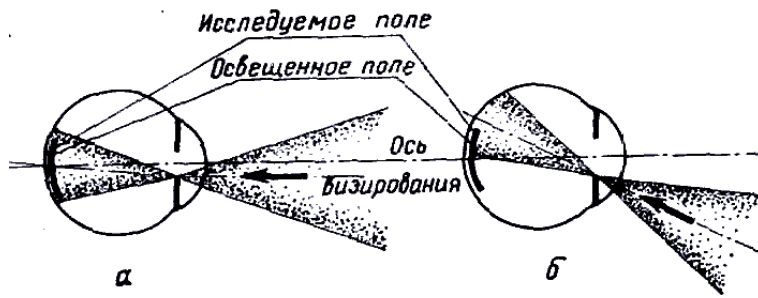


Рис.2.4. Форма освещенного круга разных расстояниях от офтальмоскопа.

Когда экран находится совсем близко от прибора, в плоскости, где должен быть расположен глаз пациента, то на него проецируется изображение источника света - светящийся прямоугольник, дуга или полукольцо. По мере удаления экрана светящаяся фигура приобретает сначала форму размытого круга, а потом резкого круга большого диаметра (рис.2.4).

**Взаимная ориентация оптического и осветительного каналов.** Оба канала, или осветительная и оптическая системы должны быть строго ориентированы по отношению друг к другу. При этом соблюдают два основных требования. Первое - ось оптической системы должна быть приблизительно (с точностью до 2-3°) параллельна центральному лучу осветительного пучка, падающего на глаз. Если это условие не будет соблюдено, то, как видно из рис.2.5, освещенным окажется не тот участок глазного дна, который виден в прибор. Выполнение этого требования связано с некоторым усложнением системы. Действительно, если оси оптической и осветительной систем установить параллельно друг другу, то выходной пучок оптической системы и изображение источника будут значительно разнесены и не поместятся на зрачке исследуемого глаза. Поэтому параллельности пучков достигаются только перед самым глазом. С этой целью офтальмоскопы снабжены отражателями, меняющими направление осветительных лучей при входе в глаз.



**Рис.2.5.** Расположение освещенного и наблюдаемого полей на глазном дне.

*a* - правильное положение: ось визирования и главный луч осветительного пучка параллельны. Наблюдаемое в прибор поле полностью освещено;

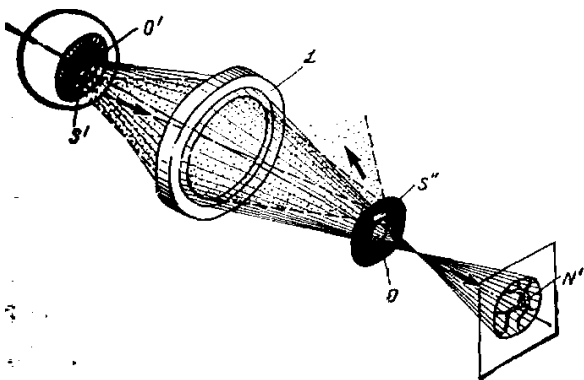
*б* - неправильное положение: ось

визирования не параллельна главному лучу осветительного пучка. Наблюдаемое в прибор поле освещено только частично.

Второе требование вызывается необходимостью устранения рефлексов. Оно заключается в том, что оптическая и осветительная системы должны быть ориентированы друг по отношению к другу так, чтобы их входные зрачки были разделены.

## 2.2. Методы устранения световых рефлексов

**Причины возникновения световых рефлексов.** Принадлежность глаза в процессе исследования к обеим, системам — осветительной и оптической вызывает возникновение световых рефлексов — изображений источника света поверхностями, стоящими в ходе лучей. Эти рефлексы затрудняют наблюдение основного объекта — глазного дна. Наиболее трудно устранить рефлексы от роговицы исследуемого глаза. Рассмотрим механизм возникновения рефлексов (рис.2.6). Световой поток, выходящий из осветительного канала, не полностью проходит внутрь глаза. Часть потока отражается от поверхностей глазных сред, в основном от передней поверхности роговицы, граничащей с воздухом. Если не приняты меры для устранения этого потока, то он попадает через входной зрачок в оптическую систему прибора и образует световые рефлексы или вуаль. Так же возникают рефлексы от оптических деталей — линз, плоскопараллельных пластин, стоящих в ходе осветительных лучей. Если рефлексы фокусируются вблизи плоскости изображения глазного дна, то они видны на нем в виде уменьшенных изображений источника света.



**Рис.2.6.** Механизм возникновения и устранения рефлексов от роговицы.

В случаях, когда плоскость изображения рефлексов удалена от изображения глазного дна, они накладываются на него в виде вуали, что также снижает качество изображения.

Тщательное устранение рефлексов необходимо при фотографировании глазного дна. Действительно, при визуальном наблюдении яркие, но небольшие по форме рефлексы не создают для опытного офтальмолога больших трудностей. Их можно отвести с исследуемого участка незначительным изменением направления глаза пациента или небольшими поворотами офтальмоскопа. При фотографировании это совершенно недопустимо. Свет, образующий рефлексы или вуаль, трудно отделить от света, образующего изображение глазного дна и устранение его связано с потерями световой энергии. Эти потери особенно ощутимы при фотографировании, так как в результате подвижности глаза для получения не размытых снимков время экспозиции должно быть очень мало, а достаточная плотность снимков достигается за счет интенсивности светового потока. При этом недопустимо превышение физиологических норм освещения. Врач должен тщательно следить за тем, чтобы фотосъемка не слишком утомляла пациента.

Основным методом устранения рефлексов от роговицы является так называемый **геометрический метод**. В последнее время применяют также **поляризационный метод**, обеспечивающий в комбинации с геометрическим высокую степень безрефлектности. Известен метод диасклерального освещения, не получивший пока практического применения, но представляющий определенный интерес. Рассмотрим более подробно все три метода.

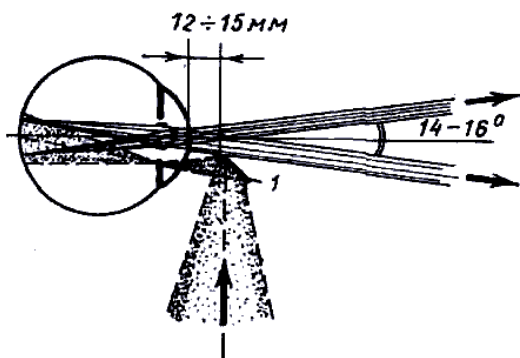
**Геометрический метод устранения рефлексов.** Принцип получения безрефлексного изображения глазного дна на основе разделения осветительного и оптического — наблюдательного, или фотографического, канала впервые сформулировал Торнер в 1899г. Согласно этому принципу входной зрачок оптической системы и выходной зрачок осветительной системы, роль которого играет изображение источника, должны располагаться на роговице исследуемого глаза рядом, не перекрывая друг друга.

Отраженный роговицей свет (см. рис.2.6, пунктирные линии) и при таком расположении падает на линзу наблюдательной системы. Однако до плоскости изображения глазного дна этот отраженный свет не доходит, так как попадает в оптическую систему не через ее входной зрачок и, следовательно, не участвует в формировании изображения. Входным зрачком может служить реальная апертурная диафрагма или изображение этой диафрагмы, даваемое оптической системой прибора. Итак, если входной зрачок прибора отделен от изображения источника света, то исключается появление световых рефлексов и вуали от роговицы на изображении глазного дна. Важно, чтобы на зрачок не накладывалась не только основная, наиболее яркая, часть, но и ореол от изображения источника. Тогда разделение будет полным. Отсюда требования к тому, чтобы изображение источника было не размытым и точно соответствовало заданным размеру и форме.

Устранения ореола добиваются прежде всего тщательным корригированием аберраций осветительной системы, просветлением поверхностей линз, значительно уменьшающим интенсивность отраженного света, а также возможно более полным устранением света, рассеянного поверхностями металлических деталей. Однако полностью устранить рассеянный свет практически не удастся, несмотря на то, что металлические детали обычно защищают черными матовыми покры-

тиями, поглощающими большую часть падающего на них света. В зависимости от требований к величине поля, увеличению и качеству изображения глазного дна оптические системы приборов, основанных на геометрическом методе устранения рефлексов, можно разделить на две группы.

**Системы с полностью разделенными оптическим и осветительным каналами.** В более простых приборах осветительный и оптический каналы не имеют общих оптических компонентов, т. е. полностью отделены один от другого (рис.2.7). Общей из этих двух систем является только оптическая система исследуемого глаза. Чтобы отражатель — зеркало или призма — не попадал в ход лучей оптической системы и не срезал пучков, формирующих изображение глазного дна, он должен быть расположен очень близко от исследуемого глаза. Это затрудняет процесс исследования и является недостатком данной схемы. Даже при возможном приближении отражателя к глазку — до 12—15 мм угол поля зрения не превышает  $14-16^\circ$ . Однако, благодаря своей простоте схема нашла широкое применение в ручных приборах.



**Рис.2.7.** Распределение оптического и осветительного каналов в ручных офтальмоскопах.

Призма или зеркало, установленное на расстоянии 12—15 мм перед изучаемым глазом, позволяет получить поле зрения не более  $14-16^\circ$ . При удалении призмы от глаза поле становится еще меньше.

Системы с общим оптическим компонентом — офтальмоскопической линзой. В приборах второй группы — стационарных офтальмоскопах и приборах для фотографирования глазного дна — обычно применяется другая схема. В этих приборах оптический и осветительный каналы не полностью разделены между собой, а имеют общую офтальмоскопическую линзу. Отражатель устанавливают не перед исследуемым глазом, а внутри прибора, рядом с апертурной диафрагмой, почти в одной плоскости с ней. Такое решение позволяет, не ограничивая размеров поля на глазном дне, удалить прибор от исследуемого глаза на достаточное для удобной работы расстояние. При этом возникает другая серьезная помеха — дополнительные рефлексы от поверхностей самой линзы.

**Устранение рефлексов от офтальмоскопической линзы.** Эта линза стоит одновременно и в ходе осветительных лучей, и в ходе лучей, формирующих изображение глазного дна. Поэтому каждая ее поверхность отражает часть светового потока, образуя рефлекс, накладывающийся на изображение глазного дна. Величина этого рефлекса и его местоположение зависят от радиуса кривизны отражающей поверхности, яркость — от доли отраженного ею потока. Как уже указывалось, особенно яркие рефлексы дают поверхности, граничащие с воздухом. Рефлекс от склеенных поверхностей значительно слабее. Непросветленные поверхности, граничащие с воздухом, отражают в среднем 4—6% падающего света (в зависимости от сорта стекла и величины угла падения). Коэффициент отраже-

ния просветленных поверхностей снижается в несколько раз, поэтому качество просветления офтальмоскопической линзы имеет особое значение. Даже при многослойном просветлении, когда коэффициент отражения составляет всего доли процента, рефлекс, концентрирующий свет, обычно превосходит по яркости изображение глазного дна.

Для устранения каждого из рефлексов приходится использовать специальные приемы, требующие большой изобретательности от конструктора и расчетчика прибора. Применение многолинзовых объективов, обеспечивающих высокое качество изображения, практически исключается из-за большого количества рефлексов. Выход был найден в создании офтальмоскопической линзы в виде одного компонента с асферической поверхностью. Считается, что одна асферическая поверхность может быть эквивалентна в отношении снижения аберраций двум сферическим. Для профиля асферической поверхности обычно используют кривые второго порядка – параболу, эллипс или гиперболу. Для этих поверхностей характерно увеличение радиуса кривизны по мере удаления от вершины кривой. Применение специально рассчитанной асферической поверхности позволяет без изменения фокусного расстояния линзы и хода параксиальных лучей придать крайним лучам заданное направление. Таким образом, без изменения местоположения изображения и увеличения устраняется сферическая аберрация и повышается качество изображения. Для устранения хроматической аберрации асферическую линзу выполняют клеенной из двух сортов стекла. Полученные таким образом асферические линзы практически полностью устраняют рефлекс от линзы. Однако осуществление их в условиях серийного производства сложно и трудоемко. Особенно большие технологические затруднения встречаются при изготовлении высокоточной асферической поверхности.

**Поляризационный и комбинированный методы устранения рефлексов.** Еще со времени изобретения метода офтальмоскопии велись поиски более простых приемов устранения рефлексов. Гельмгольц пытался применить с этой целью поляризационный метод, используя стеклянные пластинки, наклоненные под углом Брюстера ( $56^{\circ}$ ), максимально поляризующим светом. Сущность метода заключается в том, что при освещении глаза линейно поляризованным светом роговица и полированные поверхности линз прибора при отражении в основном сохраняют состояние поляризации, в то время как диффузно отражающие ткани глазного дна деполяризуют большую часть падающего на них света, т. е. преобразуют его в естественный. Это свойство дает возможность как бы «сортировать» при помощи анализатора свет, отраженный от глазного дна, и свет, отраженный поверхностями линз и роговицы. Анализатор, ориентированный соответствующим образом, должен полностью гасить поляризованный свет, отраженный линзами и роговицей и образующий рефлекс, но пропускать часть деполяризованного (естественного) света, отраженного от глазного дна. Эта часть света и участвует в формировании его изображения. Однако способ связан с большими потерями световой энергии, обусловленными самой физической сущностью получения поляризованного света из естественного. Действительно, чтобы поляризовать естественный свет, излучаемый источником, поляризатор поглощает ту состав-

ляющую света, плоскость поляризации которой перпендикулярна его оптической оси, и пропускает только ту составляющую, плоскость поляризации которой параллельна его оси. Такие же потери происходят при прохождении света, отраженного глазным дном и претерпевшего при этом деполяризацию. Суммарно потери энергии составляют от 75 до 90%. Это считалось основным препятствием к использованию поляризационного метода. Тем не менее простота метода продолжала привлекать разработчиков приборов. В настоящее время вследствие применения высокоинтенсивных источников света уровень освещенности при использовании поляризационных устройств достаточно высок не только для визуального исследования, но и для фотографирования глазного дна. Это дало возможность провести экспериментальную проверку поляризационного метода, которая показала, что полного устранения рефлексов от роговицы получить не удастся: на изображении глазного дна накладывается заметная вуаль, значительно снижающая контрастность. Основную причину остаточных рефлексов следует искать в особенностях структуры прозрачных тканей глаза. Это предположение подтверждается при сравнении яркости остаточных рефлексов роговицы живого глаза и полированной стеклянной линзы с таким же радиусом кривизны. В этом случае рефлекс гасится значительно лучше. Без сомнения, одна из причин неполного устранения рефлексов заключается также в несовершенстве изготавливаемых промышленностью поляроидов. Как правило, поляроиды не обеспечивают полного гашения, обычно в крайних зонах видимого спектра. Значительно лучший эффект дает комбинирование геометрического и поляризационного методов, упрощающее получение качественного изображения. Яркость ореола вокруг изображения источника света даже при плохо скорректированной оптической системе значительно меньше яркости основной части изображения. Поэтому поляроиды гасят этот ореол достаточно полно. Это позволяет снизить требования к качеству изображения источника и, следовательно, к исправлению аберраций осветительной системы. Отпадает также необходимость экранирования рефлексов асферической поверхности — при условии хорошего просветления оптики этот рефлекс практически отсутствует. Использование поляроидов для устранения рефлексов позволяет значительно упростить конструкцию приборов.

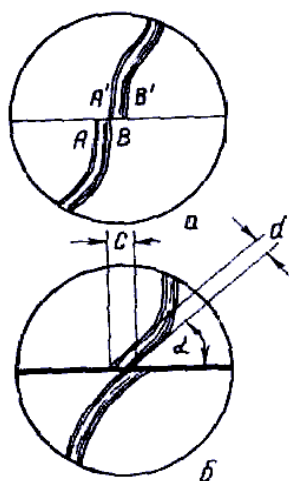
### **2.3. Методы измерения на глазном дне**

Измерение элементов глаза применяется как при диагностике глазных и некоторых общих заболеваний, так и для изучения органа зрения. Оптическим измерениям подлежат многие элементы глаза. Специфика измерений связана в основном с двумя особенностями. Первая — подвижность объекта измерения. Как известно, глаз находится почти в непрерывном движении. Вторая особенность связана с тем, что большая часть элементов глаза, подлежащих измерению, находится за глазными средами — роговицей, хрусталиком, стекловидным телом, изменяющими видимый размер измеряемого объекта. Для правильной оценки размеров необходимо учитывать увеличение глазных сред, которые могут довольно значительно различаться у разных людей. Измерения элементов глаза можно про-

изводить как в процессе визуального исследования, так и фотометрическим путем — по фотоснимкам, голограммам и другим записям, зарегистрированным при исследовании.

Для проведения измерений в процессе визуальных Исследований ряд приборов снабжен измерительными шкалами и сетками различной конфигурации. Совмещение штрихов шкал с измеряемым элементом осуществляется в большинстве случаев с помощью изменения направления взора пациента, следящего за фиксационной точкой прибора. Осуществить точное совмещение таким путем довольно трудно. Еще труднее удержать глаз пациента в требуемом положении в течение времени, необходимого для производства отсчета.

**Гелиометрический метод.** Этот недостаток исключается при гелиометрическом методе, заимствованном из астрономии. Применяется в основном для калибровки сосудов глазного дна. Сущность метода состоит в следующем. Оптическим путем, с помощью призмы или разрезной линзы, изображение разделяется на две части, сдвинутые друг относительно друга. Перемещая микровинтом призму, врач добивается соприкосновения двух половин изображения в точках А и В, между которыми измеряет расстояние (рис.2.8).



**Рис.2.8.** Гелиометрический метод измерения элементов глазного дна при помощи окуляра Лобека.

а - правильное совмещение верхней и нижней частей раздвоенного изображения;  
 б - неправильное совмещение - сосуд расположен под углом  $\alpha$  к линии раздела. Вместо калибра  $d$  измеряется величина  $c$ .

Таким образом, крайняя точка верхней половины изображения измеряемого элемента, например, сосуда, служит началом отсчета для нижней половины. Величину, на которую при этом перемещена разделительная призма, определяют по шкале микровинта. При движении измеряемого объекта обе половины его изображения перемещаются совместно, не сдвигаясь одно относительно другого. По принципу действия это устройство выполняет роль следящего и исключает помехи от движения глаза. Однако в процессе наводки и тут возникает ряд трудностей. Для правильного определения калибра сосуда или размера другого объекта нужно добиться такого положения, когда он перпендикулярен к линии раздела. Если это требование не выполнено и сосуд находится под углом  $\alpha$  к линии раздела (см. рис.2.8), то вместо истинного калибра  $d$  будет замерен размер  $c = d / \sin \alpha$  и измеренная величина будет больше истинной. Часто точность измерений снижается вследствие слишком широкой линии раздела. Этот недостаток прибора связан с технологическими трудностями изготовления призмы без фаски.

При визуальных наблюдениях, позволяющих иногда улавливать более тонкие подробности, чем фотографирование, точные измерения затруднены движениями глаза и утомляемостью пациента. Даже такой сравнительно быстрый метод, как гелиометрический, использованный в окуляре Лобека большого безрефлексного офтальмоскопа, требует значительно большего времени, чем фотоэкспонирование. Неизбежное при этом утомление пациента не позволяет осуществлять многократные измерения, необходимые для получения достоверных результатов.

**Фотографический метод.** По фотопленке можно проводить тщательные многократные измерения всех интересующих врача деталей, сравнивать снимки, сделанные в разное время, и, таким образом, следить за динамикой заболеваний. К измерениям можно возвратиться в случае необходимости в любое время. Измерения на фотопленке можно проводить с помощью различных видов оптических приборов: измерительных луп, микроскопов с небольшим увеличением, проекторов и пр.

## 2.4. Поляризационные офтальмоскопические приборы

В биологии, физике, технике для исследования свойств вещества широко применяется поляризационный метод. С его помощью решаются многие проблемы, которые другим путем решить не удастся. Явления оптической анизотропии, обнаруживаемые в поляризованном свете, указывают на особенности внутреннего строения тканей и служат их важнейшими характеристиками.

В медицинской практике поляризационные методы нашли применение недавно и их возможности изучены далеко не полностью. Однако в настоящее время уже ясно, что поляризационные исследования глаза не только повышают контрастность элементов тканей и помогают устранить помехи в виде рефлексов, но позволяют определить по характеру специфических интерференционных фигур, например интерференционных полос на роговице, функциональное состояние отдельных участков глаза.

**Оптическая анизотропия.** Получение, обнаружение и использование поляризованного света основано лишь на взаимодействии с веществом, обладающим оптической анизотропией. Оптическая анизотропия, характерная, вообще говоря, для кристаллов, наблюдается и в ряде псевдокристаллических образований— текстур, в том числе в волокнах растений и животных, тканей.

Анизотропия может вызываться регулярной ориентацией оптически анизотропных молекул, соединенных в мицеллы или пучки мицелл, причем в случае беспорядочного расположения таких же анизотропных элементов тело, в общем, может быть изотропным. Вторая возможная причина анизотропии — определенная ориентация оптически изотропных частиц.

Оптическая анизотропия может проявляться или в двойном лучепреломлении, или в дихроизме. В первом случае естественный свет, пройдя через двоякопреломляющее вещество, разделяется на две части одинаковой интенсивности, поляризованные во взаимно перпендикулярных направлениях. Во втором случае, при

дихроизме, естественный свет также разделяется на два пучка, поляризованных во взаимно перпендикулярных направлениях, но один из них проходит почти полностью, другой поглощается веществом. Поэтому дихроизм называют также анизотропией поглощения.

**Получение поляризованного света.** Наиболее широкое распространение получили герпатитовые и поливиниловые поляроиды. Герпатитовые поляроиды изготавливают из полийодида сульфата хинина, чаще всего в виде суспензии ультрамикроскопических иглообразных кристалликов в нитро- или ацетилцеллюлозной пленке. При этом все кристаллики ориентированы параллельно друг другу.

Поливиниловые поляроиды изготавливают из содержащей йод пленки поливинилового спирта, растянутой в одном направлении. Одиночные поливиниловые поляроиды пропускают около 30% и рассеивают примерно 0,1 % падающего света, герпатитовые пропускают примерно 28% и рассеивают 3,5% света. Апертурный угол поляризации составляет около 90° для поливиниловых и около 60° для герпатитовых поляроидов. Цвет отдельного поляроида серый или серо-зеленый. Два поляроида со скрещенными плоскостями поляризации почти полностью гасят проходящий свет. В настоящее время поляроиды в большей части приборов вытесняют монокристаллические поляризаторы.

**Регулировка освещения и гашение бликов.** Одно из распространенных применений поляризованного света – регулировка интенсивности освещения. Пара поляризаторов позволяет плавно изменять интенсивность освещения в огромных пределах — до 100000 раз.

Поляризованный свет часто используется для гашения света, зеркально отраженного от гладких диэлектрических поверхностей. На этом принципе устроены, например, поляроидные солнечные очки. Когда естественный неполяризованный свет падает на поверхность водоема, часть его зеркально отражается и при этом поляризуется. Этот отраженный свет мешает видеть предметы, расположенные под водой. Если смотреть на воду через соответствующим образом ориентированный поляризатор, то большая часть зеркально отраженного света будет поглощаться и видимость подводных объектов значительно улучшится. При наблюдении через такие очки «шум» — свет, отраженный от поверхности, — уменьшается в 5—20 раз, а «сигнал» — свет от подводных объектов — уменьшается всего в 2—4 раза. Таким образом, отношение сигнала к «шуму» значительно возрастает.

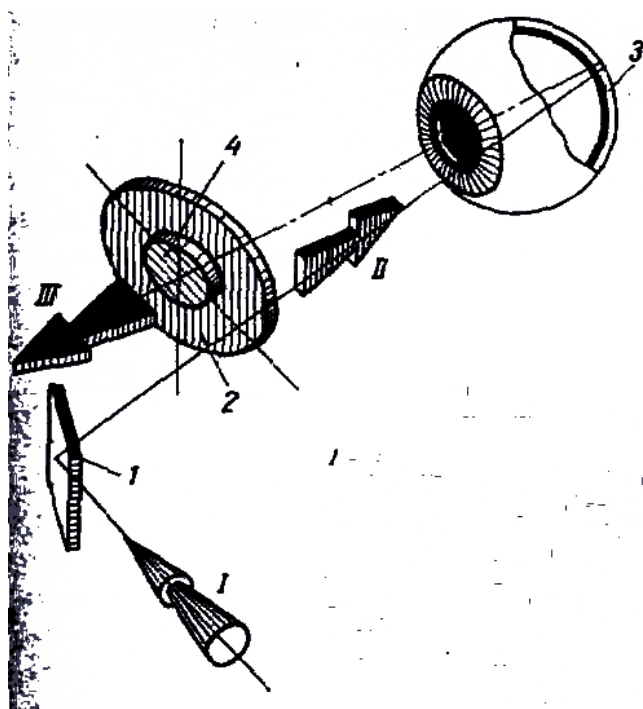
**Поляризационная офтальмоскопия.** Поляризационный метод исследования применяется в офтальмоскопии, хотя возможности его не выявлены до конца. Основные преимущества метода определены уже сейчас. Офтальмоскопия и фотографирование глазного дна в поляризованном свете позволяют наблюдателю непосредственно видеть и регистрировать на различных участках глазного дна обследуемого, в том числе и в области желтого пятна, изменения, связанные с оптической анизотропией.

Метод основан на том, что участки ткани глазного дна, обладающие дихроизмом, приобретают в поляризованном свете яркость и световые оттенки, отличаю-

щиеся от обычных. В зависимости от направления скрещенных поляроидов, установленных в приборе, освещенность и цветовые оттенки отдельных участков глазного дна заметно меняются. Одни структурные элементы гасятся, другие становятся более отчетливыми, а иногда даже проявляются новые. Повышение контрастности некоторых элементов глазного дна способствует лучшему выявлению патологических изменений, неразличимых или плохо различимых при обычной офтальмоскопии.

Дихроизм тканей, характеризующая их внутреннюю структуру, сама по себе может служить диагностическим тестом. Для этого, однако, необходимо изучение глазного дна больных с разнообразной патологией.

Важным преимуществом поляризационной офтальмоскопии является также более полное гашение рефлексов, затрудняющих наблюдение и особенно фотографирование глазного дна. Благодаря безрефлективности изображения картину глазного дна можно наблюдать с большим «комфортом», что позволяет подробнее рассмотреть ее. Схема исследования глаза в поляризованном свете показана на рис.2.9.



**Рис.2.9.** Схема исследования глаза в скрещенных поляроидах.

1 - зеркало, направляющее пучок естественного света (стрелка I) от источника к глазу; 2 - поляризатор; 3 - глазное дно, деполяризующее основную часть падающего поляризованного света (стрелка II); 4 - анализатор, скрещенный с поляризатором. Анализатор гасит рефлексы от роговицы, но пропускает часть света, отраженного глазным дном (стрелка III). При повороте скрещенных поляроидов анизотропные участки глазного дна изменяют свою яркость.

Поток от источника света, пройдя осветительный канал, снабженный поляризатором, направляется в глаз. Большая часть потока проходит через зрачок глаза и освещает глазное дно. Часть света зеркально отражается от поверхностей глазных сред — в основном от роговицы, а также от поверхностей линз прибора. Так как при зеркальном отражении свет остается поляризованным, то анализатор, ориентированный соответствующим образом, гасит его. В ряде случаев при этом устраняются и другие световые помехи — рефлексы от рельефных деталей глазного дна, его сосудов, патологических очагов и пр.

Часть прошедшего через зрачок светового потока поглощается пигментом и другими элементами глазного дна, но в основном проходит через прозрачную

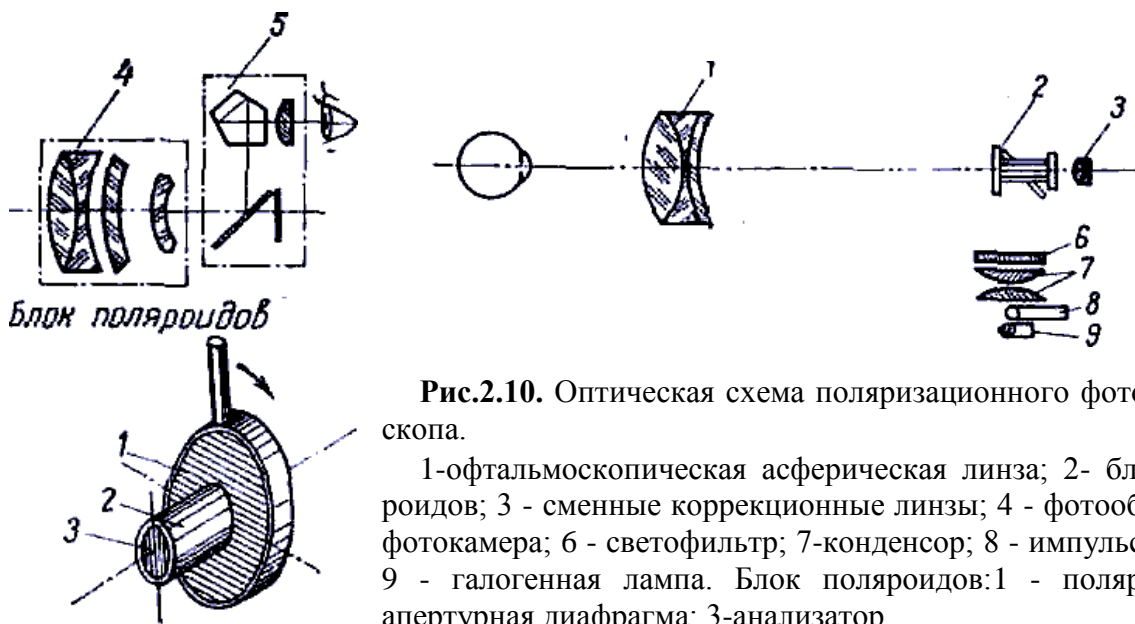
сетчатку и попадает на сосудистую оболочку, окрашенную проходящей по ее сосудам кровью в красный цвет. Сосудистая оболочка также частично поглощает, а частично пропускает свет к склере. Дошедший до склеры свет отражается и проходит в обратном направлении все оболочки глаза, вновь претерпевая в них поглощение и отражение на границах сред. В течение этого процесса свет поляризуется, т. е. теряет определенную направленность колебаний. Вследствие этого анализатор, скрещенный с поляризатором, пропускает значительную часть потока, отраженного от глазного дна, и на приемнике излучения—сетчатке глаза наблюдателя или на фотопленке камеры формируется изображение глазного дна.

Если все оболочки, проходимые светом внутри глаза, оптически изотропные, т. е. поглощают и отражают свет с различными направлениями колебаний одинаково, то при повороте поляроидов интенсивность прошедшего света не изменяется. Если же ткань обладает дихроизмом, то процесс усложняется. При дихроизме в зависимости от направления колебаний поляризованного света освещенность будет различна. Если ось поляризатора горизонтальна, то элементы, сильнее поглощающие горизонтальные колебания, будут темными, перпендикулярные им—светлыми. Поскольку поглощение, кроме того, зависит от длины волны, то дихроичные ткани при разных направлениях колебаний света, соответствующих разным положениям поляроидов, принимают различные цветовые оттенки. Вследствие того, что при некоторых положениях поляроидов ткань становится более прозрачной, сквозь нее начинают просвечивать более глубоко лежащие слои. Таким образом, при повороте поляроидов становится возможным наблюдение различных слоев глазного яблока.

Из приведенного описания ясно, что явления, наблюдаемые на глазном дне в поляризованном свете, можно разделить на два вида. К первому относятся явления, связанные с зеркальной составляющей света и выражающиеся в гашении различных рефлексов. Явления второго вида связаны с диффузной составляющей света, отраженного слоями глазного дна. Из этой составляющей формируется изображение глазного дна, несколько отличающееся от обычного, что вызывается дихроизмом его тканей и характеризует их тонкую структуру. Вид глазного дна в поляризованном свете был изучен на поляризационном фотоофтальмоскопе и универсальном офтальмоскопе с волоконными световодами.

**Приборы для поляризационной офтальмоскопии.** Для осуществления полноценного поляризационного исследования во всех приборах предусмотрено совместное вращение скрещенных поляроидов, заменяющее вращение предметного столика с исследуемым объектом в поляризационном микроскопе. Достижение полностью безрефлексной офтальмоскопии осуществлено разделением пучков света осветительного и оптического каналов на зрачке исследуемого глаза. Остаточные рефлексии и вуаль устраняются применением поляризованного света. Для фотографирования и визуального исследования глазного дна в поляризованном свете разработан **поляризационный фотоофтальмоскоп ФОСП-1**. Прибор может быть использован и для поляризационной фотосъемки переднего отдела глаза. В отличие от всех других аппаратов для фотографирования глазного дна в

ФОСП-1 наблюдение и фотографирование ведутся в поляризованном свете. Направление плоскости поляризации врач может изменять, поворачивая рукоятку поляроидов (рис.2.10).



**Рис.2.10.** Оптическая схема поляризационного фотоофтальмоскопа.

1-офтальмоскопическая асферическая линза; 2- блок поляроидов; 3 - сменные коррекционные линзы; 4 - фотообъектив; 5 - фотокамера; 6 - светофильтр; 7-конденсор; 8 - импульсная лампа; 9 - галогенная лампа. Блок поляроидов:1 - поляризатор; 2-апертурная диафрагма; 3-анализатор.

Поляризатор 1, относящийся к осветительному каналу, представляет собой кольцевой поляроид. Он укреплен на металлической трубке 2, служащей апертурной диафрагмой оптической системы. В отверстие трубки установлен круглый поляроид — анализатор 3.

Оптические оси поляроидов развернуты взаимно перпендикулярно, поэтому анализатор гасит остаточные рефлексы от поверхностей офтальмоскопической линзы и роговицы глаза. Весь блок апертурной диафрагмы с обоими поляроидами может поворачиваться от руки на 90°, при этом свет от источника проходит через разные участки кольцевого поляроида. Вращая блок поляроидов, врач осуществляет вращение плоскости поляризации и может добиться последовательного повышения контрастности различных анизотропных элементов исследуемого участка. Это дает возможность производить фотосъемку одного и того же участка с различно контрастируемыми элементами.

## 2.5. Приборы для флуоресцентной ангиографии

Один из важнейших диагностических методов - фотографирование глаза и особенно глазного дна. Однако обычная фотография не обеспечивает достаточно контрастного изображения сосудов глаза, а также многих тонких патологических изменений тканей. В связи с этим, особое место в исследовании глаза и особенно глазного дна занимает флуоресцентная ангиография. Метод позволяет обнаружи-

вать на глазном дне детали, невидимые при любых других методах исследования. Особенно важно, что он дает возможность наблюдать различные формы кровообращения, изменения кровеносных сосудов сетчатки, происходящие при таких заболеваниях, как гипертония, диабет и т. д. Метод позволяет также находить повреждения капилляров сетчатки глаза, которые слишком малы, чтобы их заметить на фоне почти одинаково с ними окрашенной стенки глазного дна, злокачественные образования, а также ряд других патологических изменений. Флуоресцентные исследования применяются и для других отделов глаза, например, передней камеры и придаточного аппарата.

**Параметры приборов для флуоресцентной ангиографии.** Основной задачей, стоящей при создании приборов для флуоресцентной ангиографии, является выбор источника света и светофильтров, возбуждающих интенсивную флуоресценцию. Светофильтры, особенно возбуждающий, поглощают большую часть излучения источника света, поэтому источник должен обладать повышенной яркостью. Для наблюдения и наводки применяют галогенные лампы значительной мощности. Фотографирование производят с помощью электронной лампы-вспышки. Исследование проводят при максимально расширенном зрачке. Для регистрации быстро протекающих процессов, возникающих при прохождении раствора флюоресцеина по сосудам глазного дна, интервалы между вспышками должны быть минимальными. Это позволяет производить серийную флюорографическую съемку, регистрирующую все фазы прохождения состава по сосудам глазного дна.

Установлено, что, хотя флуоресценцию можно вызвать лампой с черным светофильтром, пропускающим только ультрафиолетовое излучение, выгоднее пользоваться синим светофильтром с максимумом пропускания 436 нм. Энергетический выход при этом повышается с 70 до 85 %. Таким образом, применение синего светофильтра вместо черного повышает энергетический выход на 15 %. Возбуждение синим светом оказывается выгоднее еще и потому, что он сильнее, чем ультрафиолетовый, поглощается раствором флюоресцеина. В результате этого существенно повышается интенсивность флюоресценции, а следовательно, и контрастность изображения. Для еще большего повышения контрастности между флюоресцирующим объектом и приемником излучения — фотопленкой или глазом наблюдателя часто устанавливают еще один светофильтр — замыкающий. Назначение этого второго фильтра — задерживать рассеянное исследуемым глазом коротковолновое возбуждающее излучение источника, к которому данный приемник излучения чувствителен. При этом замыкающий фильтр должен пропускать излучение люминесценции с минимальными потерями. Кривая пропускания замыкающего светофильтра должна не только иметь максимальное значение в области флюоресценции, но, кроме того, возможно более резкий спад с коротковолновой стороны. Такие светофильтры, каждый из которых поглощает спектральный диапазон, пропускаемый другим, называются скрещенными. Нужно отметить еще одно преимущество скрещенных светофильтров. Замыкающий желтый светофильтр частично гасит остаточные роговичные и приборные рефлексии, формирующиеся из возбуждающего синего света, повышая тем самым безрефлексию

изображения глазного дна. Однако полная «скрещенность» светофильтров, приводящая к черному фону на снимке, все же не применяется, несмотря на то что при этом контраст флюоресцирующих деталей максимален. Недостаток снимков с черным фоном в том, что в них затруднительно ориентироваться и проводить сравнение с обычными снимками глазного дна. Поэтому светофильтры подбирают так, чтобы цвет основного фона глазного дна был серым и на нем можно было рассмотреть детали, необходимые для ориентировки.

## 2.6. Приборы для биомикроскопии глаза

Обычное исследование глаза при дневном освещении или с помощью бокового фокального освещения не позволяет детально рассмотреть структуру глазных тканей. Микроскопия живого глаза, называемая биомикроскопией, дает возможность проводить исследование структур глазных сред при повышенном увеличении и различных условиях освещения. При помощи биомикроскопии можно обнаружить малозаметные изменения прозрачных сред, установить глубину патологического очага, выявить мельчайшие изменения рельефа оболочек и др. Метод биомикроскопии позволяет получить на живом глазе картину, в какой-то степени напоминающую гистологический срез при рассматривании его в биологический микроскоп. Однако получение очень больших увеличений (в несколько тысяч раз), применяемых при микроскопии гистологических срезов, при биомикроскопии невозможно. Увеличения, превышающие 50—60 раз, даже если бы они и были возможны, не имели бы смысла, так как сильно сократилась бы глубина резкости. Малая глубина резкости, достаточная для исследования гистологических срезов толщиной несколько нанометров, не удовлетворяет требованиям микроскопии живого глаза, так как исследуемые поверхности не плоские, а выпуклые или вогнутые, а объект исследования находится в движении. Специфика биомикроскопии заключается также и в том, что при исследовании живого глаза наблюдатель находится с той же стороны от объекта, откуда падает свет, в результате чего невозможны исследования в проходящем свете, применяемые на биологическом микроскопе.

Очень важную роль при исследовании прозрачных и малоконтрастных тканей играют способы их окрашивания. При биомикроскопии неприменим метод повышения контраста красящими веществами, широко используемый в гистологической практике. Физико-оптические способы повышения контраста: метод темного поля, косо́го освещения, фазового контраста—могут быть применены только в значительно видоизмененной форме. Все эти особенности не позволяют осуществить при биомикроскопии исследование тканей на уровне клетки, достигаемое при микроскопии гистологических срезов. Однако сравнительно небольшие увеличения, получаемые при биомикроскопии, вполне достаточны для наблюдения элементов структур живого глаза при относительно большом поле зрения и глубине резкости.

Современные приборы позволяют применять биомикроскопическое исследование практически для всех отделов глаза. Особенно эффективно оно при изучении

прозрачных сред: роговицы, хрусталика, передней камеры, стекловидного тела. С помощью специальных приспособлений наблюдают труднодоступные участки глаза: угол передней камеры (микрогониоскопия), цилиарное тело и цинновы связки (микроцикლოსкопия и микрозонулоскопия), а также проводят биомикроскопию глазного дна—биомикроофтальмоскопию. Специальные устройства позволяют наблюдать также крайнюю периферию сетчатки и хориоидеи.

Биомикроскопия представляет собой развитие и усовершенствование метода бокового освещения, введенного еще в 1899 г. Цапским. В 1911г. Гульстрандом был создан первый вариант щелевой лампы, в которой вместо всего изображения источника света использовался узкий пучок, вырезаемый из его промежуточного изображения щелевой диафрагмой, смонтированной в приборе.

**Принцип щелевого освещения.** Принцип освещения, предложенный Гульстрандом, сохранился во всех последующих моделях щелевых ламп. В этих приборах, предназначенных для биомикроскопии, пучок света фокусируется на исследуемый участок глаза в виде яркой, резко очерченной щели. Светящаяся щель как бы вырезает из глазного яблока тонкий «оптический срез». Роговица, хрусталик, стекловидное тело и различные включения видны как светящиеся серые или опалесцирующие фигуры на темном фоне. При фокусировке на хрусталик на нем видны светящиеся полосы, соответствующие линиям раздела тканей с различной оптической плотностью: передняя и задняя поверхности хрусталика, поверхности ядра и других элементов. Подобные же линии очерчивают поверхности раздела тканей с различной оптической плотностью на роговице. Влага передней камеры обладает значительно меньшим рассеянием, и ее свечение в норме почти незаметно.

**Физические основы получения «оптических срезов». Явление Тиндаля.** Само название «прозрачные среды глаза» свидетельствует о том, что весь падающий на эти среды свет должен проходить сквозь них. Однако в действительности это не совсем так. Получение «оптических срезов» основано на том, что прозрачные среды глаза светятся при падении на них пучка света. Эффект свечения сред вызывается явлением Тиндаля. Рассмотрим физическую сущность этого явления. Явлением Тиндаля называется рассеяние света при прохождении через оптически неоднородную среду. Оптическая однородность среды характеризуется постоянством показателя преломления для разных ее участков. Если два граничащих участка обладают одинаковыми показателями преломления, то ни отражения, ни преломления на границе нет, и волна распространяется как в однородной среде. В этом случае среда невидима даже при освещении ее ярким светом. Так, если пучок лучей проходит через кювету с хорошо очищенной водой, то при наблюдении сбоку пучок почти не виден, так как он не рассеивается в стороны. Нарушение постоянства показателя преломления вызывает нарушение оптической однородности. На пространственных неоднородностях возникает дифракция. Если неоднородности невелики по размерам, то дифракционная картина характеризуется равномерным распределением света по всем направлениям. Такую дифракцию на мелких неоднородностях называют рассеянием света. При слабых нарушениях однородности свет, рассеянный в стороны, составляет лишь малую долю первич-

ного пучка, и заметить его трудно. Если неоднородности среды более грубы, то рассеяние проявляется более отчетливо. Если в кювету с чистой водой внести хотя бы одну каплю нерастворимой в воде жидкости, то пучок света становится виден со всех сторон, так как в нем возникает интенсивное рассеяние. Причиной этого является образование эмульсии - мелких капелек, взвешенных в воде. Дифракция на этих капельках дает картину рассеяния, характерную для среды с оптическими неоднородностями. Интересно отметить следующее. Если среда состоит из разных молекул или групп молекул, но показатели их преломления одинаковы, то рассеяния не происходит. Например, подобранная соответствующим образом смесь бензола и сероуглерода с погруженными в нее кусочками стекла представляет собой оптически однородную среду: граница между стеклом и жидкостью перестает быть заметной. Смесь, несмотря на сильную физическую неоднородность, обладает оптической однородностью и не возбуждает рассеяния. Среда с явно выраженной оптической неоднородностью называются мутными средами. Такой средой является дым - твердые частицы в газе, туман капельки воды в воздухе, взвеси или суспензии, представляющие совокупность твердых частичек, плавающих в жидкости, эмульсии - взвесь капель жидкости в другой жидкости, твердые тела вроде перламутра, опалов и молочных стекол. Во всех подобных случаях наблюдается более или менее сильное рассеяние света мутной средой, называемое явлением Тиндаля. Явление Тиндаля отличается еще и следующими особенностями. При наблюдении сбоку рассеянный свет имеет более голубой оттенок, т. е. относительно больше богат короткими волнами, чем свет источника. Чем мельче частицы, тем рассеянный ими свет более голубой. Рассеянный свет поляризован, хотя свет от источника естественный. Поляризация света мутными средами обычно бывает неполной, что объясняется оптической анизотропией молекул. По степени деполяризации рассеянного света можно судить об анизотропии молекул. Таким образом, получаемое на щелевой лампе свечение сред глаза, по-видимому, может быть использовано для диагностики, так как цветовые оттенки срезов и их поляризационные свойства, характеризуют особенности структуры данного глаза. Однако при биомикроскопии эти признаки пока не используются, а свечение срезов применяется только для их детального рассматривания.

**Принцип устройства щелевой лампы.** Конструкция щелевых ламп основана на получении «оптических срезов» и наблюдении их в бинокулярный микроскоп. Промышленностью многих стран выпускаются различные модели щелевых ламп, однако принцип их устройства общий. Наиболее совершенны стационарные модели. Щелевая лампа содержит два канала - осветительный и наблюдательный. Наблюдательный канал состоит из бинокулярного микроскопа, установленного на кронштейне координатного столика. В микроскопе имеется обычно пять сменных увеличений: от 5 до 50-60 раз. Увеличениями выше 20 пользуются редко, так как при больших увеличениях глубина резкости становится слишком мала и незначительный сдвиг микроскопа или глаза пациента приводит к исчезновению резкого изображения поверхности, на которую наведен микроскоп. При увеличениях порядка 18-20 раз одновременно резко видны роговица, радужка, хрусталик. Рабо-

чий отрезок, на который исследуемый глаз удален от прибора, довольно велик, что облегчает процедуру исследования. В разных моделях он составляет от 60 до 100мм. Осветитель формирует резкое изображение светящейся щели точно на том же расстоянии от прибора, на которое сфокусирован микроскоп. Формирование резкого изображения щели достигается с помощью довольно сложной оптической системы. Конденсор осветителя проецирует промежуточное изображение источника света - нити лампы накаливания в плоскость щелевой диафрагмы, заключенной в корпусе осветителя. Диафрагма регулируется по ширине, что позволяет получить как узкие, так и более широкие изображения щели, а также круглое, равномерно освещенное поле. Ширина изображения щели в современных приборах регулируется от 0,02 до 10мм. Щель может поворачиваться на 90 °С. В более старых моделях поворот щели отсутствовал, и вместо него на глаз можно было проецировать или вертикальную, или горизонтальную щель. Новые модели снабжены бескрасным и синим светофильтрами, повышающими контрастность картины и позволяющими проводить флуоресцентные исследования.

Существенно расширяет возможности прибора то, что «оптический срез» можно рассматривать в бинокулярный микроскоп под различными углами, величину которых регулирует сам врач. С этой целью осветитель и бинокулярный микроскоп установлены на одной вертикальной оси, проходящей через середину лобной опоры прибора. Они могут поворачиваться вокруг этой оси на угол  $\pm 60^\circ$ , образуя между собой углы от 0 до  $120^\circ$ . При любой величине этого угла оси осветительного пучка и ось симметрии бинокулярного микроскопа пересекаются в одной точке - там, где должен быть расположен исследуемый глаз. Благодаря этому при поворотах осветителя и микроскопа не требуется дополнительной наводки - исследуемый участок глаза остается все время резко видимым и хорошо освещенным.

Выпускаются также ручные щелевые лампы. Они портативны, позволяют проводить обследование больных в положении лежа и детей, просты в эксплуатации. Однако функциональные возможности ручных щелевых ламп ниже, чем стационарных. Это объясняется ограничениями, вызванными их малыми габаритами и массой, а также тем, что при работе прибор приходится держать на весу, а положение, головы пациента не фиксируется.

### 3. Приборы для подбора и контроля средств коррекции зрения

#### 3.1. Офтальмометры

Офтальмометры предназначены для определения радиуса кривизны и рефракции передней поверхности роговицы глаз, величины и вида роговичного астигматизма, а также направления главных сечений астигматической роговицы. Прибор находит наибольшее применение при подборе контактных линз с целью уточнения радиуса кривизны передней поверхности роговицы, а также при подборе очков для определения астигматизма глаза. Он может быть использован и при диагностике глазных заболеваний, связанных с изменением формы и кривизны роговой оболочки глаза.

В основу методики офтальмометрии заложено допущение, что радиус кривизны, измеряемый в том или ином главном сечении, имеет постоянное значение на всем участке от центра роговицы к периферийным ее участкам, т. е. *вся поверхность роговицы является сферической*. В действительности это справедливо лишь для центральной зоны роговицы, диаметром 4мм, называемой оптической зоной, которую и измеряют офтальмометром.

Принципиальная оптическая схема офтальмометрии показана на рис.3.1.  $M'N'=2l'$  является изображением объекта  $MN=2l$ , полученного в результате отражения от роговицы 1 исследуемого глаза. Объектив 2 образует изображение  $M''N''=2l''$  сопряженное с  $M'N'$ , которое рассматривается с помощью окуляра 4.

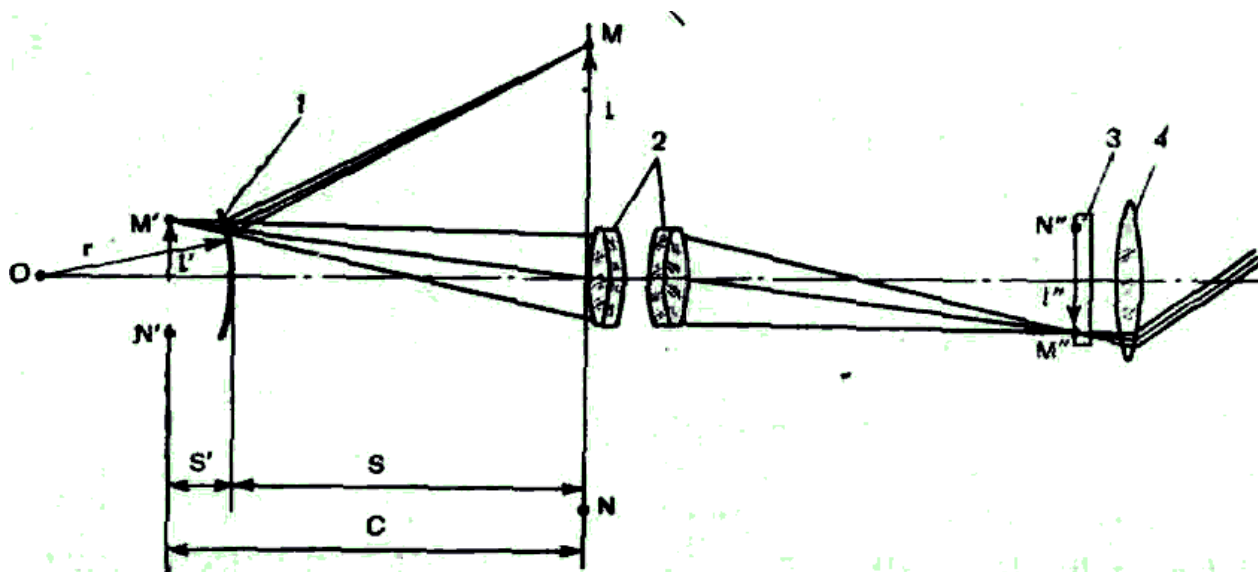


Рис.3.1 Принципиальная оптическая схема офтальмометрии

Уравнение для сферического зеркала (роговицы) имеет вид:

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

Из подобия треугольников:

$$\frac{l}{s} = \frac{l'}{s'} \quad (3.2)$$

Из уравнений (3.1) и (3.2) получим

$$r = \frac{2sl'}{l' - l}, \quad (3.3)$$

Действие офтальмометров основано на том, что величины объекта  $l$ , установленного перед роговицей, изображение этого объекта  $l'$ , полученное в результате отражения от роговицы, и радиус кривизны роговицы  $r$  связаны зависимостью, которая позволяет определить значение радиуса кривизны роговицы, если известна величина  $s$ .

Чтобы исключить необходимость определения величины  $s$ , оптическая система офтальмометра построена, таким образом, что изображение объекта  $l'$ , которое для оптической системы прибора является предметом, находится на одном и том же расстоянии от объектива. Для этого вся оптическая система устанавливается по отношению к глазу наблюдателя так, чтобы изображение совпадало с плоскостью неподвижно установленной сетки  $З$ , обеспечивая постоянство расстояния от объектива  $1$  до изображения  $M''N''$ , которое обозначено на рис.3.1 через  $c$ . Это значение заранее известно для офтальмометра и связано с  $s$  и  $s'$  соотношением:

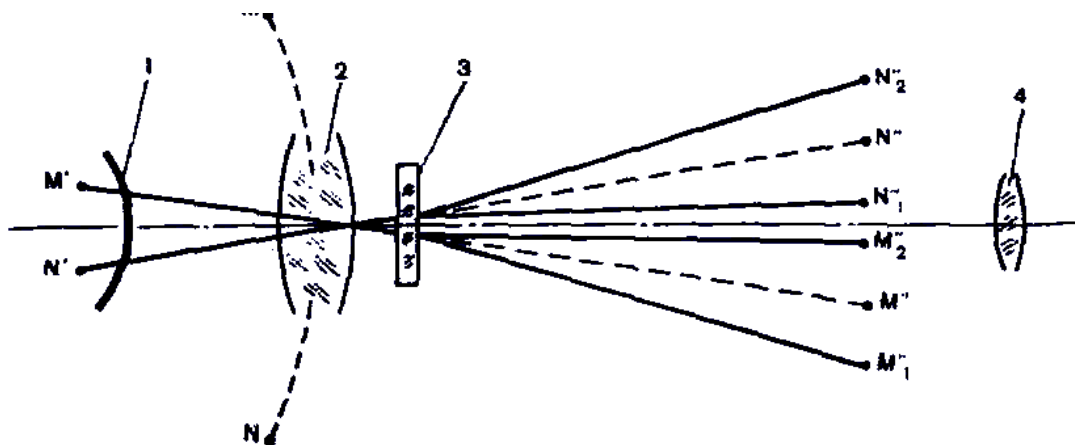
$$c = s - s'. \quad (3.4)$$

Решая совместно уравнения (3.1), (3.2) и (3.4), получим

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

Поскольку увеличение объектива  $\beta''$  величина постоянная для определенного прибора и заранее известна, постольку определение радиуса кривизны роговицы  $r$  сводится к измерению  $l'$  при известной  $l$  или  $l$  при известной  $l'$ . В первом случае величина объекта  $l$  постоянна, а  $l'$  переменна. Измеряя  $l'$ , определяют значение радиуса кривизны роговицы  $r$ . Такая схема используется в *офтальмометрах с неподвижными марками*. Во втором случае  $l'$  постоянна, а  $l$  — переменна и подлежит измерению. Вторая схема определения  $r$  используется, в *офтальмометрах с подвижными марками*.

Особенностью оптических схем всех офтальмометров, имеющих выносные световые марки, является наличие в них *элементов удвоения*, необходимых для фиксации подлежащих измерению постоянно перемещающихся изображений световых марок из-за движений глаза. При введении элемента удвоения (рис.3.2) вместо одного изображения в поле зрения элемента видны два  $M_1''N_1''$  и  $M_2''N_2''$ . Если точки  $M_2''N_2''$  совпадают, то величина линейного удвоения, которую всегда можно увязать с угловым удвоением  $2\varepsilon$ , равна величине изображения  $M''N''$ .

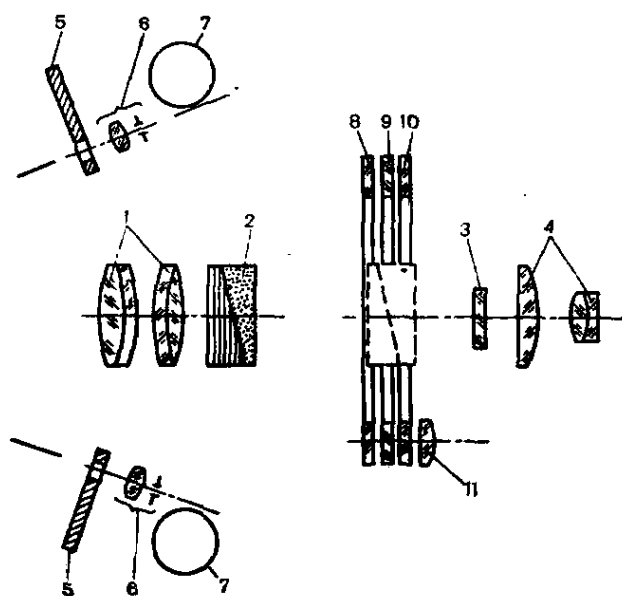


**Рис. 3.2.** Элемент удвоения в офтальмометре.  
1 - роговица глаза; 2 - объектив; 3 - элемент удвоения; 4 - окуляр.

Таким образом, зная величину удвоения, знают и величину изображения. Момент совпадения точек  $M_2''$  и  $N_1''$  хорошо виден в поле зрения офтальмометра, несмотря на то, что изображение объекта находится в постоянном движении. В приборах точки объекта  $M$  и  $N$  принадлежат специальным симметрично расположенным световым маркам.

**Офтальмометры с подвижными марками** характеризуются наличием двух подвижных световых марок, которые симметрично перемещаются по дуге, и элемента удвоения с постоянной величиной удвоения. Расстояние между марками изменяется до тех пор, пока величина изображения, зависящая от радиуса кривизны роговицы, станет равной  $l'$ , постоянной для данного офтальмометра. Расстояние между марками соответствует определенному радиусу кривизны роговицы, значение которого читается по шкале, связанной с подвижными марками.

**Офтальмометры с неподвижными марками** характеризуются наличием двух неподвижных световых марок и элемента удвоения. Значение удвоения изменяется до тех пор, пока не станет равно  $l'$ , которая в свою очередь зависит от радиуса кривизны роговицы. Каждому значению радиуса кривизны роговицы соответствует определенное значение удвоения, изменения которого связаны со шкалой радиусов кривизны роговицы глаза. Офтальмометр ОФ-3 представляет собой модель с неподвижными марками (рис.3.3). Особенностью ее является использование призмы Волластона в качестве переменного элемента удвоения, помещаемой в сходящемся пучке лучей и перемещающейся вдоль оптической оси. Призма Волластона представляет собой два склеенных клина с одинаковыми углами, изготовленных из исландского шпата с определенной ориентацией оптических осей.



**Рис.3.3.** Оптическая схема офтальмометра ОФ-3 с неподвижными марками

1-объектив; 2-элемент удвоения (призма Волластона); 3-сетка; 4-окуляр; 6-две марки; 6-источник света; 7-проекционное устройство; 8, 9 и 10-шкалы отсчета; 11 - лупа.

Прибор имеет три шкалы: шкалу измерения радиусов кривизны роговицы, шкалу рефракций и шкалу угловых мер (для определения астигматизма). Шкала рефракции отражает значения оптической силы роговицы в приближении равенства радиусов передней и задней поверхностей:  $D_{\text{роз}} = \frac{n_0 - 1}{r}$ , где  $n_0 = 1.336$  - показатель преломления водянистой влаги.

Современные офтальмометры, применяемые, прежде всего, при подборе контактных линз, а также при оптико-реконструктивных операциях на роговой оболочке глаза (кератотомия, кератофакия и др.), оснащаются устройством для топографии роговой оболочки глаза и съёмными перемещаемыми кюветами для измерения радиуса кривизны жестких и мягких контактных линз.

В связи с тем, что метод офтальмометрии обеспечивает прежде всего определение радиуса кривизны роговицы в двух главных сечениях, что недостаточно при подборе контактных линз, в последние годы все более широкое применение находят устройства, обеспечивающие кератоскопический, а теперь и фотокератометрические методы исследования формы передней поверхности роговой оболочки глаза, не требующие в своих схемах элементов удвоения.

**Фотокератометры.** Метод исследования, обеспечивающий фотокератометрию, основан на оценке фотоизображения, полученного в результате отражения тест-объектов в виде концентрических колец известных диаметров и радиальной сетки от исследуемой поверхности. Результатом оценки фотоизображения концентрических колец является топография роговицы глаза, по которой производится расчет и выбор жестких роговичных контактных линз.

На фотокератограмме получается изображение концентрических колец, расстояния между которыми различны и зависят от степени асферичности роговицы.

### 3.2. Рефрактометры

Рефрактометр предназначен для объективного определения недостатков оптической системы глаза, учитываемых для установления рефракции корректирующих очковых линз и положений главных сечений при астигматизме.

Наибольшее распространение в офтальмологических учреждениях нашел коинцидентный рефрактометр Хартингера производства комбината К. Цейс Иена.

Схема рефрактометра Хартингера построена на принципе совмещения изображений (коинциденции). Если перед глазом установить две диафрагмы (рис.3.4.), то резкое изображение точки *O* получится только тогда, когда плоскость изображения будет находиться на сетчатой оболочке. При несовпадении сетчатки с этой плоскостью получают два кружка рассеяния (принцип Шейнера).

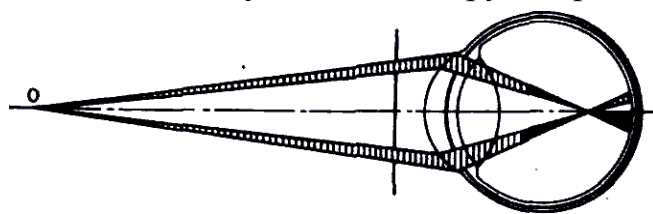


Рис.3.4. К объяснению принципа Шейнера.

В приборах в качестве тест-марки применяется не световая точка, а группа штрихов, нанесенных на посеребренную пластинку — *миру*.

С помощью оптических клиньев свет от верхней половины *миры* будет проходить через одну диафрагму, а от нижней — через другую. Так достигается раздельное проектирование двух половин на глазное дно.

Величина дефокусировки в этом случае будет зависеть от минимального расстояния между изображениями, которое еще не вносит заметного разделения изображений.

На рис.3.5 показана принципиальная оптическая схема рефрактометра, состоящая из систем освещения, наблюдения и отсчета. Осветительная и наблюдательная системы имеют общую офтальмоскопическую линзу.

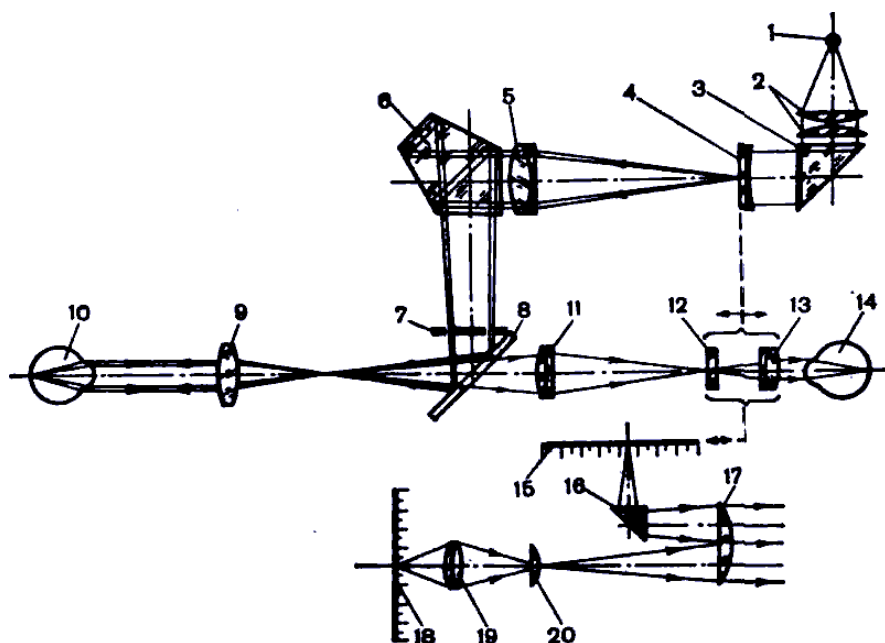


Рис.3.5. Принципиальная оптическая схема рефрактометра Хартингера.

Лучи от источника света 1, пройдя конденсор 2 и призму 3, падают на тест-марку 4, которая представляет собой три вертикальные и две горизонтальные щели. На вертикальных гранях призмы имеются две щели, разделяющие лучи, идущие от тест-марки, на два пучка. Далее эти пучки проходят объектив 5, пентапризму 6, диафрагму 7 с двумя щелями, отклоняются зеркалом 8 и с помощью офтальмоскопической линзы 9 попадают в исследуемый глаз 10. Пучки лучей, отраженные от глазного дна офтальмоскопической линзой, собираются в ее фокальной плоскости. Объективом 11 изображение из фокальной плоскости линзы переносится через отверстие в зеркале в плоскость сетки 12, затем рассматривается через окуляр 13 глазом наблюдателя 14.

Для определения рефракции наблюдатель совмещает изображение тест-марки с сетчаткой исследуемого глаза и производит отсчет. Отсчетная система включает в себя диоптрийную шкалу 15, по которой с помощью призмы 16 и лупы 17 определяются перемещения тест-марки. Отсчет поворота прибора вокруг горизонтальной оси производится по шкале 18 с помощью объектива 19, коллектива 20 и лупы 17.

**Автоматические рефрактометры.** Расширение применения инфракрасного излучения в оптике и современные достижения электроники позволили ряду зарубежных фирм Японии, США, ФРГ создать несколько моделей автоматических рефрактометров, значительно сокращающих этап объективного определения рефракции глаза, позволяющих обслуживать прибор младшим персоналом, документировать результаты измерений.

В автоматическом рефрактометре марка, освещенная инфракрасным светом, проецируется на дно исследуемого глаза. Изображение этой марки, отраженное от глазного дна, попадает на фотодатчики анализирующей системы через узкую щель, ориентируемую в каждый данный момент в одном из меридианов исследуемого глаза, и специальную подвижную оптическую систему. Анализатор настроен на поиск положения наибольшего контраста изображения (максимальной яркости). Поиск этот осуществляется перемещением линзы подвижной оптической системы. Положение линзы, при котором достигается наибольший контраст, указывает рефракцию глаза в данном меридиане. В процессе измерения щель, вращаясь, проходит все меридианы исследуемого глаза и данные, полученные в меридианах с максимальной и минимальной рефракцией, после двухразового измерения и при совпадении их, с помощью ЭВМ высвечиваются в привычной для офтальмологов форме: «сфера—цилиндр — ось».

### 3.3. Приборы для контроля средств коррекции зрения

Диоптриметры предназначены для измерения задней вершинной рефракции и призматического действия очковых линз а также для определения и простановки оптического центра, положения главного сечения с наименьшей рефракцией (ось цилиндра) у астигматических линз и направления главных сечений у призматических линз. Диоптриметры подразделяются на окулярные, проекционные и фото-

электрические.

**Окулярный диоптриметр.** Принцип действия его заключается в следующем: если в параллельный пучок лучей поместить очковую линзу, то, пройдя ее, параллельный пучок лучей преобразуется в сходящийся для положительной линзы или расходящийся — для отрицательной. Изменяя сходимость или расходимость пучка лучей, падающего на очковую линзу, можно добиться такого положения, когда из данной очковой линзы будет выходить параллельный пучок лучей.

Оптическая система, состоящая из объектива и световой марки (коллиматор), изображение которой через объектив рассматривается с помощью телескопической зрительной трубы, позволяет получить резкое изображение световой марки коллиматора на сетке зрительной трубы только в том случае, когда в объектив зрительной трубы попадает параллельный пучок лучей. Введение в ход лучей очковой линзы изменяет сходимость лучей и тогда изображение световой марки коллиматора на сетке зрительной трубы будет размытым. Если же перемещать световую марку коллиматора, то можно найти такое ее положение, при котором получится резкое изображение световой марки в поле зрения зрительной трубы.

Зная оптические данные объектива коллиматора и положение очковой линзы относительно объектива коллиматора, можно математически связать положение световой марки коллиматора, необходимое для получения ее резкого изображения, с положением заднего фокуса измеряемой очковой линзы. Положение заднего фокуса очковой линзы и определяет значение ее задней вершинной рефракции в дпт. Каждому положению световой марки коллиматора соответствует определенное значение задней вершинной рефракции измеряемой очковой линзы, которое нанесено на шкалу, перемещаемую вместе со световой маркой коллиматора.

Оптическая схема окулярного диоптриметра показана на рис.3.6. Лучи света от лампы 1 освещают световую марку 2. Чтобы из объектива 3 коллиматора выходил параллельный пучок лучей, световая марка 2 должна быть установлена в задней фокальной плоскости объектива коллиматора. При этом против отсчетного индекса должно находиться нулевое деление диоптрийной шкалы. Пройдя через плоскопараллельную стеклянную пластинку 4 (с агатовым стержнем 5), пучок лучей попадает в объектив зрительной трубы 6. Далее лучи света собираются в фокальной плоскости объектива 6, в которой помещены две пластины 7; на одной из них нанесено перекрестие, а на другой - круговая шкала. Изображение световой марки коллиматора, перекрестие и круговая шкала рассматриваются через окуляр 8. Установив по глазу окуляр на резкость изображения, наблюдатель 9 увидит изображение световой марки.

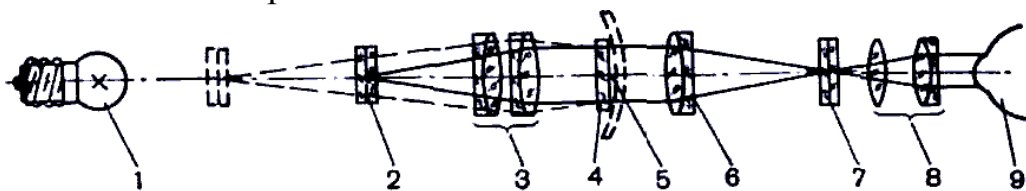


Рис.3.6. Принципиальная оптическая схема окулярного диоптриметра.

После того как в ход лучей введена очковая линза, четкое изображение световой марки коллиматора в фокальной плоскости объектива зрительной трубы мо-

жет быть получено только при смещении световой марки коллиматора 2 из фокальной плоскости объектива 3 вдоль оптической оси диоптриметра.

Если рефракция очковой линзы отрицательная, то для того, чтобы из коллиматора выходил параллельный пучок лучей, необходимо, чтобы падающий пучок был сходящимся, т. е. световая марка 2 должна быть выведена из фокальной плоскости объектива 3 влево от первоначального положения (в направлении от объектива), если же рефракция очковой линзы положительная, то для получения после нее параллельного пучка лучей необходимо, чтобы падающий пучок был расходящимся, т. е. световая марка 2 должна быть выведена из фокальной плоскости объектива 3 вправо от первоначального положения (в направлении к объективу).

При измерении задней вершинной рефракции стигматической линзы изображение световой марки коллиматора имеет вид круга из светлых точек, расположенного либо в центре, либо смещенного, если имеется призматическое действие проверяемой очковой линзы (очковая призма, децентрация стигматической линзы).

Если очковая линза астигматическая, то изображение световых точек коллиматора вытягиваются в группу параллельных линий, осью которых является прямая, лежащая в одном из главных сечений астигматической линзы. Резкое изображение этих линий можно наблюдать в двух положениях, соответствующих направлениям, перпендикулярным главным сечениям астигматической очковой линзы.

## 4. Оптическая микроскопия

### 4.1. Оптическая схема, увеличение и разрешающая способность биологического микроскопа

Возможность разрешения деталей предмета зависит от размеров его изображения на сетчатке глаза или от угла зрения. Угол зрения можно увеличить, приблизив предмет к глазу, что не всегда представляется возможным. Для увеличения угла зрения используют оптические приборы: телескопы, лупы, микроскопы. *Лупой называют оптическую систему, в передней фокальной плоскости которой или в непосредственной близости от нее расположен наблюдаемый предмет.* Изображение, даваемое лупой, находится в бесконечности или на удобном для глаза расстоянии. Если изображение в бесконечности, то оно наблюдается глазом без аккомодации. На рис.4.1,а показан ход лучей при использовании лупы (точка N является узловой точкой глаза).

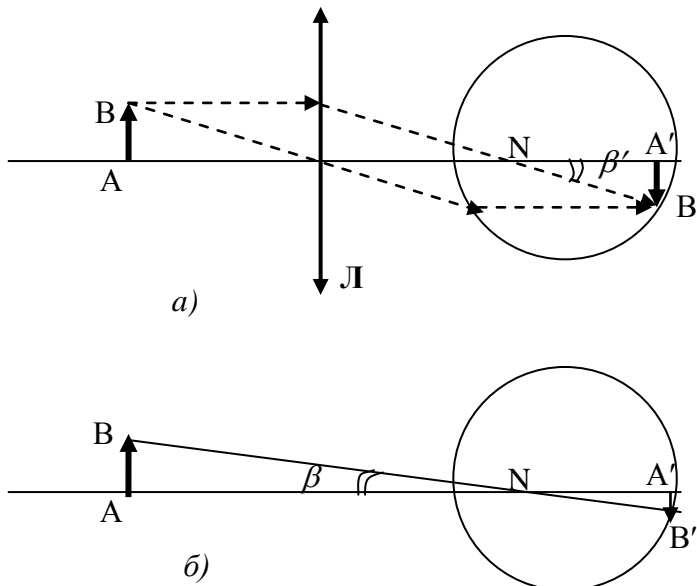


Рис.4.1. Ход лучей при использовании лупы (а) и в оптической системе невооруженного глаза (б).

Угол зрения при этом равен  $\beta' = L/f$ , где  $L$  – высота предмета,  $f$  – фокусное расстояние лупы. На рис.4.1,б приведен ход лучей в оптической системе невооруженного глаза. В этом случае угол зрения равен  $\beta = L/a_0$ , где  $a_0$  – расстояние наилучшего зрения. Увеличение лупы  $\Gamma = \beta'/\beta = a_0/f$ .

Увеличение лупы может быть от 2 до 40. Наиболее распространены лупы с 10-кратным увеличением, что позволяет наблюдать предмет размером до 7.5 мкм при остроте зрения 1. Для получения больших увеличений используют микроскоп.

**Оптическая схема микроскопа.** Микроскоп состоит из объектива и окуляра. Оптическая схема микроскопа приведена на рис.4.2. Главные плоскости и главные точки объектива обозначены  $H_1$  и  $H'_1$ , окуляра –  $H_2$  и  $H'_2$ ;  $F_1$  и  $F_2$  – передние фокусы объектива и окуляра;  $F'_1$  и  $F'_2$  – задние фокусы объектива и окуляра. Изображение  $A'B'$  предмета  $AB$ , созданное объективом, расположено в передней фо-

кальной плоскости  $F_2$  окуляра. В результате этого лучи, попадающие в глаз параллельны друг другу (как и при наблюдении при помощи лупы). Фокусное расстояние такой системы рассчитывается по формуле  $f = f_1 f_2 / \Delta$ ,

где  $f_1$  и  $f_2$  – фокусные расстояния объектива и окуляра;  $\Delta$  – расстояние  $F_1'F_2$  между задним фокусом объектива и передним фокусом окуляра (оптический интервал), называемое *оптической длиной тубуса микроскопа*.

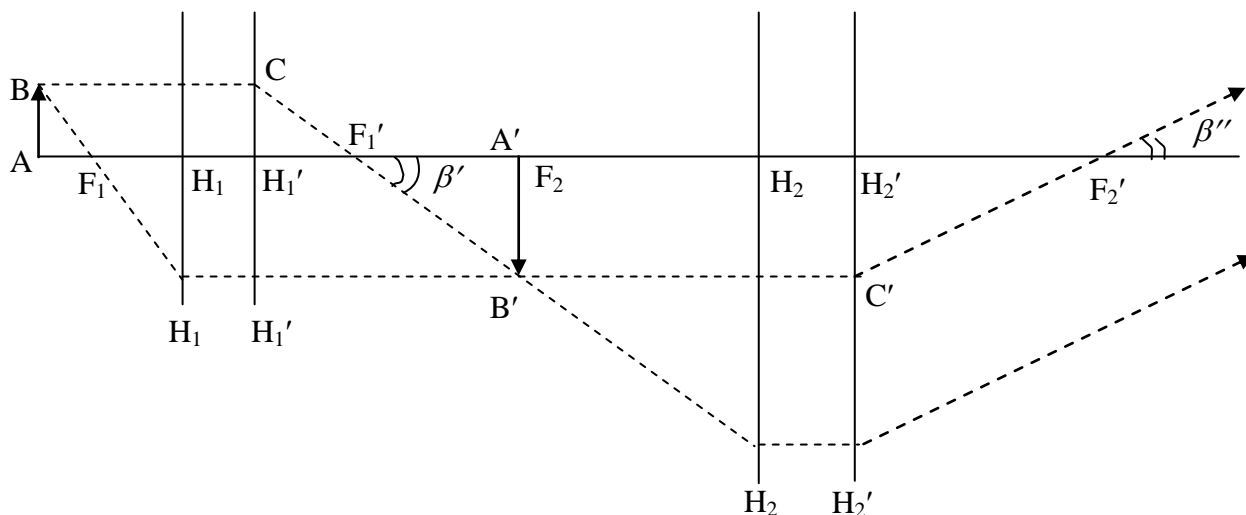


Рис.4.2. Оптическая схема микроскопа.

**Увеличение микроскопа.** Получим формулу для расчета величины увеличения ( $\Gamma$ ) микроскопа. С этой целью воспользуемся построениями рис.4.2. Из  $\Delta F_1'A'B'$  получим соотношение для угла зрения, под которым видно промежуточное изображение  $A'B'$ :

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

где  $L'$  - протяженность промежуточного изображения  $A'B'$ , даваемого объективом. Вместе с тем, из  $\Delta CH_1'F_1'$

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

Из  $\Delta C'H_2'F_2'$  получим соотношение для угла зрения, под которым видно изображение, даваемое окуляром микроскопа:

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

По определению 
$$\Gamma = \frac{\beta''}{\beta}, \quad (4.4)$$

где  $\beta = \frac{L}{a_0}$  - угол зрения, под которым виден объект невооруженным глазом.

Решая совместно уравнения (4.1-4.4) получим

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

Так как  $\Gamma_{об} = \frac{\beta'}{\beta}$ , то

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

Так как  $\Gamma_{ок} = \frac{\beta''}{\beta'}$ , то

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

Из соотношений (4.6) и (4.7) видно, что

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

**Разрешающая способность микроскопа.** Разрешающей способностью называют способность микроскопа давать раздельное изображение мелких деталей предмета. Эта величина обратная пределу разрешения – такому наименьшему расстоянию между двумя точками, когда эти точки различимы. Свет, освещающий объект, падает на линзу микроскопа, претерпев дифракцию на деталях объекта. Таким образом, структура светового пучка зависит от этого объекта. Рассмотрим случай, когда освещение производится параллельным пучком света (дифракция Фраунгофера), а объект имеет простую форму – правильную дифракционную решетку  $P_1P_1$  (рис.4.3).

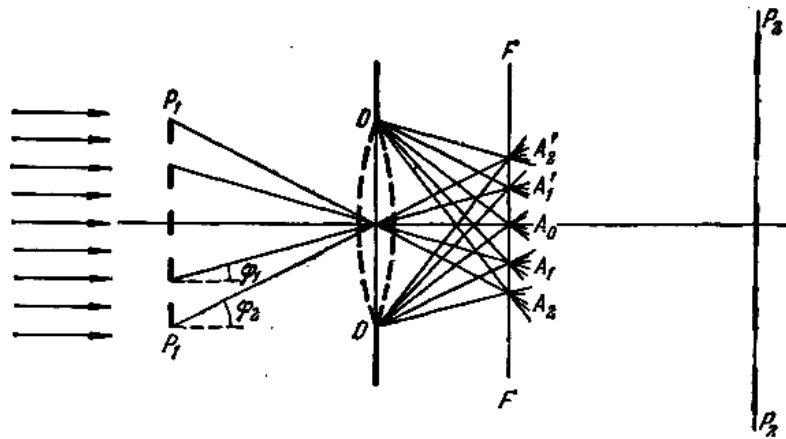


Рис.4.3. К дифракционной теории изображения Аббе.

Период решетки  $d$  и является в данном случае характеристикой детали, а разрешающая сила микроскопа определяет возможность различить при помощи микроскопа более или менее мелкую решетку, т.е. минимальное значение  $d$ . При этом в фокальной плоскости объектива образуются главные максимумы, угловые расстояния между которыми определяются периодом решетки. Если падающие пучки параллельны, то условие образования главных максимумов имеет вид  $d \sin \varphi = m\lambda$ . На оси микроскопа лежит нулевой максимум  $A_0$ . Максимумы  $m$ -го порядка ( $A_1, A_2, \dots$ ) лежат по направлениям, определяемым из соотношения

$\sin \varphi_1 = \pm m \lambda_0 / d$ . Так как все эти дифракционные максимумы соответствуют когерентным лучам, то за фокальной плоскостью объектива эти лучи, встречаясь, интерферируют между собой, давая изображение предмета. Согласно дифракционной теории изображения Аббе, картина, получаемая в фокальной плоскости  $FF$  объектива, называется *первичным изображением*, а картина в плоскости  $P_2P_2$  изображения предмета – *вторичным изображением*. Только полная совокупность дифракционных максимумов определит вторичное изображение в полном соответствии с объектом. Однако, входной зрачок объектива (оправа объектива) ограничивает число дифракционных максимумов. Аббе показал, что для соответствия вторичного изображения предмету необходимо, чтобы из первичного изображения проходили, по крайней мере, лучи центрального и одного из первых главных дифракционных максимумов. Чем меньше предмет и его детали  $d$ , тем большие углы дифракции он обуславливает и тем шире должно быть отверстие объектива. Отверстие объектива определяется углом  $2\alpha$  между крайними лучами, идущими от объекта, расположенного у фокуса, к краям объектива. Половина этого угла называется *апертурой*. Чем больше  $\sin \alpha$  по сравнению с  $\lambda_0 / d$  тем больше спектров высших порядков участвуют в формировании изображения, т.е. точнее передается наблюдаемый объект.

Обычно при освещении объекта используются не только пучки, идущие вдоль оси, но и пучки, наклонные к ней. В качестве примера на рис.4.4 показана конструкция осветительной системы микроскопа, обеспечивающей наблюдение объекта в сходящихся лучах.

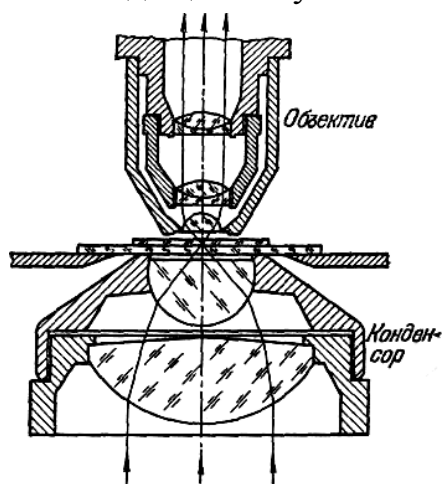


Рис.4.4. Разрез конденсора и объектива микроскопа.

Это улучшает условия разрешения. Если освещенный пучок идет под углом  $\alpha$  к оси микроскопа и дифрагирует под углом  $\alpha_0$ , то условие максимума дифракции при наклонном падении света имеет вид:

$$\sin \alpha_0 - \sin \alpha = m \lambda / d .$$

Тогда условие, при котором хотя бы первый дифракционный максимум попадает в объектив примет вид:  $\alpha = -U$ ,  $\alpha_0 = U$  т.е.  $\alpha = -\alpha_0$  при  $m=1$ .

Тогда условие разрешения примет вид

$$2 \sin U \geq \lambda / d = \lambda_0 / nd , \text{ откуда}$$

$$d \geq \frac{0.5 \lambda_0}{n \sin U} . (4.9)$$

где:  $n \sin U = A$  – числовая апертура объектива.

Таким образом, разрешающая способность микроскопа зависит от числовой

апертуры объектива и длины волны света. Числовая апертура может быть увеличена при использовании жидкой среды—*иммерсии*, расположенной между объективом и покровным стеклом. В качестве иммерсии используют воду ( $n=1.33$ ), кедровое масло ( $n=1.515$ ) и др.

#### 4.2. Некоторые специальные приемы оптической микроскопии

**Измерение размеров микроскопических объектов.** В настоящее время широко применяется окулярно–винтовой микрометр. Этот прибор устанавливают вместо окуляра. При вращении винта перемещается перекрестие, что позволяет отсчитывать доли делений микрометра. Окулярно–винтовой микрометр нуждается в предварительной градуировке.

**Микропроекция и микрофотография.** Обычный микроскоп сам по себе не создает действительного изображения (лучи на выходе микроскопа параллельные). Для фотографирования или проекции необходимо сформировать действительное изображение. Для этого, изображение, даваемое объективом надо расположить дальше фокусного расстояния окуляра.

**Метод темного поля (ультрамикроскопия).** Правильные изображения частиц, размеры которых меньше  $d$  получить нельзя. Однако само существование таких частиц можно установить при помощи микроскопа при специальном способе наблюдения. Этот способ основан на явлении рассеяния света на малых частицах. Схема расположения приборов показана на рис.4.5.

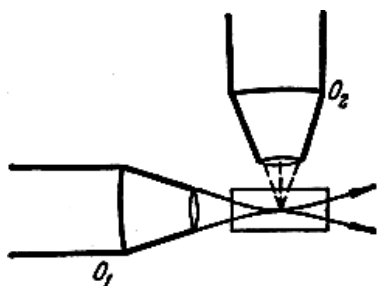


Рис.4.5. Оптическая схема ультрамикроскопа.

Интенсивный пучок света концентрируется при помощи объектива  $O_1$  на камере, где подозревают наличие ультрамикроскопических объектов. Если таких объектов или более крупных частиц нет то свет от объектива проходит по горизонтальному направлению, не попадая в верхний объектив  $O_2$ . Если же на пути лучей имеются частицы, то свет рассеивается ими, попадая в объектив  $O_2$ , и дает в вертикальном микроскопе дифракционную картину, позволяющую определить положение и перемещение частиц, но дающую лишь весьма приближенное представление об их форме.

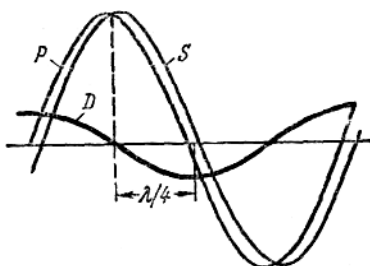
В ультрамикроскопе осуществляется принцип *темного поля*, состоящий в том, что мы устраним из поля зрения прямые лучи и наблюдаем лишь дифрагированные. На этом принципе основано применение специальных конденсоров, создающих такое освещение препарата на микроскопическом столике, при котором на него падает интенсивный пучок косо направленных лучей, непосредственно в объектив не попадающих. Центральные лучи задерживаются специальной непрозрачной шторой, а боковые лучи претерпевают полное внутреннее отражение, отражаются от зеркальной поверхности и концентрируются на объекте. Направление их таково, что в объектив они не попадают; только лучи, претерпевшие ди-

фракцию на объекте, могут попасть в объектив. Если размеры объекта значительны (больше  $\lambda/2$ ) то в объектив попадают одновременно дифракционные максимумы разных порядков, и мы увидим изображение, имеющее форму объекта.

**Метод фазового контраста.** Описанные микроскопические методы могут быть полезны для объектов, которые выделяются на всем поле зрения вследствие своей способности иначе поглощать свет, чем окружающая среда (абсорбционные структуры). В биологии очень распространено наблюдение объектов, отличающихся от окружающей среды главным образом по своему показателю преломления (*рефракционные структуры*). Поскольку рефракционные структуры вносят изменения в фазу волн, то эти изменения нельзя непосредственно зафиксировать, поскольку приемники излучения регистрируют амплитуду, а не фазу волны.

Если изменить фазу нулевого спектра  $S$  на  $\pi/2$ , то мы устраним различие между тем, что дают абсорбционные и рефракционные структуры, и сможем увидеть эти последние. Те места структуры, которые дают большее изменение в фазе, можно сделать темными или светлыми в зависимости от того, будет ли добавочная разность фазы в нулевом максимуме равна  $+\pi/2$  или  $-\pi/2$ .

Объясним различие в фазе между прямым светом (нулевой максимум) и рассеянным (свет дифракции остальных порядков). Для этого представим себе объект в виде однородной прозрачной среды, отдельные участки которой, будучи также прозрачными, слегка отличаются по показателю преломления (рефракционная структура). Объект освещен с помощью конденсора параллельным пучком света. Если бы различий в показателе преломления не было, то свет сквозь препарат прошел бы без отклонения, давая не отклоненную (не дифрагированную) волну  $P$ . При наличии указанного различия в показателе преломления, часть света испытывает рассеяние (дифракцию), давая отклоненную волну  $D$ , а большая часть  $S$  пройдет по первоначальному направлению (спектр нулевого порядка), но испытает по сравнению с волной  $P$  некоторое смещение по фазе, например, запаздывание, если показатель преломления этого участка больше, чем у окружающей среды. График на рис.4.6 показывает этот небольшой сдвиг фазы между волнами  $P$  и  $S$ . Разность обеих волн и представляет собой дифрагированную волну  $D$ . Так как  $P, S$  близки по амплитуде и немного отличаются по фазе, то легко убедиться, что волна  $D$  будет иметь небольшую амплитуду и смещена по фазе на  $\pi/2$  по отношению к  $S$ , а следовательно и к  $P$



**Рис.4.6.** Образование дифрагированной волны  $D$  при наблюдении рефракционной структуры.

В обычном микроскопе в построении изображения участвуют и  $S$  и  $D$ , давая в совокупности волну  $P$ , не отличающуюся от того, что дают места, соседние со структурой. Таким образом, обычный микроскоп не позволяет отличить разные участки рефракционной структуры. Задержав  $S$  мы получим микроскоп с темным полем, в котором структура уже может наблюдаться благодаря наличию дифрагированной волны  $D$ . Изменив же фазу  $S$  на  $\pm\pi/2$ , мы заставим  $S$  и  $D$  складываться

так, чтобы дать усиление по сравнению с Р(фазы S и D уравниваются) или ослабление по сравнению в Р(фазы S и D противоположны), т.е. получим более контрастное изображение, светлое или темное на окружающем поле.

Так как S и D сильно отличаются по амплитуде, то полезно с помощью ослабляющего фильтра ослабить интенсивность S до интенсивности D. Поэтому пластинка, предназначенная для изменения фазы на  $\pm\pi/2$ , обычно одновременно используется для соответствующего ослабления S. На рис.4.7. показана оптическая схема устройства фазового контраста.

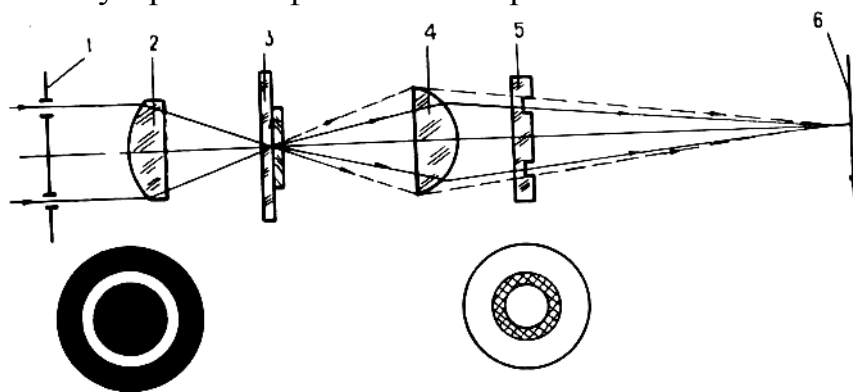


Рис.4.7. Оптическая схема устройства фазового контраста.

Кольцевая диафрагма 1 устанавливается вместо обычной ирисовой диафрагмы в передней фокальной плоскости конденсора 2. Свет, проходя через препарат 3, попадает в объектив 4, в выходном зрачке которого получается изображение кольцевой диафрагмы 1. В выходном зрачке фазового объектива помещена фазовая пластинка 5 с фазовым кольцом. Фазовое кольцо представляет собой вытравленную на расчетную глубину и покрытую тонким слоем алюминия канавку. Фазовое кольцо полностью перекрывает изображение кольцевой диафрагмы конденсора. Через фазовое кольцо проходит нулевой порядок дифракционного спектра (S - волна, сплошные линии на рисунке), который частично поглощается слоем алюминия и претерпевает сдвиг по фазе на  $90^0$ . Свет, дифрагированный препаратом (D-волна, штриховые линии на рисунке), проходит мимо фазового кольца и не претерпевает никаких изменений.

С помощью описанного устройства осуществляется позитивный фазовый контраст, при котором в плоскости изображения 6 участкам препарата с большим показателем преломления соответствуют более темные участки.

## 5.Спектральный анализ в биомедицинских исследованиях

### 5.1.Абсорбционная спектроскопия.

Абсорбционная спектроскопия основана на исследовании спектров поглощения веществ. Существует несколько форм представления спектров поглощения. Однако, все они основаны на использовании закона Бугера:

$$I = I_0 e^{-\alpha d}$$

где:  $I_0$ ,  $I$  –интенсивность падающего и прошедшего через исследуемое вещество света;  $\alpha$  - коэффициент поглощения,  $d$ -толщина кюветы при исследовании жидких образцов или толщина поглощающего слоя при исследовании твердых образцов.

При этом величину  $I/I_0 = \tau$  называют коэффициентом пропускания, а  $\ln I_0/I = D$  называют оптической плотностью вещества. Очевидно, что эти характеристики связаны простым соотношением:  $D = -\ln \tau$ .

Таким образом, спектры поглощения представляются в виде зависимостей  $\alpha$ ,  $\tau$ ,  $D$  от длины волны или частоты света.

Поскольку в биологии и медицине чаще всего имеют дело с растворами, то для определения спектров поглощения веществ, находящихся в растворителе (обычно это водные растворы) используют метод относительных измерений спектров поглощения. Суть метода состоит в том, что проводятся измерения спектров поглощения двух образцов: в одной кювете находится растворитель - эталон, а в другой раствор исследуемого вещества. При этом отношение интенсивностей света, прошедшего через раствор ( $I_p$ ) и растворитель - эталон ( $I_{эм}$ ), позволяет рассчитать оптическую плотность исследуемого вещества. Согласно закону Бугера, оптическая плотность исследуемого вещества определится следующим образом

$$D = I_p/I_{эм} = e^{(\alpha_p - \alpha_{эм})d},$$

где  $\alpha_p$ ,  $\alpha_{эм}$  – коэффициенты поглощения раствора и растворителя, соответственно.

В лабораторной диагностике для измерения спектров поглощения используют спектрофотометры. Принципиальная схема спектрофотометра показана на рис.5.1

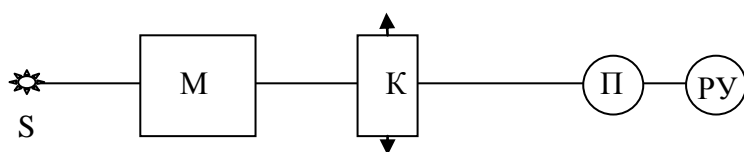


Рис.5.1 Принципиальная схема спектрофотометра

Излучение источника света S проходит через монохроматор и направляется на кювету, расположенную в кюветном отсеке(К). В кюветном отсеке расположено 4 кюветы (одна- для растворителя-эталона и три для исследуемых растворов). Конструкция отсека позволяет производить перемещение кювет относительно падающего луча света. Свет, прошедший через кювету, попадает на фотоэлектрический преобразователь (П). Сигнал с выхода преобразователя направляется в реги-

стрирующее устройство - измерительный прибор или компьютеризованная система обработки информации (ПУ). Современные спектрофотометры позволяют осуществлять качественный и количественный анализ растворов по наличию характерных линий поглощения, например, хромофоров. Исходя из того, что оптическая плотность пропорциональна концентрации вещества  $C_x$  в растворе  $D_x = D_0 + aC_x$ , где  $D_x$ ,  $D_0$  - оптическая плотность раствора и растворителя-эталопа(воды),  $a$  - стала величина. Для определения постоянной величины  $a$  необходимо воспользоваться раствором с известной величиной концентрации анализируемой пробы.

## 5.2. Люминесцентная спектроскопия.

Многие биологические растворы способны люминесцировать. В белках, например, люминесцентное свечение, как и оптическое поглощение, обусловлено хромофорами. Хромофоры обладают характерными линиями оптического поглощения и излучения. Люминесцентная спектроскопия основывается на исследовании спектров фотолюминесценции. По положению наблюдаемых линий излучения и их яркости осуществляют качественный и количественный анализ растворов. Приборы для проведения люминесцентного анализа называются флуориметрами. Принципиальная схема флуориметра показана на рис.5.2. Основными элементами флуориметра являются: источник возбуждающего света (S); фильтр ( $\Phi_1$ ), выделяющий коротковолновый возбуждающий свет; запирающий фильтр ( $\Phi_2$ ), перекрывающий доступ в монохроматор возбуждающего света; кювета для исследуемого раствора (К); монохроматор (М), или набор интерференционных светофильтров; фотоэлектрический преобразователь (П) и регистрирующее устройство (ПУ). Источником света обычно служит газоразрядная лампа, дающая мощное излучение в ультрафиолетовом диапазоне спектра. В качестве фотопреобразователя используют полупроводниковые диоды или фотоэлектрические умножители. В современных флуориметрах регистрирующее устройство включает усилитель электрического сигнала и компьютер.

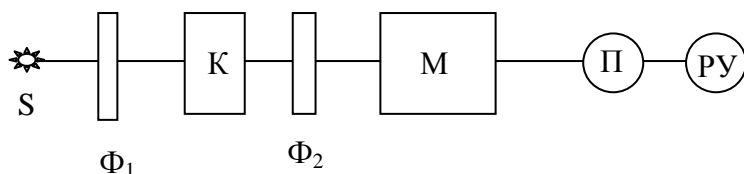


Рис.5.2. Принципиальная схема флуориметра.

Спектральные исследования люминесценции часто дополняются исследованиями спектров возбуждения. Спектр возбуждения представляет собой зависимость интенсивности люминесцентного излучения от длины волны возбуждающего света. Схема измерения спектров возбуждения показана на рис.5.3.

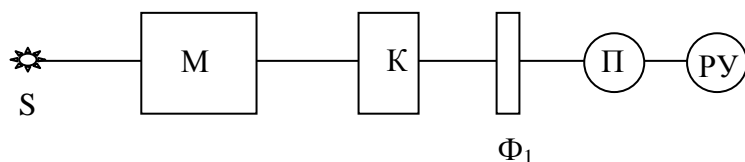


Рис.5.3. Схема измерения спектров возбуждения фотолюминесценции

Излучения источника света (S), обладающего непрерывным спектром, пропускается через монохроматор (M), и направляется на кювету (K) с исследуемым веществом. Фильтр ( $\Phi_1$ ) поглощает возбуждающий свет и пропускает более длинноволновое люминесцентное излучение, которое направляется на фотоэлектрический преобразователь (П). Интенсивность люминесценции на различных длинах волн возбуждающего света фиксируется при помощи регистрирующего устройства (РУ).

### 5.3. Спектрометрия химических элементов.

Спектрометрия представляет собой метод обнаружения и измерения в пробах концентраций химических элементов.

Различают *атомно-абсорбционный* и *атомно-эмиссионный спектральный анализ*. Первый из них основан на измерениях спектров поглощения атомов в пробах. При атомно-абсорбционном анализе на фоне сплошного спектра источника света наблюдают темные линии поглощения химических элементов пробы. Большая яркость фона и малая толщина спектральных линий атомов примеси существенно ограничивают порог обнаружения пробы. Такого недостатка лишены атомно-эмиссионные спектрометры. Принцип действия атомно-эмиссионного спектрометра основан на измерении спектров излучения атомов химических элементов. Такое излучение, как известно, обусловлено переходами электронов из возбужденного в основное состояние атома. В более ранних конструкциях атомно-эмиссионных спектрометров использовался самостоятельный разряд в парах анализируемой пробы. Самостоятельный разряд в газе является мощным источником сплошного фона (спектра), занимающего весь рабочий диапазон длин волн. При возбуждении анализируемой пробы в самостоятельном разряде, на фотоприемник поступает излучение анализируемого элемента, а также излучение сплошного фона. При малых концентрациях анализируемого элемента, флуктуации этого фона являются главным фактором, ограничивающим предел обнаружения элемента. Такие спектрометры имеют порог обнаружения несколько ниже, чем атомно-абсорбционные.

Новейшие атомно-эмиссионные спектрометры используют несамостоятельный газовый разряд в парах анализируемого вещества при относительно высоком давлении паров в камере возбуждения. Учитывая, что энергия ионизации атомов гелия, заполняющих измерительную камеру, составляет более 24эВ, а энергия ионизации анализируемых элементов, как правило, не превышает 11 эВ, подбирается такое ускоряющее напряжение газового разряда, при котором происходит эффек-

тивное возбуждение и даже ионизация анализируемых атомов, но отсутствует ионизация гелия, а следовательно и сплошной фон. В этих условиях происходит только разряд в парах анализируемой пробы. Буферный газ гелий участия в разряде не принимает, а служит, в основном, для уменьшения диффузии атомов пробы. Благодаря возможности управления энергией электронов, путем изменения величины ускоряющего напряжения, имеется возможность селективного возбуждения элементов с малой энергией возбуждения. Малая величина (10мкг) анализируемой пробы в сочетании с высокой чувствительностью спектрометра дают возможность определения достаточно низких концентраций элементов в пробах, например, в биологии и медицине. В частности в атомно-эмиссионном спектрометре СЭВ-30 предел обнаружения по меди составляет 0.1мкг/дм<sup>3</sup>.

В качестве примера рассмотрим устройство атомно-эмиссионного спектрометра СЭВ-30. Герметичная измерительная камера спектрометра снабжена окнами для наблюдения и вывода излучения на монохроматор, а также люком для подачи пробы. В измерительной камере расположены две спирали из вольфрама. Одна из спиралей служит катодом-атомизатором, а вторая – анодом. Камеру заполняют гелием до заданного давления и производят импульсный нагрев катода-атомизатора до температуры 2000-3000<sup>0</sup>С. Сухой остаток пробы при этом атомизируется и атомные пары образуют облако вокруг катода-атомизатора. Благодаря высокому давлению гелия в камере, замедляется рассеивание этого облака и увеличивается время пребывания анализируемых атомов в зоне возбуждения.

Одновременно с атомизацией пробы происходит эмиссия электронов нагретой спиралью катода-атомизатора. В электрическом поле между катодом-атомизатором и анодом электроны приобретают энергию, необходимую для возбуждения или ионизации атомов анализируемых элементов. Поскольку энергия ионизации гелия значительно больше энергии ионизации атомов анализируемых элементов, то оптическая система спектрометра анализирует только излучения атомов анализируемых элементов.

Объектами исследования в рассматриваемом спектрометре могут быть особо чистые металлы, сплавы, вода, воздух, почва, продукты, биологические и медицинские объекты. Управление прибором, обработка измерений и документирование результатов осуществляются с помощью компьютера. Продолжительность одного анализа составляет 30с.

## 6. Оптические квантовые генераторы в медицине

### 6.1. Свойства лазерного излучения

Традиционная фотобиология с использованием обычных (тепловых) источников света довольно успешно развивалась в течение многих лет с выходом в практическую фотомедицину по трем главным направлениям: диагностика, терапия и хирургия.

Прежде чем обсуждать особенности взаимодействия лазерного излучения с биологическими объектами и те новые возможности, которые оно дает в фотобиологии и медицине, рассмотрим свойства лазерного излучения и их принципиальные отличия от свойств излучения некогерентных источников света (ламп накаливания, дуговых ламп, Солнца и пр.).

**Монохроматичность** и, вытекающая отсюда, **высокая спектральная плотность мощности лазерного излучения** обеспечивают

- проведение спектрального анализа с разрешением, на много порядков превышающим разрешение традиционных спектрометров;
- высокую степень селективности возбуждения определенного сорта молекул в растворах;
- возможность реализовывать голографические и интерферометрические методы диагностики биообъектов.

Высокая монохроматичность определяет значительную спектральную плотность излучения. Например, для лазера с выходной мощностью  $P=1$  Вт,  $\Delta\nu=1$  МГц, радиусом пучка  $r=2$  мм и  $\lambda=500$  нм спектральная плотность мощности, падающая на единицу поверхности, равна  $2,6 \cdot 10^7$  Вт/(нм·см<sup>2</sup>). Для сравнения, аналогичная величина для солнечного излучения равна  $1,3 \cdot 10^{-4}$  Вт/(нм·см<sup>2</sup>).

**Пространственная когерентность** излучения лазеров дает возможность получать световые пучки с высокой степенью их направленности (коллимированности) и позволяет фокусировать их на объекте до чрезвычайно малых размеров. Все это необходимо для дистанционного анализа изучаемых объектов, обеспечения локальности исследований и эффективной транспортировки излучения по волоконным световодам, что тепловые источники в принципе обеспечить не могут. Лазеры, как правило, излучают пространственно-когерентные *гауссовские пучки*. Для большинства лазеров *расходимость* составляет несколько тысячных радиана (мрад). Такой пучок можно сфокусировать до очень малых размеров порядка длины волны. Эти свойства лежат в основе лазерной микроскопии.

Отметим, что в ряде биологических приложений сфокусированный «рабочий пучок» может оказаться существенно меньше размеров длины волны и составлять около 0,01 мкм, поскольку действие светового излучения в зависимости от интенсивности носит пороговый характер, а интенсивность в центре пучка максимальная. Таким способом можно, например, проводить тонкую внутриклеточную «хирургию».

Лазеры с поляризованным излучением характеризуются **высокой степенью поляризации**. Однако вид поляризации (линейная, круговая, эллиптическая) у раз-

ных лазеров может быть разным. В большинстве случаев это связано со свойствами оптического резонатора. Резонаторы с брюстеровскими окошками разрядной трубки или внутренними призмами имеют устойчивую линейную поляризацию. Для промышленных лазеров с линейной поляризацией степень поляризованности, т. е. отношение интенсивностей света при взаимно ортогональных положениях анализатора, составляет 500:1.

Другой класс часто используемых резонаторов лазеров — это изотропные резонаторы. Например, промышленность выпускает лазеры с внутренними зеркалами. Высокое качество зеркал таких лазеров обеспечивает идеальную круговую поляризацию излучения.

Передача лазерного излучения по волоконным световодам круглого сечения приводит к деполяризации излучения за счет возбуждения многих волноводных мод. В зависимости от типа световода длина, на которой происходит полная деполяризация излучения, изменяется от нескольких десятков сантиметров до нескольких метров. Сравнительно широкие медицинские световоды с диаметром сердцевины 400-1000 мкм имеют малую длину деполяризации (несколько десятков сантиметров). Разработаны специальные одномодовые анизотропные световоды (например, с эллиптическим сечением сердцевины), которые сохраняют состояние поляризации на расстояниях несколько сотен метров. Поперечные размеры сердцевины таких световодов чрезвычайно малы (5-7 мкм), поэтому существует проблема ввода излучения.

Чрезвычайно высокая интенсивность лазерного излучения позволяет сконцентрировать в малом объеме значительную световую энергию, тем самым вызвать **многофотонные и другие нелинейные процессы в биологической среде, локальный тепловой нагрев, быстрое испарение, гидродинамический взрыв и т. д.**

Одним из замечательных свойств лазеров и лазерного излучения является возможность получения **импульсов пикосекундной и субпикосекундной длительности**. В видимой области удалось вплотную подойти к теоретическому пределу по длительности и сформировать импульс длительностью 8 фс. Все это дает возможность изучать очень быстрые первичные фотопроцессы в биологии прямыми, а не косвенными методами, а также многоступенчато возбуждать высокие энергетические состояния молекул за время значительно меньшее, чем время релаксации любого промежуточного состояния.

Для изучения большинства быстрых фотопроцессов в биологии достаточной оказывается длительность импульсов в несколько пикосекунд, однако для изучения ультрабыстрых стадий преобразования энергии некоторыми биомолекулами необходимы и субпикосекундные источники (порядка 100 фс).

**Свойство перестраиваемости длины волны лазерного излучения** в совокупности с его чрезвычайно монохроматичностью позволяет использовать лазеры в качестве спектрометров ультравысокого разрешения. В принципе любой лазер допускает перестройку частоты (длины волны). Правда, для одних лазеров она может быть только дискретной с очень узким диапазоном *вблизи* дискретных длин волн, а для других непрерывной в довольно широком диапазоне длин волн. Наличие перестраиваемых лазеров во всей области от УФ до ИК позволяет селек-

тивно возбуждать практически любые состояния биомолекул и отдельных ее фрагментов.

Обсуждая свойства лазерного излучения, нельзя не обратить внимание на одно важное для применения свойство - способность формировать **спекл-картину** при отражении от шероховатой поверхности. Рассеянный этой поверхностью свет состоит из хаотически распределенных темных и светлых пятен (спеклов). Поскольку биообъекты в большинстве своем шероховаты, то они всегда должны формировать спекл-картину и в этом смысле вносить некоторые искажения в результаты исследований. С другой стороны, спекл-картина несет информацию о свойствах поверхности биообъекта, что можно использовать в диагностических целях.

## **6.2. Особенности взаимодействия оптического излучения с биологическими системами**

Применение оптического излучения в биологии и медицине основано на использовании широкого круга явлений, связанных с разнообразными проявлениями взаимодействия света с биологическими объектами. Оптическое излучение может отражаться, поглощаться, рассеиваться, возбуждать люминесценцию биологической среды, и каждый из этих процессов несет информацию о микро- и макро-структуре этой среды, движении и форме отдельных ее составляющих. Видимый и УФ свет могут оказывать фотобиохимическое действие. Яркими примерами этого являются фотосинтез растений и бактерий, а также механизм зрения. Высокоинтенсивное световое излучение УФ, видимого и ИК диапазонов длин волн оказывает разрушающее (деструктивное) действие на биологические объекты.

**Виды взаимодействий оптического излучения с биообъектами.** Процессы, характеризующие виды взаимодействий оптического излучения с биообъектами, можно разделить на три группы. К первой относятся все не возмущающие взаимодействия (по крайней мере, в пределах погрешностей измерений не оказывающие заметного действия на биообъект), ко второй - процессы, в которых проявляется фотохимическое действие, и к третьей - процессы, приводящие к фоторазрушению. На рис.6.1 представлена классификация видов взаимодействий лазерного излучения с биообъектами.

**Степень гомеостаза живого объекта.** Поскольку мы имеем дело с живыми объектами, то помимо физико-химических проявлений действия оптического излучения необходимо учитывать его влияние и на функционирование живой материи. Это влияние определяется степенью гомеостаза живого объекта. *Степень гомеостаза характеризует состояния и процессы, обеспечивающие устойчивость организма к внешним возмущениям.* Степень гомеостаза является функцией эволюционного развития и оказывается наименьшей у биологических молекул и высшей у позвоночных животных. Свет малой интенсивности не запускает адаптационные механизмы биосистемы. По мере роста интенсивности сначала затрагивается гомеостаз живой системы на локальном уровне, затем включаются общие адаптационные и регуляторные механизмы системы, полностью ее восстанавливающие, далее они уже не обеспечивают полное восстановление и частично происходят необратимые процессы, которые нарастают и приводят к разрушению

ям в системе. Однако объект можно еще считать «живым». При высоких интенсивностях излучения разрушения оказываются настолько значительными, что объект уже не может считаться «живым».

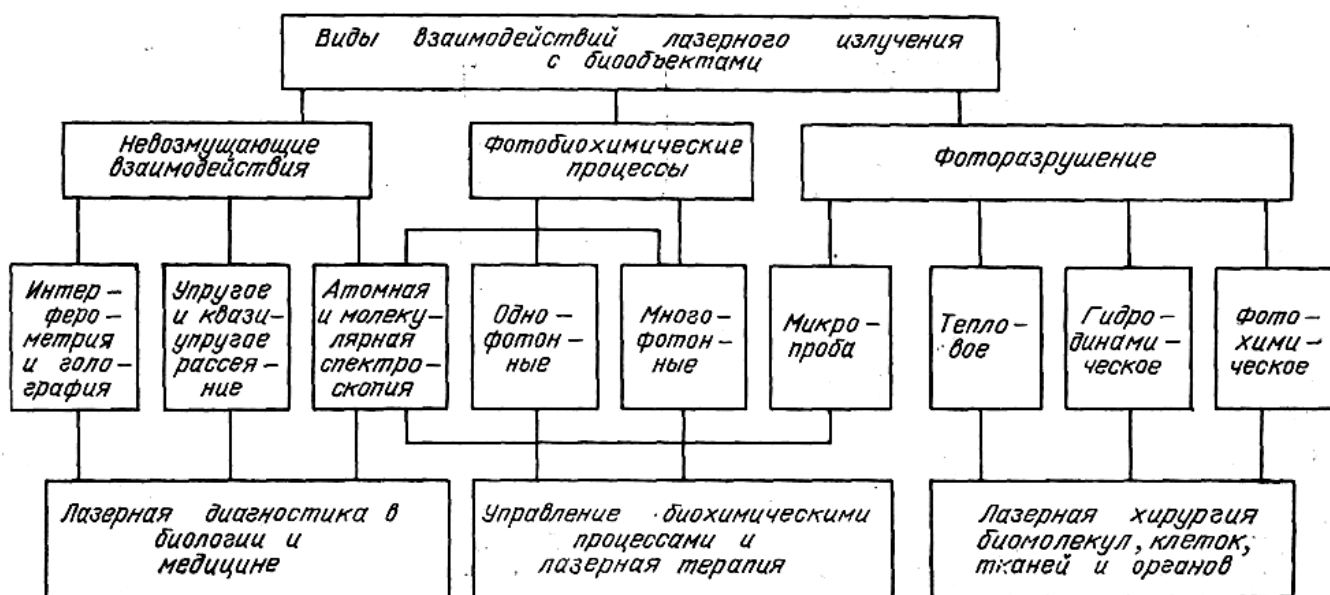


Рис.6.1. Классификация видов взаимодействий лазерного излучения с биообъектами.

Для взаимодействия света с биологическими объектами оказывается важной **длительность облучения**. В этом также может проявить себя гомеостазная природа живой материи. В зависимости от длины волны и интенсивности света пороговая длительность облучения, при которой начинают происходить морфологические изменения, может быть различной для одного и того же объекта. При этом в зависимости от периодичности световых импульсов возможны резонансные явления, поскольку известно, что период колебаний фотоотклика биологических систем изменяется в пределах от  $10^{-3}$  до  $10^3$  с.

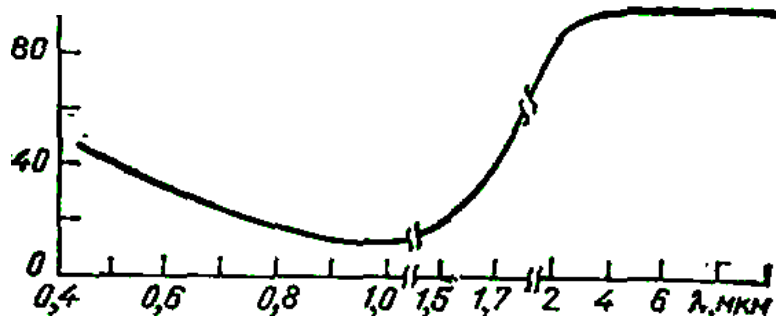
Результаты воздействия лазерного излучения на живой организм определяются как физическими свойствами отдельных тканей организма (отражающей и поглощающей способностью, теплоемкостью, теплопроводностью, теплотой парообразования, акустическими и механическими свойствами), так и характеристиками лазерного излучения, основными из которых являются энергия в импульсе, спектральная плотность излучения, длина волны.

Цепь химических и биохимических процессов, возникающих в биологическом объекте под влиянием лазерного излучения, начинается с поглощения световой энергии. Одновременно с поглощением происходит ряд других физических процессов: отражение света на границах раздела между двумя средами (клетками, тканями), преломление излучения при прохождении границы раздела между двумя оптически разнородными средами, рассеяние излучения частицами ткани, люминесценция, поляризационные эффекты, связанные с дихроизмом живых тканей.

**Поглощение оптического излучения.** В соответствии с общими принципами фотобиологии воздействие света, в том числе и лазерного излучения, должно проявляться только при наличии в клетках соответствующих молекул - хромофоров, способных поглощать свет определенных длин волн. Вследствие того, что биологическое действие лазерного излучения начинается только с поглощением квантов света, важнейшей характеристикой биологической системы является ее спектр поглощения, обобщающий спектры поглощения молекул различных веществ, входящих в эту систему. Каждое из этих веществ, составляющих биологическую систему, ферменты, гормоны, витамины, пигменты и т. д. - имеет свой, только ему присущий спектр поглощения. Например, у белков хромофорами являются различные остатки аминокислот, которые поглощают в УФ области ( $\lambda=200-300$  нм), нуклеиновые кислоты также поглощают в этой области. Поглощение видимого излучения обусловлено такими биомолекулами, как гемоглобин, хлорофилл, флавины, каротиноиды, фикобилины и фитохром.

В связи с этим, рассмотрим поглощение света кровенаполненной мышечной тканью (рис.6.2). Доля световой энергии, поглощенной тканью, оценивается как отношение разности энергий падающего и выходящего света ( $I_0-I$ ) к энергии падающего света ( $I_0$ ). В УФ-диапазоне поглощение света происходит за счет белков, содержащихся в ткани.

$(I_0-I)/I_0, \%$



**Рис.6.2.** Зависимость доли световой энергии, поглощенной кровенаполненной биотканью толщиной 1мм, от длины волны.

В интервале длин волн 0.45-0.50 мкм поглощение определяется гемоглобином крови. Свет с длинами волн 0.6-1.5мкм относительно слабо поглощается и довольно глубоко проникает в биоткань. Расстояние, на котором световое излучение оказывает биофизическое воздействие на живую ткань, называют **глубиной проникновения излучения**. Глубина проникновения лазерного излучения в биологическую ткань зависит главным образом от трех параметров: длины волны, мощности излучения и оптических свойств биоткани. Глубину проникновения излучения в живых тканях меняют посредством изменения мощности излучения. Вместе с тем, для того, чтобы мощное излучение не повреждало живые ткани приповерхностного слоя, используют не непрерывное, а импульсное излучение. Таким образом, выбором мощности излучения и частоты следования импульсов можно достичь максимальной глубины проникновения излучения при данной длине волны. Например, лазерное излучение с  $\lambda=1,06$  мкм проникает в ткань на глубину 1см. Однако в спектральном диапазоне 2-12мкм из-за поглощения воды, содержащейся в биоткани, свет слабо проникает в глубь ткани. В области длин

волн 4-6 мкм глубина проникновения порядка 100-150 мкм, а в области 7-12 мкм сравнима с длиной волны света. Как видно на рис.5.2, наибольшая глубина проникновения характерна для ИК-излучения в области 0.8-1.7 мкм.

Для достижения терапевтической дозы на глубине до 10-12 см необходимо применять мощные лазерные источники (5-15 Вт). Однако такая мощность, при непрерывном воздействии оказывает повреждающее фототермическое действие на биоткани. Для того чтобы, избежав повреждения, создать терапевтическую дозу в глубине ткани (до 10-12 см), применяют инфракрасное излучение импульсных лазеров. При этом мощность в импульсе составляет от 1 до 20 Вт, а длительность импульса порядка 50-200 нс.

При расчете терапевтической дозы следует учитывать, что не все попавшее в биоткань излучение усваивается последней. Взаимодействие лазерного излучения с биологическим объектом сопровождается следующими оптическими эффектами: отражением (5-60 %), рассеиванием (5-35%), поглощением (20-60%). При этом терапевтическое действие оказывает только поглощенное излучение.

**Рассеяние света.** Следует отметить, что ткани передней части глаза являются в видимой области чрезвычайно прозрачными и поглощение в них очень мало. В то же время, спектр пропускания в области коротких длин волн определяется *светорассеянием*. Рассеяние света биообъектами обусловлено сложной структурой биосистем, которые, как правило, состоят из большого числа случайно распределенных в объеме рассеивающих центров (исключение составляют лишь некоторые типы тканей, например прозрачные ткани глаза, в которых эта структура упорядочена).

Для многих типов биотканей в УФ и ИК-диапазонах длин волн преобладает поглощение, а рассеяние оказывается существенным в видимой и ближней ИК-областях. Для длин волн 0,45 - 0,59 мкм поглощение и рассеяние дают примерно равные вклады в коэффициент пропускания ткани, а для длин волн 0,59 - 1,5 мкм рассеяние превалирует над поглощением.

**Отражение света.** Важной оптической характеристикой биообъекта является также коэффициент отражения. Например, для большинства внутренних органов животных коэффициент отражения на отдельных длинах волн в видимой и ближней ИК-областях составляет 10 - 30 %, кожный покров человека отражает в видимой области 10 - 60 % световой энергии, а коэффициент отражения глазного дна человека изменяется от 2 до 20 % при изменении длины волны от 0.4 до 1,0 мкм. Отражение обусловлено как скачком показателя преломления на границе биообъект - воздух (зеркальное отражение, обычно 4-5%), так и диффузным рассеянием от глубинных слоев ткани.

Следует отметить, что характер отражения, поглощения, рассеяния и флуоресценции биообъекта можно эффективно изменять разнообразными искусственными приемами. Например, окрашиванием можно изменять спектры отражения и поглощения. Такие биообъекты называются *сенсibilизированными*, т. е. их чувствительность к свету изменена. Сенсibilизацию биологического материала широко используют при изучении механизмов взаимодействия света с отдельными

компонентами этого материала, а также в практической биомедицине для диагностики и селективной фотодеструкции отдельных компонентов биообъекта. Для мягких кровенаполненных биологических тканей можно существенно, до 40 раз, увеличить их пропускание за счет несильного сдавливания. «Просветление» живой ткани связано с повышением ее оптической однородности за счет уплотнения рассеивающих центров (коллагеновых волокон мышечной ткани) и вытеснения крови из области надавливания, что способствует повышению показателя преломления базового вещества, который становится сравним с показателем преломления мышечной ткани. Выравнивание показателей преломления светорассеивающих центров и базового вещества можно осуществить и за счет введения в ткань соответствующих препаратов.

### **6.3. Механизмы взаимодействия лазерного излучения с живыми тканями**

Действие лазерного излучения на ту или иную биологическую систему **избирательно**. Например, при облучении смеси эритроцитов и лейкоцитов сине-зеленым светом, излучаемым аргоновым лазером, избирательно разрушаются эритроциты вследствие наличия в них гемоглобина, хорошо поглощающего это излучение. Избирательность действия лазерного излучения используется на практике в биологии и медицине.

Следует заметить, что отсутствие в клетках молекул, интенсивно поглощающих свет определенной длины волны, вовсе не означает, что этот свет совсем не будет поглощаться такими клетками. Любые молекулы, хоть и в очень малой степени, но все-таки могут поглощать свет практически всех длин волн (их спектр поглощения непрерывен). Это означает, что при использовании лазерного, в особенности мощного, источника всегда будет наблюдаться поглощение света биообъектами и связанная с этим соответствующая реакция. Однако за пределами максимумов поглощения все молекулы поглощают свет примерно в равной степени. При этом действие лазерного излучения теряет свою избирательность и носит преимущественно *тепловой характер* (общий нагрев биообъекта).

Механизмы воздействия излучения лазера на биообъекты являются очень сложными, включая как специфические, так и неспецифические стороны. В настоящее время отсутствует возможность создания теории, объясняющей все эффекты, возникающие при таких воздействиях, что связано с трудностями анализа закономерности преобразования лазерной энергии при взаимодействии с биологическими объектами. Поэтому рассмотрим наиболее важные механизмы биологического действия лазерного излучения на живую ткань: специфические фотохимические и биологические реакции, тепловой и ударный эффекты.

**Специфические фотохимические и биохимические реакции.** Молекулы биотканей, поглощая фотоны лазерного излучения, переходят в возбужденное состояние. Излишек энергии, полученной ими при поглощении, может затем расходоваться по нескольким направлениям (люминесценция, переход в тепло и т. д.). Одним из таких направлений является возникновение и протекание фотохимических и биохимических реакций. При этом ослабляются и даже могут полно-

стью разорваться химические связи, нарушается ход специфических биохимических реакций, возникают новые, часто не свойственные организму вещества, которые могут обладать ядовитыми свойствами (внутренние яды, эндотоксины), и т. д., что в конечном итоге может привести к гибели отдельных клеток и поражению ткани в целом. Кроме того, в процессе воздействия лазерного излучения на биоткань вследствие большой интенсивности электрического поля образуются свободные радикалы, обладающие высокой химической активностью. Их появление, а главное, их накопление в больших количествах в тканях организма также может оказать отрицательное воздействие на организм. Наиболее существенными при рассмотрении данного механизма воздействия лазерного излучения на ткань являются два фактора: общее количество поглощаемой энергии и величина энергии поглощаемого кванта.

Первый фактор, обычно оцениваемый с помощью коэффициента поглощения, определяет возможное количество реакций, совершаемых в единицу времени, т. е. скорость процесса. Второй - энергетiku самой фотохимической реакции, т. е. определяет, какая реакция возможна. Следовательно, в зависимости от оптических свойств конкретного организма, наличия у него тех или иных молекул-пигментов и длины волны лазерного излучения возможно протекание различных фотохимических реакций (например, фотоионизация, фотовосстановление, фотоокисление, фотодиссоциация и т. д.).

Образующиеся при фотохимических реакциях вещества вступают в сопряжение с химическими и биохимическими реакциями, изменяя их. При этом высокая монохроматичность излучения лазера открывает возможность направленного его действия с помощью соответствующим образом подобранной длины волны излучения на определенные, заранее выбранные биохимические реакции.

**Тепловой эффект лазерного излучения** приводит к повышению температуры биоткани. Причиной повреждения биотканей при тепловом эффекте является чрезмерное повышение температуры. Измерения показали, что в точке поглощения тканью лазерного луча может наблюдаться повышение температуры, значительно превосходящее 100°C. Следует заметить, что уже при 60°C наступает необратимая денатурация белков.

Биологические ткани состоят из массы сложнейших химических веществ, находящихся в процессе непрерывного взаимодействия - синтеза и параллельно идущего распада. При этом своеобразными ускорителями зачастую даже одновременно протекающих биологических реакций являются биологические катализаторы - ферменты. Именно ферменты являются теми компонентами клеток, которые, будучи наиболее чувствительны к повышению температуры, первыми разрушаются. В результате биохимические реакции, протекающие в клетке, полностью затормаживаются, и клетка гибнет.

Специфические свойства лазерного излучения накладывают определенный отпечаток на характер повреждения тканей вследствие теплового эффекта. Хотя поражение тканей при облучении мощными лазерами обычно сходно с тепловым ожогом, возникающим под влиянием токов высокой частоты (диатермокоагуляция), имеются и отличия. Прежде всего, для лазерного ожога характерна строгая

ограниченность участка резкого повышения температуры - *локализованность действия*. Это объясняется как быстротой нагрева биоткани, так и ее низкой теплопроводностью, в результате чего мгновенно выделяющееся тепло не успевает распространяться за пределы облученного лазером участка.

На характер теплового повреждения биологической ткани лазерным излучением сильно влияют как параметры излучения лазера (энергия и мощность излучения, длина волны, режим работы и т. д.), так и характеристики самой ткани - степень естественной окраски (пигментация), микроскопическая структура, механическая плотность тканей. Эффект носит избирательный характер, т. е. максимальному тепловому разрушению подвергаются биообъекты, содержащие молекулы, хорошо поглощающие излучения данной длины волны. При больших мощностях практически все молекулы разрушаются одинаково.

**Ударный эффект лазерного излучения** характеризуется повышением давления в биологических тканях, подвергнутых облучению. Это повышение давления затем приводит к распространению в окружающих тканях упругих волн. Повреждения, вызываемые упругой волной, могут быть удалены на значительные расстояния от места непосредственного облучения.

Выше были рассмотрены обособленно друг от друга наиболее важные механизмы биологического действия лазерного излучения на живую ткань. Очень часто при облучении биологических объектов бывает трудно отделить один эффект от другого, и поэтому можно говорить об одновременном действии нескольких механизмов. В зависимости от режима работы лазера и создаваемого им излучения в каждом конкретном случае могут выступать на первый план различные эффекты.

Таким образом, в настоящее время установлено, что по действию, производимому на биологические объекты, излучение лазера отличается от излучений других типов. Под его влиянием в биологических тканях развивается сложный комплекс изменений, являющихся результатом взаимодействия лазерного излучения с тканями; он зависит от ряда факторов, важнейшими из которых являются тепловой, ударный и специфические фотохимические реакции. Кроме них, следует учитывать и другие процессы и явления (нелинейно-оптические эффекты, накопление свободных радикалов, действие эндотоксинов и т. д.), которые могут усилить биологическое действие лазерного излучения.

#### **6.4. Лазеры и лазерные системы для диагностики биологических объектов**

Сложность и многообразие биологических объектов, значительное разнообразие в характере их взаимодействия со светом определяют необходимость привлечения широкого круга лазеров, используемых в диагностике. Все эти лазеры перекрывают широкий диапазон длин волн от 0.1 до 30 мкм. Уровни выходной мощности непрерывных лазеров и средней мощности импульсных лазеров составляют от нескольких милливатт до десятков и сотен ватт. Энергия в импульсе изменяется в пределах от нескольких миллиджоулей до нескольких джоулей. Длительности их импульсов также изменяются в широком диапазоне: от нескольких миллисекунд

до единиц фемтосекунд, а ширина спектра излучения лазеров — от нескольких герц до десятков гигагерц. Угловая расходимость - от десятков градусов у полупроводниковых лазеров до долей миллирадиана у газоразрядных. На рис.6.3 показаны уровни мощности и энергии наиболее распространенных и доступных лазеров.

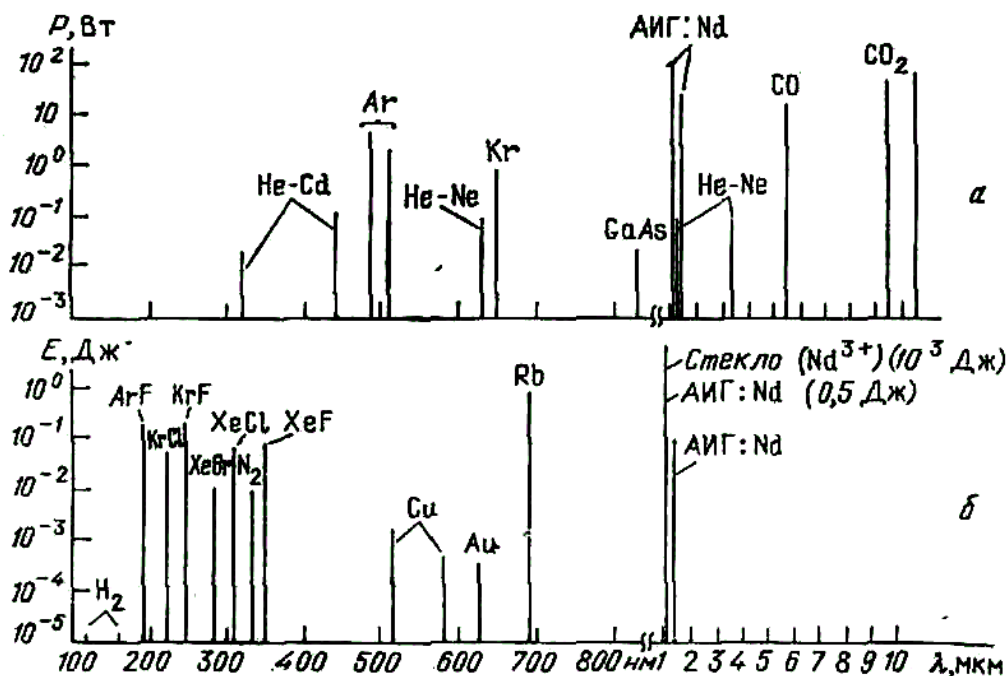


Рис.6.3. Длины волн излучения и уровни выходной мощности непрерывных (а) и энергия в импульсе импульсных (б) лазеров.

### 6.4.1. Газовые лазеры

**Гелий-неоновые лазеры.** Наиболее простыми и доступными среди газовых лазеров, да и среди всех лазеров, являются *гелий-неоновые* (He-Ne) лазеры, работающие на возбужденных атомах неона. Накачка осуществляется с помощью тлеющего разряда. Лазеры могут работать на многих линиях в видимой и ближней ИК области спектра (всего более 130 линий). Наиболее интенсивными являются линии с длинами волн 0.63; 1.15 и 3.39 мкм. Уровень выходной мощности  $P$  изменяется от долей до сотен милливатт на каждой линии. Мощность излучения на 0.63 мкм с единицы длины активного элемента составляет 50 мВт/м.

Применение специальной технологии интерференционных покрытий зеркал открывает возможность создания стабильных и надежных лазеров с достаточной мощностью и широким набором длин волн, удовлетворяющих потребностям многих задач диагностики (например, для длин волн, равных 0.54; 0.59; 0.61; 0.64; 0.73 мкм). Ряд зарубежных фирм уже приступили к выпуску He-Ne лазеров с «новыми» нетрадиционными длинами волн - это «зеленый» лазер (0.54 мкм,  $P=0,5-1$  мВт) и ИК лазер (1.52 мкм). В лабораторных условиях часто, используют широкополосные зеркала, а перестройку осуществляют с помощью дисперсионного элемента внутри резонатора (призмы, дифракционной решетки). Таким образом,

можно получить генерацию на восьми длинах волн вблизи 0.63мкм (0.54 - 0.73мкм), а также на ряде линий вблизи 1.15мкм (1.08 – 1.20мкм).

He-Ne лазеры характеризуются высокой стабильностью параметров излучения и значительным сроком службы (до  $10^4$ ч). Кратковременные флуктуации мощности серийных лазеров и ее долговременные уходы составляют обычно доли и единицы процентов. Лазеры выпускаются двух типов - с внешними и внутренними зеркалами. В первом случае для герметизации активного элемента используются окошки Брюстера и излучение лазера оказывается линейно поляризованным с высокой степенью поляризации (500:1). Во втором - поляризация излучения становится круговой (1:1), при этом удается несколько повысить выходную мощность (примерно в 1,5 раза). Диаметр пучка для лазеров красного излучения обычно составляет 0,5 - 0,8мм для маломощных и около 2мм для более мощных, а угол расходимости излучения  $\theta=1-3$  мрад.

При всех достоинствах He - Ne лазеров они имеют ряд существенных недостатков, к которым можно отнести малый коэффициент полезного действия (КПД), порядка 0,1 %, и низкий уровень выходной мощности.

**Импульсные атомарные лазеры** обладают большим КПД и уровнем средней мощности по сравнению с гелий-неоновыми лазерами. В качестве активной среды используются пары металлов. Наиболее интересными с точки зрения применений являются *лазеры на парах меди и золота*. Эти лазеры генерируют интенсивное излучение в видимом диапазоне длин волн. Наиболее интенсивная - это зеленая линия медного лазера (0.51мкм). Длина волны желтой линии этого лазера равна 0.58мкм. Красное излучение лазера на парах золота имеет длину волны 0.63мкм. Инверсия в этих лазерах создается импульсным газовым разрядом в смеси паров металла и буферного газа (гелия или неона).

Средняя мощность у медных лазеров, выпускаемых промышленностью, составляет 8-40 Вт, частота следования импульсов 2-20 кГц, их длительность 5-50нс, мощность в импульсе достигает 200 кВт. Энергия в импульсе  $2 \cdot 10^{-3}$  Дж. Для лазеров на парах золота при прочих равных условиях средняя мощность в 4-8 раз меньше, примерно во столько же раз меньше энергия в импульсе. КПД медного лазера порядка 1 %,  $\theta= 2$  мрад, диаметр пучка до 15мм.

С точки зрения диагностического применения в биологии и медицине импульсные атомарные лазеры интересны тем, что являются *самыми мощными источниками излучения в видимой области*. Их излучение хорошо пропускается волоконными световодами (до 70 % при диаметре световода 1000 мкм) они обладают узкой линией и имеют малую расходимость.

**Ионные лазеры на инертных газах** (в большей части аргоновые и криптоновые лазеры) используют для возбуждения дуговой разряд. Они являются *самыми мощными лазерами непрерывного действия видимого и ближнего УФ диапазонов длин волн*. Суммарная мощность на многих линиях Ar-лазера вблизи 0.50мкм достигает 10-20 Вт, а в области 0.35мкм – 1-2 Вт. Мощность излучения Kr-лазера вблизи 0.65нм не превышает 1Вт. Основные длины волн излучения Ar- лазера перекрывают диапазон 0.35-0.51мкм (10 линий), Kr- лазера – 0.35-0.80мкм (14 линий). Низкий КПД ионных лазеров, который не превышает 0,1 %, требует исполь-

зования мощных источников питания и эффективного охлаждения активного элемента. Удельная выходная мощность на каждой из основных линий генерации Ar-лазера с  $\lambda=0.49$  и  $0.51$  мкм составляет примерно  $5$  Вт/м при отношении тока разряда к диаметру рабочего капилляра  $25$  А/мм. Диаметр пучка излучения  $1-2$  мм,  $\theta = 0,6$  мрад.

Использование широких капилляров ( $7-10$  мм) позволяет в лабораторных условиях получать непрерывную мощность до  $100$  Вт/м, создавать мощные источники УФ излучения на  $\lambda=0.35$  и  $0.36$  мкм с мощностью до  $10$  Вт.

**Ионные лазеры на парах химических элементов** также являются прекрасными источниками непрерывного излучения в видимой и ближней УФ областях спектра. Поскольку в качестве рабочего вещества могут быть использованы пары многих химических элементов (Cd, Zn, Se, Te и т. д.), то набор длин волн оказывается существенно шире, чем у He - Ne и Ar- лазеров. При этом мощность излучения несколько больше, чем у He - Ne лазеров, и ее уровень вполне удовлетворяет большинству задач биомедицинской диагностики. Лазеры работают при наличии вспомогательного газа, в качестве которого обычно применяют гелий.

Наибольшее распространение получили He-Cd и He-Se лазеры. Обычно возбуждение этих лазеров осуществляется продольным тлеющим разрядом постоянного тока с такими же примерно параметрами, как при возбуждении He -Ne лазера. Принудительное охлаждение не требуется. Излучение He-Cd лазера происходит на синей линии с  $\lambda=0.44$  мкм и УФ линии с  $\lambda=0.33$  мкм, а излучение He -Se лазера - более чем на  $19$  линиях, перекрывающих почти весь видимый диапазон.

Промышленность выпускает разнообразные модификации He-Cd лазеров, постоянно продолжается их модернизация и совершенствование. Этот лазер оценивается как один из наиболее перспективных лазеров для диагностики в биологии и медицине - это и микрофлуориметрия, спектроскопия комбинационного рассеяния, новые цитометрические системы, лазерные микроскопы и пр. Мощность излучения промышленных лазеров на  $\lambda=0.44$  мкм составляет  $8-100$  мВт, на  $\lambda=0.33$  мкм —  $1-20$  мВт, диаметр пучка  $d=0,8-3$  мм,  $\theta=0,4-1,0$  мрад. Срок службы лазеров  $(5-8) \cdot 10^3$  часов.

**Молекулярные лазеры ИК-диапазона**, работающие на колебательно-вращательных переходах молекул  $\text{CO}_2$  и  $\text{CO}$ .  $\text{CO}_2$ -лазер излучает на вращательных линиях молекулярных полос  $9.4$  и  $10.4$  мкм. Он может работать на многих линиях из этих полос. Перестройка линий генерации обычно осуществляется с помощью дифракционной решетки, используемой в качестве одного из зеркал лазера. Наибольшее усиление имеют линии, длина волны которых близка к  $10.6$  мкм, поэтому лазер без дисперсионного элемента работает на этой длине волны. Для возбуждения лазера обычно используется продольный тлеющий разряд постоянного тока в многокомпонентной смеси, как правило, с составом  $\text{CO}_2\text{-N}_2\text{-He-Xe}$ . Выходная мощность промышленных лазеров малой и средней мощности составляет  $5-40$  Вт, диаметр пучка  $5-10$  мм, расходимость  $1-5$  мрад. Этот лазер отличается чрезвычайно высоким КПД ( $10-30$  %).

Перспективными для диагностики представляются малогабаритные волноводные  $\text{CO}_2$  лазеры, которые имеют узкий рабочий капилляр (волновод), повышенное

давление смеси от 100 Торр до атмосферного, что обеспечивает сравнительно высокие уровни мощности с единицы длины, значительную перестройку частоты в пределах одной линии излучения лазера. Выходная мощность волноводных  $\text{CO}_2$  лазеров в непрерывном режиме может достигать 30Вт, типичное значение для компактного лазера - 1-10 Вт. Диаметр пучка около 1мм, однако расходимость оказывается значительной, порядка 10мрад. Использование поперечного высокочастотного возбуждения и высокого давления смеси позволяют реализовать компактный спектрометр с квазиплавной перестройкой длины волны в диапазоне 9.1-11.0 мкм ( $1096-908 \text{ см}^{-1}$ ). Еще более плавную перестройку можно получить при работе на смеси изотопов молекулы  $\text{CO}_2$  (всего их 18).

СО- лазер работает в интервале длин волн 5-6.5 мкм. Он обладает еще большим КПД (50 - 75 %), сравнимыми с  $\text{CO}_2$  лазером уровнями мощности, также может перестраиваться в широком диапазоне длин волн. Рабочая смесь газов содержит гелий, азот, ксенон и кислород. Возможно создание компактных инфракрасных спектрометров на основе перестраиваемых волноводных СО- лазеров с поперечным высокочастотным возбуждением.

Близкие характеристики к  $\text{CO}_2$  и СО лазерам имеют так называемые *химические лазеры*. Их генерация реализуется на колебательно-вращательных переходах двухатомных молекул галогеноводородных соединений. Длины волн лазеров: HF - 2,7 мкм; HCl - 3,7 мкм; HBr - 4,2 мкм; DF - 4,3 мкм. Они могут работать в импульсном и непрерывном режимах генерации, допускают дискретную перестройку длин волн в пределах колебательно-вращательных полос генерации.

**Молекулярные лазеры, работающие на электронно-колебательных переходах** излучают в УФ диапазоне длин волн. Наиболее интересные из них - это лазер на молекулах азота, основная длина волны излучения которого равна 0.34мкм, и водородный лазер с излучением в вакуумном УФ ( $\lambda=0.12$  и  $0.16$  мкм). Эти лазеры могут работать только в импульсном режиме, правда, с довольно большой частотой повторения импульсов  $f$ . Например, для  $\text{N}_2$  лазера  $f=0,05-1$  кГц, что для большинства применений эквивалентно непрерывной генерации. Они имеют не очень высокие значения КПД (0,01-1 %), средняя мощность  $10^{-3}-1$  Вт, длительность импульсов 1-10нс. Промышленность выпускает несколько типов азотных лазеров.

**Эксимерные лазеры.** В качестве рабочего вещества таких лазеров используются так называемые эксимеры — молекулы-димеры, существующие устойчиво только в возбужденном состоянии и мгновенно распадающиеся в основном состоянии, что автоматически и обеспечивает инверсию. Накачка этих лазеров осуществляется быстрым поперечным разрядом, также как и некоторых типов азотных лазеров. Эксимерные лазеры имеют значительный КПД (1-15 %) и могут перестраиваться по длине волны в пределах 2-6нм. Средние длины волн эксимерных лазеров на галогенидах инертных газов: ArF -193нм, KrCl - 222нм, KrF - 248нм, XeBr - 308нм, XeF - 351нм, энергия их импульсов 0,01-0,25Дж, частота следования импульсов 100-150 Гц, длительность импульса 4-20 нс, средняя мощность 5-40 Вт. Пучок излучения этих лазеров представляет собой прямоугольник с размерами 10x25 мм, а расходимость разная по двум координатам и составляет 2x5 мрад.

#### 6.4.2. Жидкостные лазеры на красителях

Активные среды лазеров на красителях представляют собой размещенные в специальных кюветах или прокачиваемые в струе на воздухе растворы органических красителей, инверсия в которых создается за счет внешней оптической накачки с помощью ламп или лазеров. Они обладают значительным КПД преобразования. Плавная перестройка длины волны излучения для одного типа красителя осуществляется с помощью дисперсионных элементов внутри резонатора в пределах нескольких десятков нанометров. Заменой красителей и источников накачки можно осуществить перестройку длин волны во всем спектральном диапазоне от УФ до ближнего ИК.

Наиболее простую конструкцию имеют *импульсные лазеры на красителях с оптической накачкой*. Созданы десятки моделей промышленных образцов таких лазеров. Они перекрывают диапазон длин волн от 0.34 до 0.96 мкм. За счет удвоения и параметрического преобразования частоты диапазон еще более расширяется (0.21-0.38 мкм и 1,0-3,1 мкм). Энергия их излучения простирается от 1 мДж до 50 Дж в периодическом режиме, до 400 Дж в режиме одиночных импульсов, средняя мощность - от 0,06 до 20 Вт. Длительность импульса - от 7 нс до 8 мкс, частота повторения импульсов - от 200 Гц до одиночных импульсов. Максимальный КПД лазеров - от 0,08 до 0,8 %. Ширина линии излучения лежит в пределах 0.4-0,001 нм, а рекордные значения для систем с усилителями достигают  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  нм. Расходимость излучения в зависимости от конструкции резонатора изменяется в пределах от 0,5 до 20 мрад.

Эффективную накачку в импульсном режиме обеспечивают азотный, медный и эксимерные лазеры, а также излучения второй и третьей гармоник, гранатового лазера (532 и 355 нм). Используются как поперечная, так и продольная накачка (вдоль оси резонатора). Эффективность преобразования УФ излучения азотного лазера в видимое излучение лазера на красителях составляет около 10 %. Диапазон перестройки такого лазера 0.35-1 мкм и 0.21-0.30 мкм с удвоением частоты. Частота повторения импульсов 50-100 Гц, длительность импульса 5-10 нс,  $\theta = 10$  мрад. Накачка медным лазером мощностью 4 Вт позволяет с помощью четырех красителей перекрыть диапазон длин волн 0.53 – 0.71 мкм со средней мощностью 6 Вт, обеспечить высокую частоту повторения импульсов (10 кГц) и малую расходимость излучения (3 мрад).

Лазеры на красителях являются уникальными перестраиваемыми источниками когерентного излучения и в *непрерывном режиме*. Для создания инверсии необходима жесткая фокусировка излучения лазера - накачки (до размера пучка 10-30 мкм), поскольку требуется высокая плотность мощности порядка  $1 \text{ МВт/см}^2$ . При этом необходимое охлаждение облучаемого объема красителя происходит за счет быстрой его прокачки (струя в воздухе). В максимуме полосы красителя родами-на-6Ж мощность генерации достигает 3 Вт, для других красителей она не превышает 100-200 мВт. Мощность лазеров накачки обычно 5-7 Вт. При использовании Ar и Kr- лазеров диапазон длин волн лазера на красителях составляет 0.40- 1 мкм. Тонкая перестройка частоты излучения осуществляется в пределах 10-30 ГГц,

ширина линии достигает 10-100 МГц, а при наличии системы стабилизации — менее 100 кГц; диаметр пучка около 5мм, его расходимость 1.5-2 мрад.

### 6.4.3. Твердотельные лазеры

**Рубиновый лазер.** Первым в мире лазером, созданным в 1960г, является *рубиновый лазер*. Этот лазер представляет собой рубиновый стержень ( $\text{Al}_2\text{O}_3:\text{Cr}$ ), накачиваемый обычно излучением спиральной или линейной ксеноновыми импульсными лампами. Лазер излучает в красной области на длине волны 0.69мкм. Изменяя температуру рубинового стержня в пределах 77-500 К, оказывается возможным перестраивать длину волны излучения в пределах примерно  $50\text{см}^{-1}$ . По сравнению с другими твердотельными лазерами рубиновый лазер имеет низкий КПД (0,1%). Длительность импульсов в режиме свободной генерации составляет 1-3 мс, энергия в импульсе 1Дж, частота следования импульсов 1 Гц,  $\theta=1$  мрад,  $d=2-10\text{мм}$ .

**Лазеры на стекле с неодимом** работают на силикатном и фосфатном стеклах. Рабочим веществом являются ионы неодима  $\text{Nd}^{3+}$ . Длина волны излучения лазеров на силикатном стекле 1.06мкм, а на фосфатном – 1.05мкм. Эти лазеры работают в импульсном режиме и характеризуются высокими уровнями энергии в импульсе (до  $10^3$  Дж), малой частотой повторения импульсов 1-2Гц. В режиме свободной генерации  $d=5-10$  мм,  $\theta=5-10$  мрад.

**Лазеры на алюмоиттриевом гранате с неодимом** (АИГ:Nd) находят наиболее широкое применение из всех твердотельных лазеров. В качестве накачки используются обычно криптоновые или ксеноновые дуговые лампы. Наиболее легко возбуждается линия с  $\lambda=1.06\text{мкм}$ , генерация происходит также на линиях с  $\lambda=0.95$ , 1.32 и 1.83мкм, КПД лазеров 2-2,5 %. Создано уже несколько сотен промышленных образцов лазеров на гранате. Их можно разделить на три категории: непрерывные, импульсные с непрерывной накачкой и импульсные с импульсной накачкой.

Непрерывные лазеры работают при очень больших уровнях мощности 65-250 Вт на  $\lambda=1.06\text{мкм}$  и 30 Вт на  $\lambda=1.32\text{мкм}$ ,  $\theta = 10-12$  мрад. Средняя мощность излучения импульсных лазеров с непрерывной накачкой ( $\lambda=1.06\text{мкм}$ ) в многомодовом режиме составляет 20-40 Вт,  $\theta=1,2-2$  мрад. Выпускаются лазеры с  $\lambda=1.32\text{мкм}$ , а также с преобразованием частоты во вторую и четвертую гармоники с длинами волн: 0.53, 0.27, 0.66 мкм. Мощность излучения на  $\lambda=1.32\text{мкм}$  - 4 Вт, на  $\lambda=0.53\text{мкм}$  - 2-4 Вт, на  $\lambda=0.27\text{мкм}$  - 0,5 Вт. В этих лазерах предусмотрена периодическая модуляция добротности резонатора с частотой 5-50кГц. Импульсные гранатовые лазеры с импульсной накачкой характеризуются большой по сравнению с рубиновыми и стеклянными лазерами частотой повторения импульсов 25-300 Гц, длительностью импульсов 8-100 нс, энергией в импульсе 0.05-0,5 Дж,  $\theta=0,05-6$  мрад.

**Эрбиевые лазеры.** Перспективным для биологических применений является АИГ: $\text{Er}^{3+}$  лазер (*эрбиевый*). По своим параметрам он практически не уступает гранатовому лазеру, а длина волны его излучения  $\lambda=2,94$  мкм лежит в полосе нормальных колебаний молекулы воды ( $\lambda_{\text{max}}=2.94$  мкм для «свободной» и

$\lambda_{\max}=3.05$  мкм для «связанной» воды), что и определяет его перспективность для применений в биологии и медицине.

**Волоконные лазеры** представляются весьма перспективными для диагностических целей в биологии и медицине. Типичный медицинский лазер многоцелевого назначения использует оптические волокна с диаметром сердцевины 7-10 мкм (диаметр оболочки 25-30 мкм), изготовленные из различных лазерных материалов, причем для волокон, активированных различными редкоземельными элементами, длину волны излучения можно варьировать в широких пределах от УФ до ИК. Излучатель лазера представляет собой спиралеобразный световод, расположенный вокруг лампы накачки, дистальный конец которого длиной 1-10м выводится в область взаимодействия излучения с биологическим объектом. При активации материала волокна неидеально в моноимпульсном режиме выходная энергия лазера на  $\lambda=1.06$ мкм составляет 0.6-0.7 Дж при длительности импульса 100-120 мкс.

**Полупроводниковые инжекционные лазеры.** Большинство рассмотренных лазеров имеют малый КПД, значительные размеры и довольно сложное устройство. Все это препятствует созданию на их основе компактных средств диагностики. В значительной мере конкуренцию им могут составить инжекционные полупроводниковые лазеры, которые перекрывают диапазон от 0.57 до 46 мкм, имеют высокую эффективность (до 20%), чрезвычайно компактны и просты конструктивно.

Полупроводниковый лазер представляет собой полупроводниковый диод с  $p-n$  переходом, в области которого при пропускании инжекционного тока в прямом направлении создается инверсия населенности. В лазерах наиболее часто используются двойные гетероструктуры, когда в диоде создаются два перехода между различными материалами. Толщина активного слоя у таких лазеров 0.1-0.3мкм, они работают при комнатной температуре. Для расширения спектрального диапазона и снижения пороговой накачки используют разнообразные тройные и четверные соединения. Например,  $GaAs_{1-x}P_x$  лазеры перекрывают диапазон от 0.83 ( $x=0$ ) до 0.64мкм ( $x=0,4$ ). Наименьшая длина волны 0.57мкм получена для соединения  $In_{1-x}Ga_xAs_yP_{1-y}$ . Этот четверной сплав при  $y=2,2x$  для разных значений  $x$  дает лазеры с длинами волн от 0.92 до 1.5 мкм.

Для ИК- спектроскопии важным классом полупроводниковых лазеров являются лазеры на основе соединений свинца  $PbSi_{1-x}Se_x$ ,  $Pb_{1-x}Sn_xTe$  и  $Pb_{1-x}Sn_xSe$  и аналогичных, для которых получена генерация в диапазоне 2.5-46.2 мкм. При заданной концентрации компонентов активной среды перестройка длины волны осуществляется изменением тока через диод, приложением внешнего магнитного поля или давления. Главным недостатком лазеров на соединениях свинца является необходимость их достаточно глубокого охлаждения (20-40К) при работе в непрерывном режиме, поэтому в промышленных ИК спектрометрах наряду с непрерывными используются импульсные диоды, для охлаждения которых можно применять простую технику - термоэлектрические холодильники.

Если первые инжекционные лазеры имели сравнительно небольшую мощность (3-5 мВт), то в настоящее время созданы лазеры, которые в одной моде могут давать непрерывное излучение мощностью до 50мВт. Созданы *сфазированные структуры*

ры, состоящие из десяти или более лазеров, генерирующие излучение мощностью до 2.5Вт. Конечно, главным недостатком полупроводниковых лазеров является чрезвычайно малый размер пучка на выходе (0.5-1.0 мкм), что влечет за собой по сравнению с другими лазерами значительную расходимость излучения (20-40° в плоскости, перпендикулярной плоскости активного слоя, и 5-10° в плоскости этого слоя).

Однако разнообразные технологические приемы позволяют уменьшить расходимость. Именно, применение фазированных диодных структур способствует увеличению размеров пучка и снижению расходимости. Например, излучение структуры из десяти лазерных диодов ( $\lambda=0.77\mu\text{м}$ , мощностью 90 мВт) удается сфокусировать в пятно диаметром 2.5 мкм, что уже дает возможность эффективно использовать одномодовые световоды для передачи этого излучения и обеспечить диагностику биологических микрообъектов.

#### 6.4.4. Перестраиваемые лазерные источники света

Успех применения методов лазерной спектроскопии и диагностики, в том числе и в медико-биологических задачах, во многом определяется существованием простого и надежного источника лазерного излучения, перестраиваемого в нужном диапазоне длин волн. Кроме представленных выше перестраиваемых лазеров существуют и другие способы получения перестраиваемого когерентного излучения. Рассмотрим наиболее важные из них.

Лазерные системы, использующие разнообразные методы нелинейного оптического смешения, к которым также относятся *генераторы второй гармоники, генераторы суммарных и разностных частот, параметрические генераторы*. Эти системы перекрывают весь диапазон от вакуумного УФ-излучения до далекого ИК-излучения и имеют вполне удовлетворительную для целей диагностики интенсивность когерентного излучения.

Для генерации второй гармоники обычно используют кристаллы  $\text{LiNbO}_3$  (длина волны накачки  $\lambda_n=1.06\mu\text{м}$ ) и KDP ( $\lambda_n = 0.50 - 0.60\mu\text{м}$ ). Эффективность преобразования обычно не превышает 10-50 %. Таким образом можно преобразовать не только лазерное излучение с фиксированной частотой, но и перестраиваемое, однако для этого необходимо обеспечить синхронную угловую или температурную перестройку нелинейного кристалла для обеспечения фазового синхронизма взаимодействующих волн. При использовании лазеров на красителях с удвоением частоты удается перекрыть диапазон от 0.21 до 0.45 мкм.

Нелинейное смешение излучения двух лазеров видимого диапазона, один из которых перестраиваемый, позволяет генерировать разностные частоты в ИК области спектра и на этой основе создавать спектрометры разностной частоты. Например, с помощью Ar-лазера и лазера на красителях, излучения которых смешиваются в кристалле  $\text{LiNbO}_3$ , удается получить перестраиваемое когерентное излучение в диапазоне 2.2-4.2 мкм.

Важное место среди устройств нелинейной оптики занимает параметрический генератор света (ПГС), который представляет собой нелинейный кристалл, расположенный внутри оптического резонатора и накачиваемый излучением внешнего

лазера, работающего на фиксированной частоте. Перестройка ПГС осуществляется или вращением кристалла, или изменением его температуры. При накачке кристалла  $\text{LiNbO}_3$  излучением второй гармоники гранатового лазера удается получить параметрическую генерацию в диапазоне 0.55 - 4 мкм. При этом поворот кристалла на  $4^\circ$  изменяет его длину волны от 1.4 до 4.0 мкм.

## 7. Лазерные методы диагностики

### 7.1. Лазерные методы, основанные на упругом рассеивании света

#### 7.1.1. Лазерная нефелометрия

Рассеяние, наряду с поглощением, является основным процессом, определяющим распространение света в газообразных, жидких и твердых телах, в том числе и в биологических объектах. Методы упругого рассеяния обычно используют для исследования бактерий, форменных элементов крови, тканей глаза и т. д. Эти биообъекты характеризуются разнообразием форм (сферы, цилиндры, диски, эллипсоиды и пр.) и размеров (0.1-100 мкм). Поскольку исследуемые частицы соизмеримы или значительно превышают длину световой волны, то световое излучение, взаимодействуя с такими частицами, испытывает рассеивание Ми. Известно, что индикатриса рассеивания Ми, в отличие от рассеивания Релея на малых частицах, асимметрична (растянута в сторону направления излучения). Кроме того, при размерах частиц, превышающих длину волны, индикатриса рассеивания содержит ряд характерных максимумов.

Измерение индикатрисы рассеяния заключается в освещении объекта пучком света и регистрации интенсивности рассеянного веществом света под различными углами. Поэтому основой *нефелометра – прибора для измерения интенсивности рассеянного света* – является источник света с малой угловой расходимостью и приемник излучения с определенным углом зрения. Благодаря значительной направленности и высокой интенсивности лазерных пучков лазеры оказываются наиболее подходящими источниками света в этом случае.

В настоящее время лазерная нефелометрия является одним из наиболее распространенных методов оптического исследования биологических объектов. В зависимости от размеров рассеивающих частиц используют различные методы исследования:

- *Метод асимметрии индикатрис* применяют для определения размеров частиц в диапазоне 0,02-0,2 мкм, заключающийся в регистрации отклонения индикатрисы рассеяния от ее симметричной формы в случае рассеяния Релея;
- *метод полной индикатрисы* применяется для измерения размеров частиц в диапазоне 0,1-10 мкм;
- *метод исследования рассеяния света на малые углы* применяют для измере-

ния размеров и распределения частиц по размерам в интервале 1-300 мкм.

При «рутинных» измерениях обычно используют приборы с фиксированным углом, чаще всего выбирают углы, равные 45 или 90°. Для расширения возможностей нефелометра, особенно в научных исследованиях с малоизученными объектами, используют, как правило, приборы с переменным углом регистрации рассеянного света.

Лазерная нефелометрия нашла широкое применение для определения геометрических параметров отдельных компонентов крови. В частности, сильная зависимость индикатрис рассеяния от размеров эритроцитов, выявленная в диапазонах углов 0,5-35°, позволяет получить функцию их распределения по размерам. В то же время неровности поверхности («городчатость») патологических эритроцитов с высокой точностью определяются по значительному возрастанию интенсивности рассеяния лазерного излучения в углах, больших 90°.

Упругое рассеяние лазерного излучения используется как метод исследования деформируемости эритроцитов. Этот метод, получивший название *экмацитометрии*, используется для диагностики ряда заболеваний. При экмацитометрии лазерный луч пропускают через суспензию эритроцитов, помещенных между вращающимися прозрачными цилиндрами, и наблюдают на экране дифракционную картину, вид которой зависит от формы эритроцитов. При этом недеформированные эритроциты дают картину рассеяния в виде концентрических окружностей, деформированные - в виде эллипсов. Если в образцах содержится достаточное количество недеформированных эритроцитов, то наблюдается наложение этих картин, и для оценки концентрации используется так называемый индекс недеформированных эритроцитов, представляющий собой отношение числа деформированных к числу недеформированных эритроцитов.

Лазерная нефелометрия широко применяется в иммунологии, где она используется для количественной оценки реакции антиген-антитело и определения концентрации участвующих в реакции компонентов. В частности, изучено влияние различных факторов (температура, pH среды, концентрация и др.) на скорость протекания реакции и образования комплексов антиген-антитело. Проведенное сравнение метода обнаружения реакции антиген - антитело (система глобулин человека - кроличья сыворотка против глобулина человека) показало выигрыш в чувствительности не менее 10 раз по сравнению с традиционными методиками при наличии феномена, отсутствие последнего позволило получить выигрыш во времени до 24 часов. Метод лазерной нефелометрии белков крови и мочи является также более чувствительным методом (в 4-8 раз), чем традиционные методы.

Следует отметить, что использование в нефелометрах лазеров позволило упростить оптические устройства, уменьшить необходимое количество исследуемого образца, повысить чувствительность.

Следует отметить, что помимо индикатрисы, важнейшей характеристикой рассеянного света является его поляризация. Известно, что при освещении системы частиц неполяризованным светом рассеянный свет оказывается частично поляризованным. Поляризационные характеристики рассеянного излучения зависят от размеров и формы частиц. Это положено в основу работы *поляризационных ла-*

### 7.1.2. Проточные анализаторы микрочастиц

В лабораторно–диагностической практике при работе с биологическими жидкостями, содержащими частицы неорганического или органического происхождения, исследователей обычно в первую очередь интересуют концентрация, состав и размеры частиц. Эти вопросы, как правило, возникают при анализе крови, осадков мочи и т. п. К медицинскому анализатору микрочастиц предъявляются специфические требования, основные из которых - малый объем пробы, высокие концентрации и полидисперсность размеров анализируемых частиц. В настоящее время выпускается значительное число приборов для определения концентрации микрочастиц в жидкостях. Для биологических исследований используется чаще всего малоугловой способ регистрации излучения.

В качестве примера рассмотрим лазерный анализаторов микрочастиц типа-АМПЛ (анализатор микрочастиц проточный лазерный), основанный на методе определения размеров микрочастиц по интенсивности малоуглового светорассеяния. Прибор предназначен для определения концентрации микрочастиц в суспензиях, а также построения и анализа гистограмм распределения микрочастиц по размерам при помощи микро-ЭВМ.

Функциональная схема прибора приведена на рис.7.1, где изображены устройства ввода буферной жидкости (БЖ), ввода пробы (П), оптико-электронного блока (ОЭ) и системы электронной обработки информации (ЭО). Исследуемый препарат подается из шприца 13 устройства П вместе с буферной жидкостью из емкости 1 устройства БЖ в проточную камеру 2 с плоскими окнами блока ОЭ. Луч He-Ne лазера ( $\lambda=632,8$  нм) 9 фокусируется линзой 10 в измерительный счетный объем 11 диаметром 100 мкм, через который последовательно пролетают частицы, генерируя импульсы светорассеяния. Прямое не рассеянное излучение подавляется фильтром-ножом Фуко 12. Сигнал с фотоприемника 5 поступает на многоканальный анализатор амплитуды импульсов 7 и далее на микро-ЭВМ 8 системы электронной обработки информации ЭО. Управление режимом анализа пробы осуществляется с помощью блока сопряжения 6, сигнал с которого управляет двигателем привода 3 дозатора 13 с помощью специальной электронной схемы 4 блока П. Объем анализируемой пробы составляет 20-500 мм<sup>3</sup> при расходе буферной жидкости 1 см<sup>3</sup>/с.

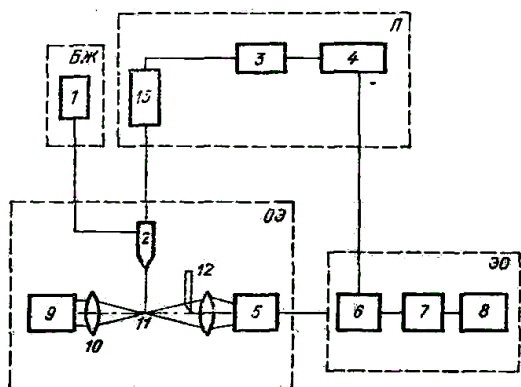


Рис.7.1. Блок-схема анализатора АМПЛ-1.

Диапазон размеров измеряемых частиц от

0,5 до 100 мкм, максимальная скорость счета - 10с.

## 7.2 Лазерная спектроскопия квазиупругого рассеяния

В этой главе рассмотрены возможности использования лазерного светорассеяния для изучения динамических характеристик биологических микрообъектов: коэффициентов диффузии, скоростей направленного транспорта и миграционного движения, параметров внутримолекулярной и внутриклеточной подвижности. По этим измеряемым характеристикам можно рассчитывать размеры, массу и ряд других характеристик рассеивателей. Это область так называемого квазиупругого рассеяния света, обусловленного эффектом Доплера.

### 7.2.1. Измерение скоростей потоков жидкостей и газов при помощи лазерных доплеровских анемометров

При взаимодействии светового излучения с движущимися частицами, находящимися в потоках газов или жидкостей происходит изменение частоты рассеянного света, которое определяют как квазиупругое рассеивание света. Причиной изменения частоты рассеянного света в данном случае является эффект Доплера. При этом в простейшем случае, когда частицы движутся в одном направлении с постоянной скоростью частота света, излучаемого движущимся источником:

$$\omega = \omega_0 \left(1 \pm \frac{v}{c} \cos \varphi\right), \quad (7.1)$$

где:  $\varphi$  - угол рассеяния света,  $v$  - скорость движения частицы,  $c$  - скорость света в вакууме.  $\omega_0$  - частота падающего света.

Все множество доплеровских сдвигов частоты  $\omega_D = \omega - \omega_0$ , содержащихся в рассеянном свете, называется *доплеровским спектром*. Обращает на себя внимание линейная зависимость доплеровских сдвигов частоты от скоростей движения  $v$  рассеивающих частиц. Это позволяет использовать оптический эффект Доплера для определения скорости движения рассеивающих частиц.

Для измерения скоростей потоков жидкостей и газов используют приборы, называемые лазерными доплеровскими анемометрами (ЛДА). Принцип работы этих приборов основан на регистрации сдвигов частоты излучения ( $\omega_D$ ), рассеянного движущимися частичками.

В качестве одного из примеров, взятых из большого разнообразия схем ЛДА, разработанных к настоящему времени, рассмотрим изображенную на рис.7.2 так называемую *дифференциальную схему*, применяющуюся в биомедицинской диагностике. В этой схеме область измерения (измерительный объем) формируется пересечением двух зондирующих пучков одинаковой интенсивности и элементами приемной системы, включающей в себя в простейшем случае линзу и две диафрагмы. Выходной сигнал фотоприемника образуется в результате оптического смешения на его фотокатоде двух полей. В данном случае смешиваются поля,

рассеянные от обоих зондирующих пучков. Особенностью дифференциальной схемы ЛДА является то, что согласование волновых фронтов двух рассеянных волн достигается автоматически в широком телесном угле.

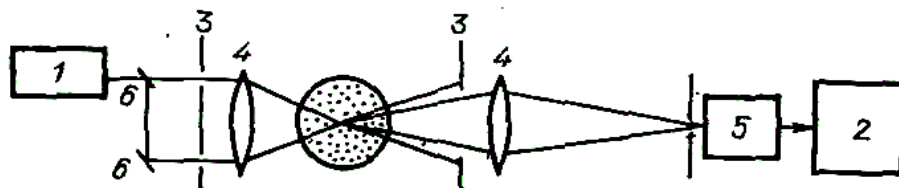


Рис.7.2. Схема дифференциального ЛДА.

Благодаря большой приемной апертуре дифференциальных ЛДА, они часто используются при измерениях в слабо рассеивающих средах. Визуализация измерительного объема в области пересечения зондирующих пучков также дает дополнительные удобства.

На практике обработка выходного электрического сигнала спектрометра выполняется аналоговыми или цифровыми методами. Рассмотрим требования, предъявляемые к основному элементу всех спектрометров - лазеру. Именно благодаря монохроматичности, когерентности и высокой направленности лазерного излучения стало возможным эффективно осуществлять оптическую анемометрию. В абсолютном большинстве случаев в приборах, предназначенных для исследования биологических объектов, используются непрерывные одномодовые He-Ne лазеры. Мощности серийно выпускаемых He-Ne лазеров (1- 50 мВт) вполне хватает для получения достаточной для регистрации интенсивности рассеянного света.

Основная проблема выбора мощности зондирующего пучка состоит в том, чтобы не внести возмущений в исследуемый объект. Особенно это касается живых объектов - клеток, а также других объектов, сильно поглощающих свет. Использование многомодовых лазеров может привести к погрешностям в измерениях в связи тем, что расстояние по частоте между соседними поперечными модами может быть сравнимо с характерными изменениями в спектрах, имеющими место при рассеянии на биологических объектах.

Если говорить о выборе длины волны, то здесь важно, что чем она меньше, тем сильнее рассеивается свет. Кроме того, диффузионное уширение спектров обратно пропорционально квадрату длины волны. Следовательно, чем меньше  $\lambda$ , тем шире спектр и тем мягче требования к системе обработки сигнала. Поэтому в ряде случаев используются непрерывные аргоновые лазеры, генерирующие в синезеленой области длин волн. При выборе длины волны, конечно, следует учитывать спектр поглощения исследуемого объекта. На практике He-Ne лазеры оказываются предпочтительней в силу меньшей стоимости, большей компактности и стабильности излучения.

## 7.2.2. Диагностика биологических объектов на основе регистрации скоростей направленного движения

**Измерения подвижности заряженных светорассеивающих частиц в электрическом поле.** Одним из ярких примеров применения спектроскопии квазиупругого рассеяния в биологии и медицине является *электрофоретическое светорассеяние (ЭФС)*, используемое для измерения подвижности заряженных светорассеивающих частиц в электрическом поле. В однолучевой или двухлучевой ЛДА, снабженный низкочастотной системой обработки сигнала, вставляется электрофоретическая кювета с гомогенным раствором или суспензией исследуемых частиц. Простейший тип кюветы представляет собой спектрофотометрическую ячейку, в которую вводятся близко расположенные электроды (чаще всего платиновые или палладиевые). При наложении разности потенциалов в растворе возникает направленное движение частиц со скоростью  $v = \mu E$ ,

где  $\mu$ -электрофоретическая подвижность (ЭФП). Соответствующий доплеровский сдвиг частоты пропорционален подвижности.

Следовательно, зная напряженность поля в кювете и измерив доплеровский сдвиг частоты, можно прямо определить ЭФП и из нее - поверхностный потенциал частиц. Наглядную информацию об ЭФС несут доплеровские спектры.

**Измерения скоростных характеристик потоков крови.** Другим направлением работ, связанных с регистрацией направленного движения частиц, является *измерение скоростных характеристик, потоков крови*: средней интенсивности кровотока, распределения скоростей по сечению сосуда, интенсивности турбулентных пульсаций и пр.

Первые измерения скорости кровотока с помощью ЛДА были проведены в начале 70-х годов на артериях сетчатки глаза кролика. Экспериментальная установка позволила оценить скорость кровотока, которая оказалась порядка 1,1-1,8 см/с, что находится в хорошем соответствии с результатами, полученными традиционными (ультразвуковыми) методами. Однако необходимость сравнительно большого уровня мощности лазерного излучения (около 10 мВт) при длительности измерений около 2 мин, а также анестезирование и расширение зрачка не позволили сразу использовать этот метод в клинической практике и потребовали его значительной модернизации.

Для получения значений скоростей кровотока и упрощения юстировки системы стали использовать схемы с опорным пучком. Конструктивно все элементы оптической схемы располагают в модернизированной фундус-камере, что позволяет проводить независимые измерения скорости кровотока с использованием обычной флуоресцентной ангиографии при экспериментальных исследованиях. Подобным системам присущ общий недостаток: смещение кровеносного сосуда от точки фокусировки во время измерений. Поэтому обычно стараются или сократить время измерения до 0,5 с и менее, или использовать специальные компенсационные схемы, позволяющие в автоматическом режиме следить за положением лучей на кровеносном сосуде с их последующей корректировкой.

В офтальмологии ЛДА может с успехом использоваться для изучения относи-

тельной закупорки вен и артериальной недостаточности при заболеваниях сосудов сетчатки и для других диагностических целей.

### **7.2.3. Лазерная доплеровская спектроскопия живых клеток и диагностика внутриклеточной подвижности**

К настоящему времени выполнено большое число исследований по разработке методов и практической регистрации *подвижности живых клеток в суспензиях*: бактерий, сперматозоидов животных и человека, водорослей и др. Эта подвижность имеет характер не тепловой диффузии, а случайных блужданий с элементами прямолинейного, вращательного и спирального движений. Каждое из этих видов движений вносит свою лепту в доплеровское уширение спектров. Поэтому точное описание светорассеяния выливается в сложные многопараметрические математические модели. Тем не менее, разработанные процедуры позволяют получать из экспериментально измеренных спектров распределения скоростей, относительное число подвижных и неподвижных клеток и ряд других параметров.

Первое использование метода ЛДА для решения задач регистрации *направленной внутриклеточной подвижности* в крупных растительных клетках относится к 1974 г. Были получены четкие доплеровские спектры, характеризующие распределение скоростей стационарного движения светорассеивающих частиц, составляющих протоплазму этих клеток (ядер, митохондрий и др.). В последующей серии работ была продемонстрирована высокая эффективность ЛДС как регулярно метода решения задач биофизики подвижности, позволяющего осуществлять регистрацию нестационарных откликов клетки на внешнее воздействие, что важно при изучении *механизмов пространственно-временной организации клеточной подвижности*, ее регуляции и пр.

Особенностью лазерного зондирования одиночных неподвижных живых клеток является то, что свет рассеивается не только движущимися внутриклеточными органоидами, но также и неподвижными клеточными стенками. В первом случае в рассеянном свете появляются доплеровские сдвиги частоты, в то время как во втором частота рассеянного света не изменяется. Этот второй компонент рассеянного света неизбежно попадает на фотоприемник, что позволяет использовать этот компонент в качестве опорного излучения для переноса доплеровских сдвигов частоты в низкочастотную область путем *гетеродинамирования*. Таким образом, однолучевой схемой зондирования можно в принципе обеспечить гетеродинный режим измерения скоростей движения внутриклеточных частиц.

На рис.7.3 изображена схема измерительно-вычислительного комплекса, созданного для изучения внутриклеточной подвижности. Излучение He-Ne лазера типа ЛГ-38, ослабленное набором фильтров (2), фокусируется линзой (3) на клетку (4), закрепленную в кювете (5) в специальных держателях (6). Рассеянный свет поступает через систему линз и диафрагм (7) на ФЭУ (8), работающий в токовом режиме. Сигнал после усиления и фильтрации в НЧ усилителе (9) поступает параллельно на осциллограф (10) для визуального контроля, на анализатор спектра

реального времени типа СК.4-72 (11), имеющий кроме электронно-лучевого индикатора цифровой выход, и на аналого-цифровой преобразователь (АЦП) (12), преобразующий аналоговый сигнал в дискретные выборки с программно устанавливаемой частотой дискретизации и длительностью. Эти выборки поступают на ЭВМ (13) для спектральной обработки, которая выполняется по ходу или после записи выборки в память.

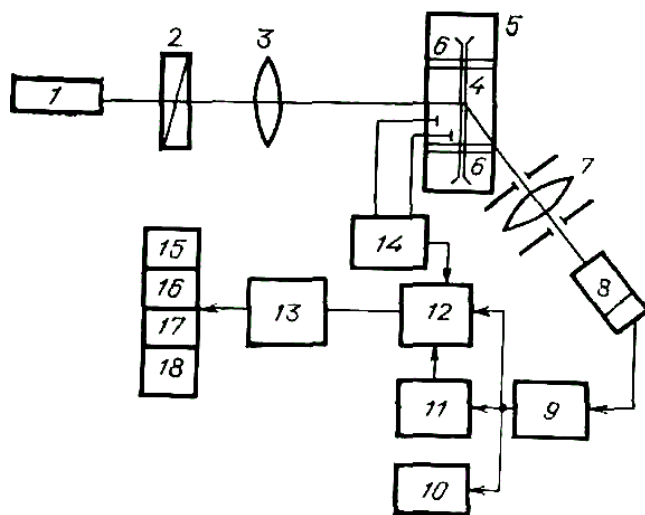


Рис.7.3. Блок-схема измерительно-вычислительного комплекса на базе однолучевого ЛДС

Все приведенные ниже результаты получены путем обработки сигнала на ЭВМ. На эту же машину могут подаваться оцифрованные спектры с выхода анализатора и выходные сигналы других датчиков (например, измерителей температуры, мембранного потенциала или др.) (14). ЭВМ снабжена внешними устройствами: алфавитно-цифровым (15) и графическим (16) дисплеями, графопостроителем (17) и печатью (18). Составной частью комплекса является пакет программ для сбора и обработки данных, а также для управления экспериментом.

На рис.7.4. в качестве примера приведен доплеровский спектр, полученный от живой клетки.

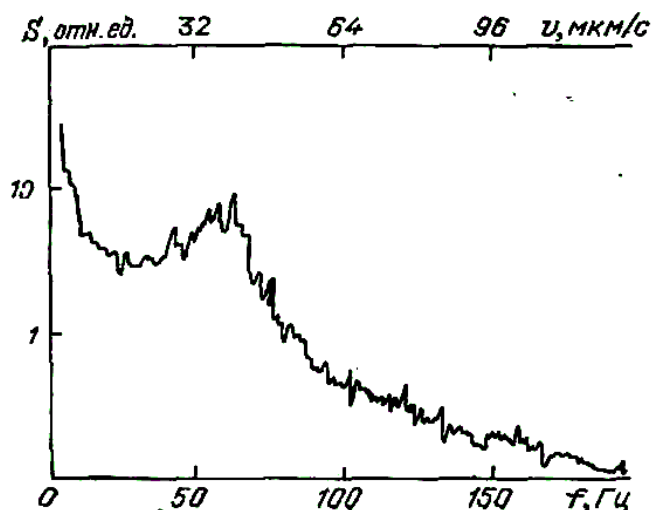


Рис. 7.4. Доплеровский спектр, полученный от живой клетки даровой водоросли со стационарным течением протоплазмы;  $\varphi=45^\circ$ ,  $T=20^\circ\text{C}$

**Лазерная доплеровская микроскопия.** В приведенных выше примерах применявшийся для измерений спектрометр обеспечивал локальность зондирования около 100 мкм, что было достаточно в связи со сравнительно большими размера-

ми исследованных объектов. При работе с маленькими клетками необходимо более высокое пространственное разрешение — порядка нескольких микрометров. Этого удастся достичь в так называемых *лазерных доплеровских микроскопах (ЛДМ)* благодаря использованию короткофокусной оптики и специальной геометрии расположения элементов. В большинстве случаев ЛДМ выполняют на базе серийных оптических микроскопов, что делает их компактными, легко настраиваемыми приборами.

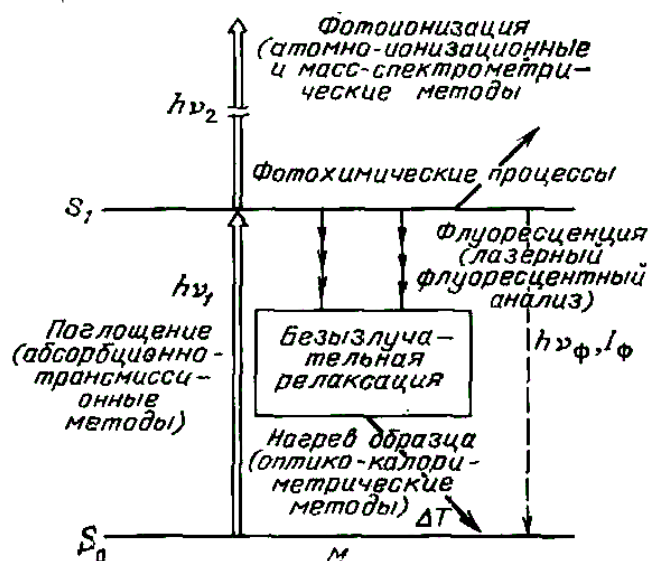
С помощью лазерных доплеровских микроскопов получен целый ряд уникальных результатов. В частности, зарегистрировано направленное движение частиц внутри одиночных соматических клеток, проведено прямое наблюдение накопления  $\delta$ -кристаллина в хрусталиках эмбриона цыпленка. На фоне интенсивного направленного течения протоплазмы в клетках водоросли обнаружена анизотропия коэффициента трансляционной диффузии частиц по разным направлениям внутри клетки.

Эти и целый ряд других результатов показывают, что ЛДС и ЛДМ уже стали эффективным средством, способным решать широкий круг задач клеточной биофизики.

### 7.3 Абсорбционные методы диагностики

#### 7.3.1. Классификация абсорбционных методов диагностики

При решении целого ряда диагностических задач в биологии и медицине хорошо себя зарекомендовали абсорбционные методы, которые обычно применяются в лазерной аналитической спектроскопии или спектроскопии ультрабыстрых процессов. Эти методы относятся к методам микродиагностики, поскольку в них используется информация об атомной и молекулярной структуре исследуемого вещества биообъекта. Схематическое представление некоторых методов микро-



диагностики дано на рис.7.5.

**Рис.7.5.** Схематическое представление ряда методов микродиагностики.

Абсорбционно-трансмиссионные методы диагностики строятся на поглощении квантов света энергией  $h\nu_1$ , вызывающем оптические переходы между основным  $S_0$  и возбужденными  $S_1$  состояниями атомов и молекул. Атомно-ионизационные и масс-спектрометрические методы диагностики основываются на процессах поглощения квантов света энергией  $h\nu_2$ , приводящих к ионизации атомов вещества.

Переход из возбужденного  $S_1$  в основное  $S_0$  состояние может происходить как излучательно, так и безызлучательно. В случае излучательного перехода имеет место флуоресценция, а соответствующий диагностический метод исследования носит название *лазерный флуоресцентный анализ*. При безызлучательных переходах высвобождаемая энергия идет на нагревание образца. На этом строится *оптико-калориметрический метод диагностики*. Высвобождаемая при переходе из возбужденного в основное состояние энергия может быть расходована на протекание фотохимических процессов, результат которых имеет диагностическую ценность.

К *абсорбционным методам* относятся как абсорбционно-трансмиссионные, основанные на измерении интенсивности падающего  $I_0$  и прошедшего  $I$  света разных длин волн, так и методы, основанные на регистрации поглощенной энергии путем измерения температуры  $\Delta T$  нагрева биообъекта (*оптико-калориметрические методы*) или интенсивности  $I_f$  его флуоресценции (*лазерный флуоресцентный анализ*).

Поскольку лазерный флуоресцентный анализ в применении к биологии получил весьма широкое распространение и имеет самостоятельное значение, он рассматривается отдельно, а здесь будут обсуждены возможности абсорбционно-трансмиссионных методов, а также перспективы применения оптико-калориметрических методов. Классификация абсорбционных методов диагностики и некоторые их модификации даны на рис.7.6.



2. Классификация абсорбционных методов диагностики и некоторые их модификации

Рис.7.6.Классификация абсорбционных методов диагностики.

### 7.3.2. Абсорбционно-трансмиссионный анализ с использованием перестраиваемых лазеров

**Трансмиссионный метод.** Измерение спектра пропускания основано на регистрации интенсивности падающего ( $I_0$ ) и интенсивности прошедшего в поглощающей среде путь  $l$  света ( $I$ ) в зависимости от длины волны  $\lambda$ . Согласно закону Бугера:

$$I(\lambda, l) = I_0(\lambda) \exp[-\alpha(\lambda)l], \quad (7.1)$$

где  $\alpha(\lambda)$  - коэффициент поглощения,  $l$  - длина образца.

С другой стороны, коэффициент поглощения может быть представлен в виде

$$\alpha(\lambda) = \sigma(\lambda)N \quad (7.2)$$

$\sigma(\lambda)$  - эффективное сечение поглощающих частиц ( $\text{см}^2$ );  $N$  - их концентрация ( $\text{см}^{-3}$ ). Предполагается, что *интенсивность падающего света очень мала*. Для небольших коэффициентов поглощения, когда  $\exp[-\alpha(\lambda)l] \cong 1 - \alpha l$ , из уравнения (7.1) получим

$$\alpha(\lambda) \cong [I_0(\lambda) - I(\lambda, z)] / I_0(\lambda)l = \Delta I(\lambda, z) / I_0(\lambda)l. \quad (7.3)$$

Пороговая чувствительность абсорбционного метода определяется способностью регистрирующей аппаратуры определять наименьшее значение отношения  $\Delta I_{\min} / I_0$ . Чувствительность метода может быть охарактеризована по-разному. Пороговая чувствительность по оптическому поглощению

$$\Delta I_{\min} / I_0 = (\alpha l)_{\min} \quad (7.4)$$

или по коэффициенту поглощения

$$\alpha_{\min} = (1/l) \Delta I_{\min} / I_0. \quad (7.5)$$

Обычно система регистрации с использованием лазеров обеспечивает значение  $\Delta I_{\min} / I_0 = 10^{-5}$ .

Из уравнений (7.1) и (7.2) получим соотношение для минимальной концентрации молекул, которые могут проявить себя в процессах поглощения света:

$$N_{\min} = (1/\sigma l) \Delta I_{\min} / I, \quad (7.6)$$

а также минимально обнаруживаемая концентрация примесных молекул

$$C_{\min} = (1/\sigma l N_0) \Delta I_{\min} / I, \quad (7.7)$$

где  $N_0$  - концентрация молекул растворителя.

При  $\sigma = 10^{-17} \text{ см}^2$ ,  $l = 10 \text{ см}$ ,  $N_0 = 10^{18} \text{ см}^{-3}$  и  $\Delta I_{\min} / I = 10^{-5}$  имеем  $N_{\min} = 10^{11} \text{ см}^{-3}$ ;  $\alpha_{\min} = 10^{-6} \text{ см}^{-1}$ ;  $C_{\min} = 10^{-7}$  (100 ppb). Это характеристика следовых количеств одного вещества в другом: ppm ( $\text{млн}^{-1}$ , частей на миллион, мкг/г); ppb ( $\text{млрд}^{-1}$ , частей на миллиард, нг/г); ppt ( $\text{трлн}^{-1}$ , частей на триллион, пг/г).

В нелазерных спектрофотометрах используются широкополосные источники света, а перестройку по длинам волн осуществляют с помощью призм или дифракционных решеток. Для узких линий поглощения чувствительность зависит не только от способности прибора зарегистрировать малые изменения  $\Delta I$  на фоне

значительного прошедшего сигнала, но и от разрешающей способности прибора. Обычно предельная чувствительность достигается при  $\Delta I/I > 10^{-4}$ .

Использование лазеров позволяет:

- существенно повысить спектральную разрешающую способность метода, определить форму и структуру линий поглощения молекул;
- для узких линий поглощения несколько повысить чувствительность;
- в некоторых случаях упростить и удешевить экспериментальную установку, поскольку монохроматор (обычно составляющий наиболее объемную и дорогую часть установки) при наличии лазера оказывается ненужным;
- за счет высокой спектральной плотности излучения лазеров снизить влияние шумов фотоприемного устройства;
- за счет высокой направленности и пространственной когерентности лазерного излучения осуществить дистанционные и трассовые измерения поглощения. В случае измерения слабых поглощений в газах и жидкостях можно применять *многоходовые кюветы*, насчитывающие до 30–100 проходов, а также полые стеклянные и кварцевые оптические волокна длиной до 150 м.

Преимущества лазерных источников света особенно проявляются в ИК области спектра при исследованиях отдельных вращательных линий колебательных полос, которые обычными спектральными приборами не разрешаются.

Применения многоходовых кювет, модуляционных и дифференциальных методик измерения полезного сигнала, позволяют существенно повысить чувствительность метода. Если амплитудная модуляция интенсивности зондирующего излучения и модуляция поглощения могут быть реализованы для любых источников света, то многократное прохождение среды (до 100 раз) и частотную модуляцию зондирующего излучения можно получить только при использовании лазеров. Таким образом, была реализована рекордная для ИК спектрометров на инжекционных лазерах пороговая чувствительность  $\alpha_{\min} = 3 \cdot 10^{-10} \text{ см}^{-1}$ . Для лазерных спектрометров из-за высокой когерентности света сильным мешающим фактором являются интерференционные эффекты в оптической схеме устройства. Этим в основном и определяются достигнутые значения  $\alpha_{\min}$ .

**Метод внутриврезонаторного поглощения.** Существенно повысить чувствительность метода (в  $10^2$ – $10^5$  раз) можно при использовании внутриврезонаторного поглощения, когда кювета с исследуемым веществом размещается внутри резонатора. Это повышение происходит по трем главным причинам. Во-первых, автоматически реализуется большое число проходов (до нескольких сотен, если исследуемый объект не вносит значительных потерь). Во-вторых, благодаря характерной для лазеров зависимости выходной мощности от потерь в резонаторе устраняется основная причина малой чувствительности абсорбционного метода, поскольку фактически измеряется не отношение  $\Delta I/I$ , а само значение  $\Delta I$ . И в-третьих, в режимах генерации связанных волн (многомодовый двухзеркальный лазер или кольцевой лазер) эффекты конкуренции связанных волн существенно повышают чувствительность лазеров к изменениям потерь внутри резонатора.

Внутриврезонаторный метод перспективен для регистрации очень слабых линий поглощения веществ, загрязняющих атмосферу, короткоживущих продуктов хи-

мических (биохимических) реакций, радикалов и нестабильных молекул. Для создания высокочувствительных спектрометров, работающих на принципе измерения внутрирезонаторного поглощения, в большей степени подходят перестраиваемые лазеры с широкими линиями и значительным запасом по усилению. В видимой области - это лазеры на красителях, в ИК области - лазеры на центрах окраски.

### 7.3.3. Абсорбционная спектроскопия быстропротекающих процессов

Методы ультрабыстрой пико- и субпикосекундной лазерной спектроскопии позволяют проводить исследования динамики внутреннего движения биомолекул. Во многом именно потребности исследований структурной динамики биомолекул стимулировали развитие пико- и субпикосекундной спектроскопии, в том числе и абсорбционной спектроскопии быстропротекающих процессов. С помощью этих методов исследуются сверхбыстрые процессы колебательного и электронного возбуждения биомолекул, а также динамика химических реакций с их участием.

Абсорбционные методы позволяют определять полное время релаксации биомолекул в основное состояние, время их колебательной релаксации, скорость передачи возбуждения в смеси биомолекул, скорость передачи заряда между биомолекулами в смеси акцепторов и доноров, динамику фотодиссоциации биомолекул в растворе, скорость конформационных изменений и пр. Характерные времена рассматриваемых процессов лежат в довольно широком диапазоне: 0,6–200 пс, требуемый диапазон длин волн лазерного излучения для их исследования составляет 460–880 нм.

Основная идея абсорбционной спектроскопии с использованием сверхкоротких импульсов заключается в том, чтобы «уйти» от прямых измерений длительности импульса, прошедшего поглощающую среду. Поэтому применяют два последовательных световых импульса, первый из которых (*возбуждающий импульс*) переводит биомолекулы из основного в возбужденное состояние, а второй, задержанный на пико- или субпикосекундный интервал времени, так называемый *измерительный (пробный) импульс*, регистрирует изменение спектра поглощения исследуемого объекта. В данном случае инерционный фотодетектор фиксирует те изменения в спектре поглощения, которые произошли за время, определяемое временной задержкой.

Возможны самые разнообразные схемы, реализующие эту идею. При этом возбуждающий и пробный импульсы могут иметь одинаковые и разные длины волн, возбуждающий и зондирующий лазерные пучки могут быть взаимно перпендикулярны и почти коллинеарны, в качестве регистрирующего элемента могут быть использованы: фотопленка, фотодиодные матрицы, видеокамеры, оптические многоканальные анализаторы, и отдельные фотодетекторы. Могут быть реализованы схемы с одиночными возбуждающим и пробными импульсами и с многократным их повторением, с широким спектром зондирующего излучения и пр.

При исследованиях скоростей ориентационной и вращательной релаксации, а также скорости передачи электронной энергии молекул в жидкостях используется *поляризационный метод*. Он основан на анализе наведенной поляризованным

возбуждающим импульсом анизотропии в среде с помощью измерения поглощения пробного импульса для различных взаимных ориентаций поляризации возбуждающего и пробного импульсов.

Наибольшее распространение при изучении фотохимических процессов перестройки структуры биомолекул получил так называемый метод *дифференциальной абсорбционной спектроскопии*, который основан на регистрации дифференциальных спектров поглощения, представляющих собой разность между спектрами поглощения до возбуждения и спектрами, зарегистрированными в различные промежутки времени после возбуждения. Изменение оптической плотности исследуемого объекта  $\Delta D(\lambda, t)$  определяется соотношением  $\Delta D(\lambda, t) = -\lg(E/E_0)$ ,

где  $E=I/I_0$  и  $E_0=I^*/I_0^*$  — отношение интенсивностей вышедшего из образца и падающего потока света при возбуждении и без возбуждения.

#### 7.3.4. Классификация калориметрических методов диагностики

Калориметрические методы микродиагностики или спектроскопии основаны на поглощении света с переходом в возбужденное состояние молекул и последующей безызлучательной релаксации, приводящей к нагреву образца. Информационным параметром является изменение температуры образца  $\Delta T$ . Очевидно, что степень нагрева определяется поглощательной способностью вещества, интенсивностью света и эффективностью конкурирующих процессов (флуоресценция, фотохимические и фотоэлектрические эффекты). Все это и определяет достоинства калориметрических методов, главным из которых является возможность исследования поглощения света сильно рассеивающими средами, применительно ко многим областям науки и техники, но особенно к биологическим и медицинским задачам. Эти методы позволяют исследовать непрозрачные (оптически плотные) и слабо флуоресцирующие объекты, контролировать протекание фотохимических и фотоэлектрических процессов. Поскольку измеряемым параметром является изменение температуры, то в качестве детекторов применяются неселективные приемники, отсутствует ограничение по используемым в эксперименте длинам волн со стороны приемника.

Оптико-калориметрические методы имеют много модификаций, отражающих способы регистрации изменения температуры (рис.7.6). Возможны непосредственные измерения температуры с помощью контактных датчиков и сопутствующих изменений объема образца. В этом случае реализуется *оптико-термический метод диагностики*. Более перспективным представляется метод *оптико-термической радиометрии*, основанный на измерении интенсивности теплового излучения нагретого лазерным светом тела. В последние годы этот метод становится все более популярным.

Благодаря своей простоте, надежности, высокой чувствительности и универсальности наиболее широкое распространение получил *оптико-акустический метод*. Он заключается в преобразовании тепловых колебаний в акустические и последующей их регистрации микрофоном или любым другим приемником аку-

стических колебаний.

Сравнительно широкое распространение получили также бесконтактный *оптико-термический* способ, когда измеряемым параметром является температура окружающего объект газа. *Оптико-рефракционные методы*, основаны на измерениях вариаций показателя преломления среды, вызванных температурными изменениями. К модификациям такого метода относят метод тепловой линзы, тепловой дефлекции («сдувания») дополнительного (измерительного) лазерного пучка и разнообразные интерферометрические методы.