

# Лазерная оптоакустическая спектроскопия биотканей

Е.В.Саватеева, А.А.Карбутов, В.Я.Панченко

---

В работе приведены результаты исследований коэффициента затухания света методом лазерной оптоакустической спектроскопии. Данный метод особенно перспективен для исследования сильно рассеивающих и поглощающих сред. Суть метода лазерной оптоакустической спектроскопии основан на оптоакустическом эффекте: лазерный импульс, поглощаясь в исследуемой среде, приводит к возбуждению акустических сигналов. Профиль возбуждаемых акустических сигналов определяется оптическими параметрами среды. Регистрация профиля акустических сигналов при помощи широкополосного пьезоприемника с высоким временным разрешением позволяет получить информацию об оптических свойствах исследуемой среды. В работе приведены результаты измерений коэффициента затухания света цельной (неразбавленной крови) для длин волн лазерного излучения 532, 757 и 1064 нм. Поскольку коэффициент затухания света в крови зависит от полного содержания гемоглобина и процента присоединенного к гемоглобину кислорода, то появляется возможность оценки этих параметров методом оптоакустической спектроскопии.

---

В лазерной оптоакустической спектроскопии (ЛОАС) лазерные импульсы используются для возбуждения широкополосных акустических сигналов в исследуемой среде. Регистрация профиля возбуждаемых таким образом оптоакустических сигналов (ОА-сигналов) с высоким временным разрешением позволяет получать информацию об оптических свойствах исследуемой среды. Особенно перспективно применение ЛОАС для исследования мутных биотканей. По регистрируемому ОА-сигналу могут быть определены коэффициент поглощения, затухания и приведенный коэффициент рассеяния света [1-4]. При использовании нескольких длин волн пробного излучения, возможно получение спектров оптических коэффициентов. Основной схемой регистрации возбуждаемых ОА-сигналов, применяемой в ЛОАС, является регистрация в режиме "на просвет". При этом возбуждение ОА-сигналов и их регистрация проводятся на противоположных поверхностях среды. Многочисленные применения ЛОАС для исследования различных биообъектов можно найти в книгах [5-7] и публикациях [2,4,8-10].

Распределение света в кровесодержащих тканях зависит от оптических параметров крови и от ее процентного содержания в той или иной ткани. Поэтому знание оптических параметров крови становится критичным в таких областях лазерной

медицины как оптическая томография, фотодинамическая терапия, лазерно-индуцированная термотерапия, терапия пигментированных образований и т.д. Поэтому целью работы было исследование оптических свойств крови в широком спектральном диапазоне методом ЛОАС.

Спектрофотометрические исследования крови начались еще в 1930-е Drabkin, Austin, Schmidt, Gordy [11,12]. Теорией распространения света в крови занимались несколько научных групп. Twersky в 1970 [13], Pedersen и соавторы в 1976 [14], Steinke и Shepherd в 1986 [15] предложили свои модели процесса распространения света в крови. Теория Twersky, который предложил разделить затухание света на независимое поглощение и независимое рассеяние, подтвердилась экспериментально. Но до сих пор абсолютные значения коэффициентов поглощения и рассеяния известны лишь для выборочных длин волн света.

Кровь является сложной биологической жидкостью, оптические параметры которой зависят от множества факторов, начиная от температуры, при которой она находится, скорости ее движения, пульсаций сердца и заканчивая процентным содержанием кислорода в крови. До сих пор существует лишь небольшое количество экспериментальных и теоретических работ, охватывающих исследование

крови в различных физиологических состояниях [16-18].

Для исследований оптических характеристик крови использовалась экспериментальная установка ЛОАС. Для того, чтобы избежать седиментации эритроцитов, которая влияет на амплитуду и форму оптико-акустического сигнала, к оптико-акустической ячейке был подключен перистальтический насос. Насос позволял изменять скорость прокачки в пределах 6-600 мл/мин. Измерения оптических свойств крови проводились при скорости прокачки 17 мл/мин, так, чтобы объем кюветы обновлялся за одну минуту. Данная скорость соответствует сдвиговой скорости (на стенке трубки)  $SR=96 \text{ с}^{-1}$ . Число Рейнольдса потока было равно 29, что далеко от его критического значения  $\sim 2000$ , и, следовательно, поток можно было считать ламинарным.

ЛОАС позволяет вычислять оптические коэффициенты рассеивающей среды по форме оптико-акустического сигнала и по абсолютному значению его амплитуды.

Для исследования эффективности лазерной генерации звука в крови использовался импульсный НО лазер ( $\lambda=2090 \text{ нм}$ ). На данной длине волны коэффициент поглощения света в крови  $\mu_a$  равен примерно  $40 \text{ см}^{-1}$  [18]. В то время как приведенный коэффициент рассеяния  $\mu_s'$  равен  $3,3 \text{ см}^{-1}$ . Таким образом, можно считать, что коэффициент затухания света данной длины волны в крови определяется лишь коэффициентом поглощения, что при известной плотности падающей энергии позволяет измерить эффективность ОА-преобразования  $\Gamma$ :

$$\Gamma = \frac{c_0^2 \beta}{2c_p} = \frac{p'(\tau=0)}{\mu_a \Phi}, \quad (1)$$

где  $c_0$  — скорость звука;  $\beta$  — коэффициент теплового расширения;  $c_p$  — удельная теплоемкость среды;  $p'(\tau=0)$  — абсолютное значение оптико-акустического сигнала на поверхности прозрачной и поглощающей сред;  $\mu_a$  — коэффициент поглощения света;  $\Phi$  — плотность энергии лазерного импульса.

Для исследования эффективности ОА-преобразования использовался образец крови с концентрацией гемоглобина  $10,8 \pm 0,5 \text{ г/дл}$  и процентом оксигенированного гемоглобина  $85,0 \pm 1\%$ . Для данного образца измеренный методом ЛОАС коэффициент поглощения света  $\mu_a=38 \pm 0,3 \text{ см}^{-1}$ . Вычисленный по формуле (2.1) коэффициент  $\Gamma=0,073 \pm 0,002$ .

На оптические параметры крови сильно влияет степень оксигенации гемоглобина, являющейся главной физиологической характеристикой.

Как было показано во многих работах (например, [18]), степень оксигенации влияет лишь на оптический коэффициент поглощения  $\mu_a$ , а коэффициент рассеяния  $\mu_s$  остается постоянным. Поэтому коэффициент затухания  $\mu_{\text{eff}}$  для различных образцов с различной степенью оксигенации будет определяться вариациями коэффициента поглощения  $\mu_a$ . Коэффициент же поглощения  $\mu_a$ , в свою очередь определяется общим содержанием гемоглобина и процентным содержанием оксигемоглобина. Эффективный коэффициент оптического затухания в крови может быть представлен следующим выражением:

$$\mu_{\text{eff}} = -\frac{1}{z} \ln \frac{I}{I_0} = \frac{e C}{MW}, \quad (2)$$

где  $I$  — плотность световой энергии, прошедшей через среду толщиной  $z$ ;  $I_0$  — плотность падающей энергии;  $C$  — концентрация гемоглобина в г/длитр;  $MW=64500 \text{ г/моль}$  — молекулярный вес гемоглобина;  $e$  — молярный коэффициент экстинкции (измеряется в  $\text{см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{длитр}$ ). Из выражения (2) видно, что оптический параметр

$$\varepsilon = \frac{\mu_{\text{eff}} [\text{см}^{-1}]}{C [\text{г/длитр}]} = \frac{e [\text{см}^{-1} \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{длитр}]}{MW [\text{г/моль}]}, \quad (3)$$

прямо пропорционален молярному коэффициенту экстинкции и может быть использован для количественных измерений степени оксигенации гемоглобина. Эффективный оптический коэффициент затухания крови  $\mu_{\text{eff}}$  зависит также от полного процентного содержания гемоглобина. Следовательно, содержание оксигенированного гемоглобина не может быть получено по измерению эффективного оптического коэффициента затухания на одной длине волны. В работе [19] было показано, что оценка уровня содержания кислорода в крови возможна, если известны коэффициенты затухания света на двух длинах волн.

Уровень кислородного насыщения гемоглобина крови может быть выражен как:

$$S_{\text{oxy}} = \frac{[\text{HbO}]}{[\text{HbO}+\text{Hb}]} 100\% = \frac{[\text{HbO}]}{C} 100\%. \quad (4)$$

Эффективный оптический коэффициент затухания крови на длине волны  $\lambda_1$  можно представить следующим образом:

$$\mu_{\text{eff}}^{\lambda_1} = \left[ \varepsilon_{\text{HbO}}^{\lambda_1} S_{\text{oxy}} + \varepsilon_{\text{Hb}}^{\lambda_1} (1 - S_{\text{oxy}}) \right] C. \quad (5)$$

Отношение  $\mu_{\text{eff}}^{\lambda_1} / \mu_{\text{eff}}^{\lambda_2}$  позволило бы получить уровень процентного содержания оксигенированного гемоглобина  $S_{\text{oxy}}$ , если заранее известны коэффициенты  $\varepsilon_{\text{HbO}}^{\lambda_1} \cdot \varepsilon_{\text{Hb}}^{\lambda_1}$ ,  $\varepsilon_{\text{HbO}}^{\lambda_2} \cdot \varepsilon_{\text{Hb}}^{\lambda_2}$ .

Приведем пример применения ЛОАС для определения степени оксигенации гемоглобина в крови. Ниже описаны измерения зависимостей коэффициентов  $\epsilon$  крови от процентного содержания оксигенированного гемоглобина для трех различных длин волн 532 нм, 757 нм и 1064 нм.

В качестве объектов исследования были взяты образцы крови овцы, имеющие различное процентное содержание оксигенированного гемоглобина. В каждый образец крови был добавлен гепарин, из расчета 2 мл гепарина, имеющего концентрацию 1000 единиц/1 млитр, на 50 млитр крови. Измерения проводились при температуре 22°C. Образцы помещались в герметичную ОА-кювету, для того, чтобы содержание кислорода в крови было постоянным. Каждый образец крови после окончания экспериментов был исследован при помощи стандартного оксиметра. Оптико-акустические измерения проводились на основной ( $\lambda=1064$  нм) и второй ( $\lambda=532$  нм) гармониках ND-YAG лазера, а также на длине волны  $\lambda=757$  нм.

Результаты исследования нескольких образцов крови на трех различных длинах волн приведены на рис. 1-3. На рисунках даны зависимости эффективного коэффициента затухания света  $\mu_{\text{eff}}$  нормированного на содержание гемоглобина  $C$  в каждом конкретном образце.

Рис. 1 представляет зависимость нормированного эффективного коэффициента затухания света от процентного содержания оксигенированного гемоглобина на  $\text{HbO}$  на длине волны  $\lambda=532$  нм. Видно, что с возрастанием концентрации кислорода, присоединенного к гемоглобину, коэффициент затухания света возрастает.

Подобные зависимости, полученные на длинах волн 1064 нм и 757 нм лазерного излучения, приведены ниже на рис. 2 и 3. Рис. 1-3 демонстрируют возможности ЛОАС для исследования оптических свойств биологических жидкостей.

При отключении циркуляции крови в кювете, эритроциты, содержащиеся в крови, начнут постепенно оседать на дно кюветы. Скорость оседания эритроцитов (СОЭ) является постоянно используемым лабораторным тестом для диагностики различных заболеваний (см., например, [20]). Перед забором крови животному (в данном случае кролику) был введен раствор гепарина из расчета 500 единиц на 1 кг веса животного. Оптико-акустические сигналы возбуждались в крови на длине волны 355 нм. Измерения оптико-акустических сигналов проводились каждые 3 мин в течение часа.

На рис. 4 приведены ОА-сигналы, зарегистрированные сразу же после помещения крови в оптико-

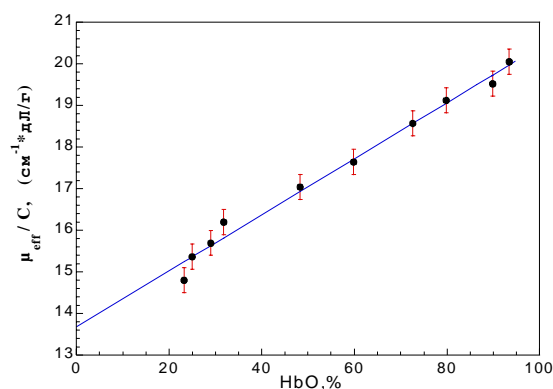


Рис. 1. Зависимость нормированного на полное содержание гемоглобина коэффициента затухания света от процентного содержания оксигенированного гемоглобина на длине волны  $\lambda=532$  нм.

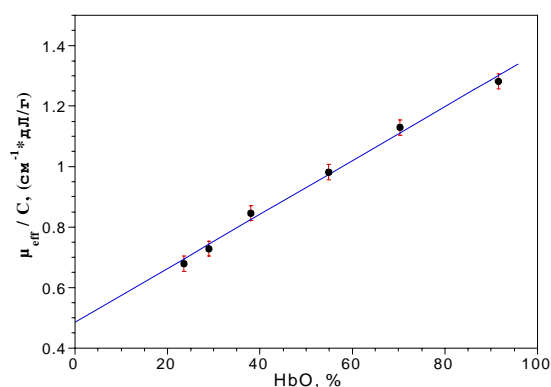


Рис. 2. Зависимость нормированного на полное содержание гемоглобина коэффициента затухания света от процентного содержания оксигенированного гемоглобина на длине волны  $\lambda=1064$  нм.

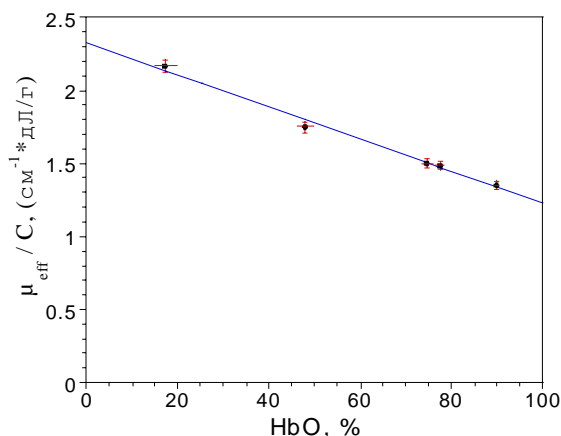


Рис. 3. Зависимость нормированного на полное содержание гемоглобина коэффициента затухания света от процентного содержания оксигенированного гемоглобина на длине волны  $\lambda=757$  нм. Точки — экспериментально полученные данные, сплошная линия — линейная аппроксимация.

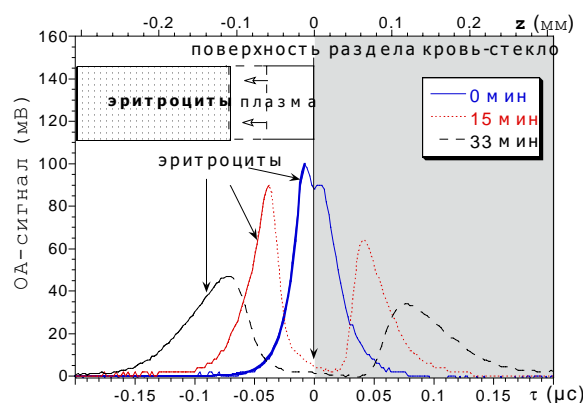


Рис.4. Исследование седиментации крови. Оптико-акустический сигнал, возбуждаемый в крови на длине волны 355 нм. Перед забором крови животному (кролику в данном случае) был введен раствор гепарина из расчета 500 единиц на 1 кг веса животного. Концентрация гемоглобина в образце крови  $C=12,6$  г/дл,  $HbO=22\%$ . Измерения оптико-акустических сигналов проводились каждые 3 мин в течение часа.

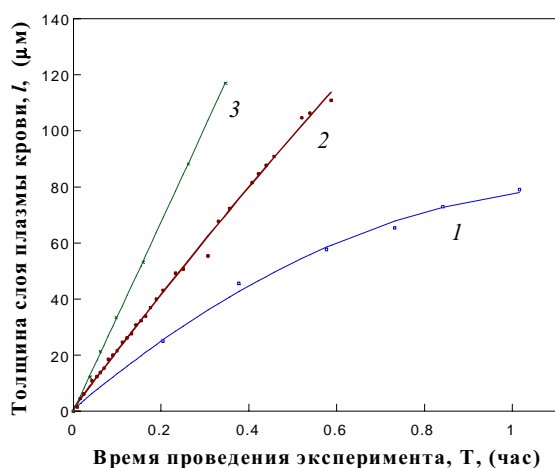


Рис.5. Измерение скорости седиментации эритроцитов. Кровь кролика имела концентрацию гемоглобина  $C=15,9$  г/длитр, процентное содержание оксигемоглобина  $HbO=94\%$ . Кровь овцы имела  $C=12,6$  г/длитр,  $HbO=22\%$ . Кровь свиньи имела  $C=10,5$  г/длитр,  $HbO=93,4\%$ . Маркеры — экспериментальные значения, сплошные линии — аппроксимация экспериментальных значений при помощи функции  $l = \text{const} + vT$ . Вычисленные СОЭ равны:  $v_{\text{кролик}}=37$  нм/с;  $v_{\text{овца}}=58$  нм/с;  $v_{\text{свинья}}=93$  нм/с.

акустическую ячейку (0 мин), через 15 мин и через 33 мин. В момент начала эксперимента цельная кровь представляет собой однородную среду. Как видно из рис.4, сигнал в момент начала измерений (0 мин) имеет форму, типичную для рассеивающей среды. Максимум поглощения находится под поверхностью на глубине  $z=12,5$  мкм. С течением времени эритро-

циты оседают на дно кюветы и у поверхности появляется более прозрачный слой плазмы, образовавшейся между стеклом и слоем эритроцитов.

ОА-сигнал, зарегистрированный через 15 мин после начала эксперимента, демонстрирует, что пик поглощения сместился на глубину 59 мкм (соответствует  $\tau=0,038$  мкс), а между этим пиком и стеклом образовался слабо поглощающий слой плазмы. Через 33 мин после начала эксперимента еще большее количество эритроцитов осело на дно, толщина плазмы увеличилась, поэтому пик поглощения на ОА-сигнале сместился еще дальше от поверхности стекла на глубину 112 мкм. Сигналы при  $\tau > 0$  соответствуют отраженному от поверхности раздела исследуемой среды и стекла переднему фронту. По регистрируемым ОА-сигналам возможно измерить толщину плазмы, которая равна расстоянию между поверхностью раздела стекла и исследуемой среды ( $\tau=0, z=0$ ) и максимумом сигнала, соответствующего началу слоя эритроцитов. Результат измерения толщины плазмы по оптико-акустическим сигналам приведен на рис.5. В данном эксперименте использовалась кровь трех различных типов: 1 — кровь кролика; 2 — овцы; 3 — свиньи.

Для крови кролика скорость оседания эритроцитов (СОЭ) была равна  $37 \pm 1$  нм/с, в то время как для крови овцы СОЭ равна  $58 \pm 1$  нм/с, а для крови свиньи —  $93,0 \pm 2$  нм/с.

Таким образом, скорость оседания эритроцитов может быть измерена при помощи оптико-акустической техники.

Примеры, приведенные в данной работе, наглядно демонстрируют возможности лазерной оптико-акустической спектроскопии для исследования сильно рассеивающих и сильно поглощающих биологических сред.

## Литература

1. В.Э.Гусев, А.А.Карабутов. Лазерная оптоакустика. М.: Наука, 1991, 304 с.
2. E.F.Carome, N.A.Clark, C.E.Moeller. Generation of acoustic signals in liquids by ruby laser-induced thermal stress transient. Appl.Phys.Lett, v.4, p.95-97, 1964.
3. Л.В.Бурмистрова, А.А.Карабутов, А.И.Портнягин, О.В.Руденко, Е.Б.Черепецкая. Метод передаточных функций в задачах термооптической генерации звука. Акуст.Журн., т.24(5), с.663-665, 1978.
4. S.V.Egerev, A.A.Pashin. Opto-acoustic diagnostics of micro inhomogeneous liquid media. Acoust.Phys., v.39(1), p.43-45, 1993.
5. M.L.Wolbarsht. Laser applications in medicine and biology. V.3. N.-Y.: Plenum Press. 1977, p.175-219.

6. S.Fine, E.Klein, W.Norwak, R.E.Scott, et al. Interaction of laser radiation with biologic system. I. Studies on interaction with tissue. Fed.Proc.Fed.Amer.Soc.Exp.Biol., v.24(1), Part III, p.35-56, 1965.
7. V.V.Tuchin. Handbook of Optical Biomedical Diagnostics. Bellingham: SPIE Press. 2002, 1100 c.
8. R.O.Esenaliev, A.A.Karabutov, N.B.Podymova. Laser ablation of aqueous solutions with spatially homogeneous and heterogeneous absorption. Appl.Phys.B, v.59(1), p.73-81, 1994.
9. A.A.Oraevsky, S.L.Jacques, F.K.Tittel. Mechanism of laser ablation for aqueous media irradiated under confined stress conditions. J.Appl Phys., v.78(2), 1281-1290, 1995.
10. A.A.Karabutov, N.B.Podymova, V.S.Letokhov. Time-resolved optoacoustic tomography of inhomogeneous media. Appl.Phys.B, v.63, p.545-563, 1996.
11. D.L.Drabkin, J.H.Austin. Spectrophotometric studies. I. Spectrophotometric constant for common hemoglobin derivatives in human, dog and rabbit blood. J.Biol.Chem., v.98, p.719-733, 1932.
12. E.Gordy, D.L.Drabkin. Spectrophotometric studies XVI. Determination of the oxygen saturation of blood by a simplified technique, applicable to standart equipment. J.Biol.Chem., v.227, p.285-299, 1957.
13. V.Twersky. Absorption and multiple scattering by biological suspension. J.Opt.Soc.Am., v.60, p.1084-1093, 1970.
14. G.D.Pedersen, N.J.McCormic, L.O.Reynolds. Transport calculation for light scattering in blood. Biophysics J., v.16, p.199-207, 1976.
15. J.M.Steinke, A.P.Shepherd. Diffuse reflectance of whole blood: model for diverging light beam. IEEE Trans. Biomed.Eng., v.BME-34, p.826-834, 1987.
16. R.A.McRae, J.A.McClure, P.Latimer. Spectral transmission and scattering of red blood cells. J.Opt.Soc.Am., v.51(12), p.21-29, 1961.
17. L.G.Lindberg, P.A.Цберг. Optical properties of blood in motion. Optical Engineering, v.32(2), p.253-257, 1993.
18. A.Roggan, M.Friebel, K.Dürschel, A.Hahn, G.Müller. Optical properties of circulating human blood in the wavelength range 400-2500 nm. J.Biomedical Optics, v.4(1), p.36-46, 1999.
19. A.Zourabian, A.Siegel, B.Chance, N.Ramanujan, et al. Trans-abdominal monitoring of fetal arterial blood oxygenation using pulse oxymetry. J.Biomedical Optics, v.5(4), p.391-405, 2000.
20. J.B.Miale. Laboratory medicine hematology. 6-x edition. St.Louis: Mosby Comp. 1982. p.350-366.