

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

**Федеральное государственное автономное  
образовательное учреждение высшего образования  
«САМАРСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ имени  
академика С.П. КОРОЛЕВА»**

**БИОФОТОНИКА**

*методические указания к практическим работам*

Самара 2017

УДК 535

Составители: В.П. Захаров, Д.Н. Артемьев

**Биофотоника:** Метод. указания к практическим работам / – Самар. нац. исследов. ун-т.; сост. В.П. Захаров, Д.Н. Артемьев; Самара, 2017. 36 с.

Методические указания к практическим работам подготовлены на кафедре лазерных и биотехнических систем Самарского университета и предназначены для студентов дневного отделения, обучающихся по специальностям 12.04.04 «Биотехнические системы и технологии» и 03.04.01 «Прикладные математика и физика» по дисциплине «Биофотоника».

Табл. 2 Ил. 9. Библиогр. 5 назв.

Рецензент: Кренц А.А., к.ф.-м.н., доцент кафедры физики

## СОДЕРЖАНИЕ

1	СТРУКТУРА И ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОТКАНЕЙ.....	4
2	МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ СПЕКТРАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК РАССЕЯННОГО СВЕТА.....	11
3	ОПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ.....	20
4	ЛАЗЕРНАЯ ХИРУРГИЯ.....	23
	БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ИСТОЧНИКИ.....	35

# 1 СТРУКТУРА И ОПТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОТКАНЕЙ

## 1.1 Теоретические основы

Биологические ткани являются оптически неоднородными поглощающими средами со средним показателем преломления большим, чем у воздуха, поэтому на границе раздела биообъект – воздух часть излучения отражается (френелевское отражение), а остальная часть проникает в биоткань. Объемное рассеяние является причиной распространения значительной доли излучения в обратном направлении (обратное рассеяние). Хорошо известно, что основным источником рассеяния света в биотканях является различие в значениях показателей преломления различных компонент биотканей, т.е. между митохондриями, ядром, другими компонентами и цитоплазмой клеток; или внутритканевой жидкостью и структурными элементами соединительной (фиброзной) ткани (коллагеновыми и эластиновыми волокнами). Имеются данные о том, что в зависимости от степени малигнизации (злокачественности) новообразований ткани увеличивается хаотизация клеточных структур, возрастает разброс размеров отдельных клеточных ядер относительно среднего значения, которое также увеличивается от 10 — 12 мкм в норме до 20 — 50 мкм для патологических тканей, одновременно может изменяться и относительный показатель преломления ядро — цитоплазма. Все это ведет к изменению характера рассеяния ткани.

С оптической точки зрения, биоткани (включая и биожидкости: кровь, лимфу и пр.) можно разделить на два больших класса: 1 — сильно рассеивающие (оптически мутные), такие как кожа, мышцы, хрящ, мозг, стенка сосуда, кровь, склера, оптические свойства которых могут быть достаточно хорошо описаны в модели многократного рассеяния скалярных волн в случайно–неоднородной среде с поглощением; 2 — слабо рассеивающие (прозрачные), такие

как ткани переднего отрезка глаза (роговица, хрусталик), оптические свойства которых описываются в модели однократного (или многократного) рассеяния упорядоченной среды с плотной упаковкой рассеивателей, которые содержат поглощающие центры.

Ослабление коллимированного (лазерного) пучка света в биоткани происходит по экспоненциальному закону, интенсивность прошедшего коллимированного света может быть оценена на основе закона Бугера–Беера:

$$I(z) = (1 - R) \cdot I_0 \cdot e^{-\mu_t z} \quad (1)$$

где  $R$  - коэффициент френелевского отражения, при нормальном падении пучка,  $R = ((n - 1)/(n + 1))^2$ ,  $n$  — относительный показатель преломления биоткани;  $I_0$  — интенсивность падающего света;  $\mu_t = \mu_a + \mu_s$  - коэффициент экстинкции (коэффициент ослабления),  $\mu_a$  — коэффициент поглощения,  $\mu_s$  - коэффициент рассеяния;  $z$  — толщина образца.

Интенсивность коллимированного света, проникающего через слой рассеивающей ткани со средней плотностью рассеивателей  $\rho$  и толщиной  $l$ , определяется соотношением:

$$I(z) = I_0 \cdot e^{-\rho \mu_s l}, \quad (2)$$

где  $I_0$  — интенсивность падающего пучка, а сечение рассеяния

$$\mu_s = \frac{1}{\rho I_0} \cdot \int_{4\pi} I(\theta) d\Omega. \quad (3)$$

Однако скалярное приближение является недостаточным, так как не учитывает векторную природу падающих и рассеянных волн, особенно это существенно для прозрачных тканей. В рассеивающей среде векторный характер волн проявляется как возникновение поляризации у первоначально неполяризованного пучка света или как деполяризация при распространении в среде первоначально поляризованного пучка. При этом информативными параметрами, характеризующими структуру биотканей и ансамблей клеток, являются как степень деполяризации первоначально поляризованного света, характер преобразования поляризации из одного вида в другой, так и появление поляризованного компонента в рассеянном свете при

облучении объекта неполяризованным излучением. Состояние поляризации многократно рассеянного света анализируется либо в условиях пространственной диффузии фотонов, когда угловой спектр излучения практически изотропен, либо при мало-угловом рассеянии в средах с крупномасштабными неоднородностями. Отметим, что анализ состояния поляризации при мало-угловом многократном рассеянии важен для многих задач оптической диагностики биологических сред. При этом среды могут быть представлены в виде случайных систем с дальнедействующими корреляциями флуктуаций диэлектрической проницаемости и, которые показывают когерентные эффекты рассеяния или от которых следует ожидать флуктуации поляризации рассеянного света как от неупорядоченных сред с крупномасштабными неоднородностями.

В практическом плане ожидается, что поляризационные методы должны привести к более простым, по сравнению с временными и фазово-частотными методами, схемами оптической медицинской томографии, а также дать новую информацию о структуре биотканей.

Широкий круг различных биотканей содержит двулучепреломляющие структуры. Для костной ткани - это минерализованные пучки (кристаллы гидроксиапатита), для мышечной - миофибриллы, для кожи - коллагеновые пучки. Для мышечной ткани плотность упаковки пучков в мультифрактале выше, чем в костной ткани, и миофибриллы в них обладают меньшей величиной двулучепреломления. Наличие преимущественной ориентации коллагеновых волокон в различных участках роговой оболочки приводит к появлению дихроизма формы. Ориентационная структура коллагеновых пучков дермы кожи чрезвычайно разнообразна даже для небольших геометрических толщин гистологического среза.

Анизотропные оптические свойства большинства биотканей можно легко объяснить ее строением. На рисунке 1 представлена модель, соответствующая типичному строению

соединительной ткани. Обычно биологическая ткань состоит из коллагеновых, эластиновых, ретикулярных волокон, а также из основного вещества. Характерным компонентом структуры фиброзных тканей являются коллагеновые волокна. Коллагеновые волокна входят в состав разных видов соединительной ткани и определяют их прочность на разрыв. В рыхлой неоформленной волокнистой соединительной ткани коллагеновые волокна располагаются в различных направлениях в виде волнообразно изогнутых тяжей толщиной 1—3 мкм и более.

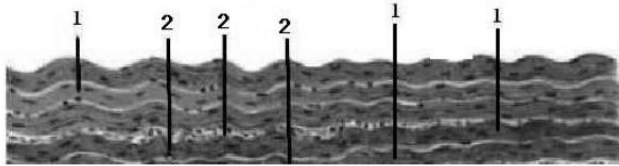


Рисунок 1 – типичное строение соединительной ткани  
1- базовое вещество; 2- коллагеновые волокна.

Коллагеновые волокна состоят из пучков параллельно расположенных фибрилл толщиной в среднем 50—100 нм, связанных между собой гликозаминогликанами и протеогликанами. Толщина волокон зависит от числа фибрилл. Коллагеновые фибриллы обладают поперечной исчерченностью — чередованием темных и светлых участков с периодом повторяемости 64—70 нм. В пределах одного периода находятся внутреннеполосы (вторичные) шириной 3—4 нм. Основное вещество — это студнеобразная среда, заполняющая пространство между клетками и волокнами соединительной ткани. Показатель преломления коллагеновых волокон находится в пределах 1.44 – 1.47, а

показатель преломления основного (базового) вещества — 1.33 – 1.36. Поэтому, исходя из описания строения биоткани, можно сказать, что она обладает оптической анизотропией, обусловленной анизотропией формы. Заметим, что наличие хиральных молекул в составе биотканей (оптически активные белки, например, Альбумин, или метаболитические вещества, поступающие в ткань, такие как глюкоза) приводят к

проявлению не только линейной, но и круговой анизотропии биоткани. Однако для физических условий и для сильно рассеивающих биотканей круговая анизотропия в оптических характеристиках не проявляется. По свойствам оптической анизотропии различные типы биоткани можно разделить на три группы: изотропные, показывающие свойства одноосных кристаллов, показывающие свойства двуосных кристаллов. В табл. 1 представлены некоторые биоткани и их тип оптической анизотропии.

Следует отметить, что оптическая анизотропия мышечной ткани, вены и аорты обусловлена сильным упорядочением рассеивающих свет структурных элементов. С другой стороны, как это показано в табл. 1, патологические ткани не обладают анизотропными оптическими свойствами. Возможно, это связано в первую очередь с тем, что при развитии патологии плотная упаковка коллагеновых волокон и их ориентация нарушается.

Таблица 1 Примеры оптической анизотропии некоторых биотканей

Изотропные	Свойства одноосного кристалла	Свойства двуосного кристалла
Саркома мышечной ткани, лимфосаркома.	Мышцы, вена, аорта, хрящ, роговица.	Склера, сухожилие.

Измерение показателей преломления биотканей и отдельных ее компонентов является одной из актуальных задач оптики биотканей. Такие исследования ведутся сравнительно давно, однако нельзя сказать, что в литературе можно найти достаточно полную информацию даже о среднем значении показателя преломления отдельных биотканей  $n$ . Согласно данным, значения  $n$  для многих биотканей лежат в диапазоне 1.335 - 1.620 для видимого света, например, для рогового слоя кожи  $n = 1.55$ , для эмали зуба 1.62, а для поверхности хрусталика - 1.386. Следует отметить, что



результаты *in vitro* и *in vivo* измерений  $n$  могут существенно отличаться, например, для брыжейки крысы *in vitro* измерения дают  $n = 1.52$ , а *in vivo* только 1.38. Это означает, что рассеивающие свойства живой и препарированной ткани могут существенно различаться. Для многих биотканей оптические свойства, в том числе и показатель преломления, определяются содержащейся в биоткани водой. Значения показателя преломления воды в широком диапазоне длин волн 0.2 - 200 мкм таковы, для  $\lambda = 0.2$  мкм  $n = 1.396$ , 0.5 мкм - 1.335, 2.8 мкм - 1.142, 3.5 мкм - 1.400, 10 мкм - 1.218, 200 мкм - 2.130.

Для отдельных частей клетки значения показателей преломления на  $\lambda = 900$  нм могут быть оценены как следующие: среда вне клетки -  $n = 1.35$ , цитоплазма -  $n = 1.37$ , мембрана клетки -  $n = 1.46$ , ядро -  $n = 1.39$ , меланин -  $n = 1.7$ .

Измерения показателя преломления некоторых сильно рассеивающих биотканей на  $\lambda = 633$  нм с помощью волоконно-оптического рефрактометра показывают, что наибольшее значение  $n$  из исследованных тканей имеет жировая ткань (1.455), наименьшее – ткань легких (1.380) и печень (1.368), а среднее - кровь и селезенка (1.400), мышечная ткань (1.410) и почки (1.418). Оказалось, что гомогенизация ткани мало влияет на результаты измерений (изменения не превышают ошибку измерений, равную 0.006), коагулированная ткань имеет более высокий показатель преломления, чем нативная (например, для яичного белка  $n$  изменяется от 1.321 до 1.388), имеется тенденция к снижению показателя преломления при увеличении длины волны света от 400 до 700 нм (например, для мышечной ткани быка в пределах 1.42 - 1.39), что характерно для большинства родственных материалов.

Поскольку лазерное излучение довольно эффективно используется в стоматологии, рассмотрим особенности строения зубной ткани с точки зрения прохождения света через нее. Как известно, в твердой части зуба различают эмаль и дентин. Эмаль является сравнительно прозрачной тканью, поэтому оптические свойства зуба (поглощение, рассеяние, цвет) определяются, в основном, дентином. Дентин построен

из основного вещества, пронизанного канальцами. Канальцы берут начало в пульпе, около внутренней поверхности дентина, и, веерообразно расходясь, заканчиваются на его наружной поверхности. Внутренний слой стенки дентиновых канальцев содержит много минерализованных, по сравнению с остальным веществом дентина, волокон. Диаметр дентиновых канальцев составляет 1 — 5 мкм, их плотность колеблется в диапазоне  $3 \cdot 10^6 - 7.5 \cdot 10^6 \text{ см}^{-2}$ . Поглотителями в дентине являются белковоподобные молекулы, а рассеивателями - кристаллы гидроксиапатита диаметром 2.0 - 3.5 нм и длиной вплоть до 100 нм. Таким образом, строение зуба представляет собой пучки согласованных природных световодов. Извитая форма световодов определяет высокую эффективность освещения пульпы практически независимо от того, каким образом свет попадает на внешнюю поверхность зуба. Свет, падая на поверхность эмали, рассеивается на неоднородностях и частично захватывается оптическими волноводами, роль которых в эмали выполняют эмалевые призмы, а в дентине - область дентина между канальцами. Волноводы обеспечивают эффективный транспорт световой энергии от поверхности эмали к пульпе. Каждая точка поверхности эмали оказывается оптически связанной с вполне определенной точкой полости зуба. Волноводный эффект существенно более выражен в дентине, чем в эмали.

Рассеяние света на периодических структурах зубной ткани дает информацию о ее строении. Обычно для этих целей используют шлифы зубной ткани. Однако, как показали исследования рассеяния лазерного излучения с  $\lambda = 633 \text{ нм}$ , на периодических структурах дентина (свет направляется поперек дентинных канальцев) существующие теоретические модели дифракции света на оптических неоднородностях дентина не в полной мере описывают экспериментальные результаты.

## **1.2 Темы для подготовки докладов**

1. Модели для описания оптических свойств биоткани.

2. Строение и оптическая схема глаза.
3. Структура и оптические свойства клеток
4. Оптические свойства крови.

## **2 МЕТОДЫ ИЗМЕРЕНИЯ СПЕКТРАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК РАССЕЯННОГО СВЕТА**

### **2.1 Теоретические основы**

Среди известных оптических методов контроля характеристик среды особое место занимают спектральные методы, характеризующиеся высокой чувствительностью и позволяющие наряду с комплексным количественным и качественным анализом компонент среды обеспечивать ее 3D визуализацию и наблюдение за кинетическими процессами.

Существующие спектральные методы можно разделить на 3 основные группы:

- адсорбционные методы – основаны на анализе поглощения среды путём спектрального исследования света, прошедшего через среду;
- флуоресцентные методы – основаны на явлении флуоресценции и спектральном анализе при активном воздействии на среду узкополосным излучением;
- методы анализа рассеянного излучения – основаны на спектральном анализе излучения, диффузно рассеянного назад.

#### *2.1.1 Флуориметрия*

Явление люминесценции широко используется в химии для исследования процессов, связанных с изменениями электронной энергии в различных процессах. Изменение спектров возбуждения или испускания (определение см. ниже) несёт в себе важную информацию о химическом составе системы, кинетике процессов, формах нахождения флуорофора в гомогенных и гетерогенных средах. В основе люминесценции лежит явление испускания света частицей, находящейся в возбужденном электронном состоянии.

По методу возбуждения люминесценция делится на фото-, электро- и хемилюминесценцию; по времени жизни и мультиплетности возбуждённого и основного состояний – на флуоресценцию и фосфоресценцию. Флуоресценция – быстро затухающее излучение, связанное с переходом между состояниями без изменения мультиплетности системы, например, из возбуждённого синглетного в основное синглетное состояние. Фосфоресценция – медленно затухающее излучение, отвечающее переходу между состояниями с разной мультиплетностью, например, из триплетного в синглетное.

Длина волны испускания и время жизни возбуждённого состояния являются индивидуальными характеристиками флуорофора. При наличии в системе нескольких компонентов-флуорофоров их индивидуальное определение возможно на основе спектральных и/или временных характеристик.

Для схематического изображения процессов, происходящих при поглощении, преобразовании и испускании энергии в процессе люминесценции часто используют диаграммы Яблонского.

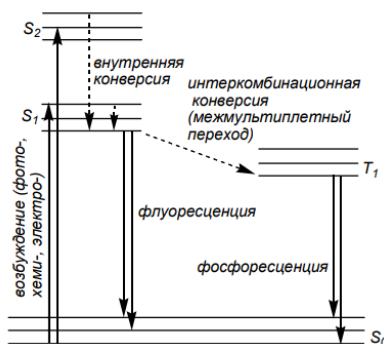


Рисунок 2 – Диаграмма Яблонского

В отличие от спектров, отвечающих поглощению энергии, спектры, отвечающие излучению энергии, называют спектрами испускания, или спектрами флуоресценции (фосфоресценции) – зависимость интенсивности

испускаемого излучения от его длины волны. При этом возбуждение системы (в случае фотолюминесценции) обеспечивается облучением с фиксированной длиной волны. Различают также и спектры возбуждения флуоресценции, которые представляет собой зависимость интенсивности испускания при фиксированной длине волны от длины волны возбуждения. Если испускание возбуждённой молекулы происходит из единственного состояния, то спектр поглощения совпадает по форме со спектром возбуждения флуоресценции.

На практике возможность записи того или иного спектра реализуется различными способами. Так, спектр поглощения регистрируется путем записи интенсивности сигнала, прошедшего сквозь образец от источника излучения к фотоприемнику (рисунок 3) при изменении длины волны излучения, прошедшего через монохроматор.

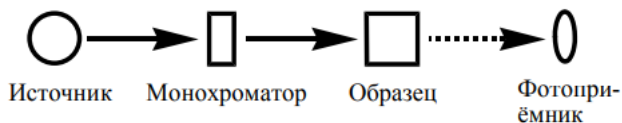
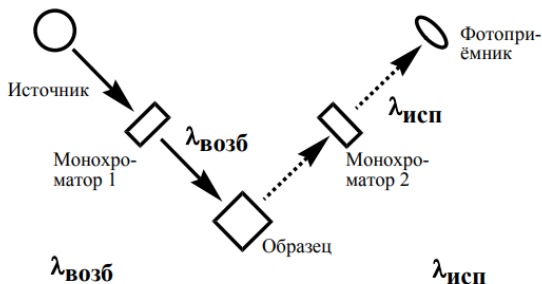


Рисунок 3 – Оптическая схема регистрации поглощения излучения однолучевым прибором

Наиболее часто для получения спектров флуоресценции, а также спектров возбуждения флуоресценции аппаратурно реализуется другая оптическая схема (рисунок 4).



#### Рисунок 4 – Оптическая схема регистрации флуоресценции, записываемых при различных режимах работы монохроматоров

В ней источник излучения и фотоприемник, если смотреть от образца, находятся под прямым углом друг к другу для уменьшения попадания возбуждающего излучения в детектор. Кроме того, часто в приборах существует возможность разложения в спектр как возбуждающего, так и испускаемого образцом излучения. Для этого в него вводят два монохроматора.

Если с помощью монохроматора 1 фиксируют длину волны излучения ( $\lambda_{\text{возб}}$ ), а для записи испускания используют монохроматор 2, то в результате получают спектр испускания (флуоресценции) образца. Если же при помощи монохроматора 2 фиксируют длину волны испускания ( $\lambda_{\text{исп.}}$ ), то изменяя длину волны монохроматора 1, получают спектр возбуждения флуоресценции образца.

В случае единственного испускающего возбуждённого состояния спектр испускания (флуоресценции) не зависит от длины волны возбуждения. Избыток энергии возбуждения (см. рис. 1) над низшим электронно-колебательным возбуждённым уровнем ( $S_1$ ) расходуется на внутреннюю конверсию флуорофора. Этот факт является основополагающим при доказательстве присутствия в системе флуорофора. Для флуорофоров выполняется правило зеркальной симметрии Лёвшина, согласно которому спектры поглощения и люминесценции, построенные в одних координатах, являются зеркальными отражениями друг друга (рис. 4). Если в спектре поглощения присутствует несколько полос, то зеркальной по отношению к спектру люминесценции является полоса, отвечающая возбуждённому состоянию, из которого происходит испускание. С помощью правила Лёвшина можно идентифицировать такие полосы поглощения.

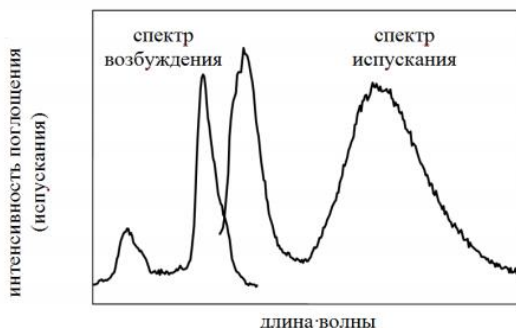


Рисунок 5 – Спектры возбуждения и флуоресценции, представленные в одних координатах

Правило Лёвшина выполняется, если близки геометрии молекул в основном и возбуждённом состояниях, а также энергии их колебательных уровней в этих состояниях, отсчитанные от энергии нулевых колебаний. Возбуждение, как правило, происходит с низшего колебательного уровня основного состояния на случайный (соответствующий конкретной энергии поглощаемого кванта) уровень. Поэтому форма пика в спектре поглощения отвечает распределению колебательных уровней возбуждённого состояния. Испускание же, как правило, протекает после внутренней конверсии (или релаксации) с более высоких колебательных уровней электронного возбуждённого состояния на низший. Распределение квантов испускания по энергиям в таком случае соответствует колебательным уровням основного состояния.

В ряде случаев могут наблюдаться отклонения от этого правила. Обычно это связано с различием в геометрии молекул в основном и возбужденном состояниях или формированием специфических возбужденных частиц, таких как эксимеры или эксиплексы. 2 При возбуждении флуоресценции в конденсированной фазе наблюдается сдвиг линий спектра испускания в длинноволновую область, называемый сдвигом Стокса.

Важной характеристикой флуоресценции является квантовый выход, представляющий собой отношение испущенных и поглощенных фотонов. В пределе он равен единице, в случае, если все возбужденные молекулы переходят в основное состояние (релаксируют) через излучательный путь. Отношение молекул, релаксирующих по излучательному и безызлучательному путям, можно также выражать через скорости испускания фотона и скорости безызлучательной конверсии. Тогда квантовый выход, близкий к единице, соответствует тому, что константа скорости внутренней безызлучательной конверсии много меньше константы скорости испускания фотона.

Различают также и энергетический выход флуоресценции, а именно – отношение испускаемой и поглощенной энергии. Рассчитать его можно, домножив квантовый выход на отношение энергий излученных и поглощенных квантов. Поскольку испускание происходит на более длинных волнах, энергии квантов испускания меньше. Это же показано и на диаграмме Яблонского, где видно, что внутренняя конверсия приводит к уменьшению энергии испускаемых квантов по отношению к поглощенным. Такое уменьшение называется стоксовыми потерями. Из-за таких потерь энергетический выход флуоресценции всегда меньше единицы, даже если квантовый выход и количественный.

На выход флуоресценции влияет и среда, окружающая молекулы флуорофора. Поскольку процессы поглощения и испускания световых квантов являются статистическими, то состав среды может сказываться на эффективности процесса. Так, растворенный кислород обладает эффектом тушения флуоресценции, связанным с безызлучательным переносом энергии возбужденного состояния флуорофора на молекулы кислорода. Следовательно, при исследовании флуоресцентных свойств вещества необходимо принимать во внимание не только процессы, происходящие непосредственно с участием молекул флуорофора, но и процессы с участием окружающей его среды.



При экспериментальном измерении квантового выхода считают, что мерой числа излучённых квантов является площадь под спектром флуоресценции, то есть эти величины прямо пропорциональны друг другу. Также считают, что и число поглощённых квантов пропорционально оптической плотности.

### *2.1.2 Спектроскопия комбинационного рассеяния*

Эффект комбинационного рассеяния; рамановское рассеяние; эффект Рамана (англ. Raman effect или Raman scattering) — неупругое рассеяние света (с изменением частоты/длины волны), сопровождающееся переходами вещества между колебательными уровнями энергии.

Комбинационное рассеяние - рассеяние света, при котором происходит обмен энергией между фотонами и веществом, называется неупругим рассеянием или комбинационным рассеянием (эффектом Рамана). Следствием изменения энергии фотонов является изменение длины волны (частоты) рассеянного света. Наблюдается также упругое рассеяние света веществом, без изменения энергии фотонов и, следовательно, длины световой волны. Пример упругого рассеяния — релеевское рассеяние света (эффект Релея).

Механизм комбинационного рассеяния (КР) поясняет Стоксово КР характеризуется тем, что в процессе взаимодействия с молекулой фотон отдает ей часть энергии. В результате такого процесса молекула переходит с уровня с меньшим значением энергии на уровень с более высоким значением энергии, а энергия рассеянного фотона уменьшается (длина волны увеличивается). Антистоксово КР характеризуется тем, что в процессе взаимодействия с молекулой, находящейся в возбужденном состоянии, энергия фотона увеличивается, а молекула переходит в состояние с меньшим значением энергии. Так как при термодинамическом равновесии заселенность уровней уменьшается с увеличением энергии, то при спонтанном КР частота антистоксовых переходов меньше частоты стоксовых — поэтому

интенсивность стоксовых линий КР в спектре выше. Стоксовы линии КР расположены в спектре с «красной» стороны (со стороны больших длин волн/меньших частот) от релеевской линии. Не все переходы между различными колебательными энергетическими уровнями возможны.

Интенсивность комбинационного рассеяния на 3–6 порядков ниже релеевского, поэтому для наблюдения КР спектров требуется интенсивный источник монохроматического излучения и высокочувствительный детектор. В настоящее время в качестве источников излучения, главным образом, используют лазеры. КР-спектроскопия может быть использована для изучения структуры и состава вещества, его взаимодействия с окружающей средой. Полосы комбинационного рассеяния можно характеризовать частотой, интенсивностью и степенью деполяризации излучения. При облучении оптически анизотропных молекул поляризованным светом рассеянный свет окажется частично деполяризованным.

Когда частота возбуждающего света приближается и совпадает с частотой оптического перехода системы, реализуется ситуация резонансного КР. Спектральные особенности КР света дают информацию о типе структуры и взаимодействии электронной и фононной подсистем в полупроводниках.

КР света в конденсированных средах обладает рядом особенностей, так как в твердых телах колебания молекул (атомов, ионов) сильно коррелированы и, в случае кристаллов, их следует рассматривать как колебания кристаллической решетки в целом.

Спектры КР света аморфных твердых тел более «размыты», чем кристаллических — из-за разупорядочения структуры и уменьшения областей пространственных корреляций между колебаниями частиц. Наблюдается заметное уширение линий и в КР спектрах твердых растворов и высокодефектных кристаллов.

К уширению линий спектров может приводить ориентационное разупорядочение твердых тел, связанное с

вариациями ориентации молекул в молекулярных кристаллах, диполей в сильно полярных кристаллах, свободных электронных пар в ионах типа  $Pb^{2+}$ . Смещение линий КР спектров силикатных стекол служит мерой степени полимеризации силикатных сеток.

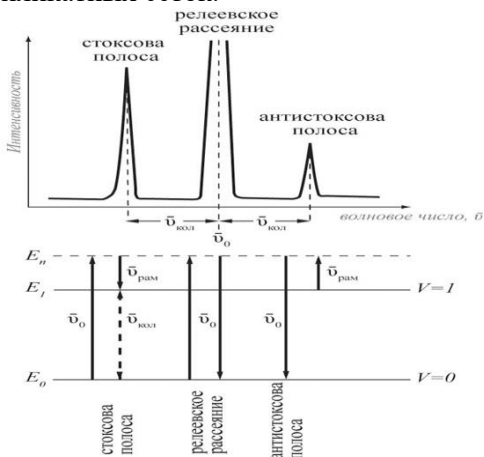


Рисунок 6 - Полосы спектра комбинационного рассеяния и соответствующие энергетические переходы

Спектроскопия КР является очень информативным методом для исследования наноматериалов, в частности, углеродных нанотрубок: можно определить их геометрические параметры, тип проводимости и т. д.

При нагревании веществ интенсивность антистоксовых линий КР заметно возрастает (в отличие от стоксовых), что позволяет использовать этот эффект для измерения температуры (разработаны соответствующие волоконно-оптические датчики).

При возбуждении КР источниками большой мощности вероятность стоксова рассеяния возрастает, и возникает вынужденное комбинационное рассеяние (ВКР). В волоконно-оптической связи широко используют ВКР усилители. ВКР лазеры позволяют получать мощное

когерентное излучение в спектральных диапазонах, в которых нет эффективных лазеров другого типа.

## **2.2 Темы для подготовки докладов**

1. Флуоресцентная диагностика.
2. Основные принципы и методы флуоресцентного анализа (FRAP, FLIM, FRET, FCS).
3. Рамановская спектроскопия. Принципы диагностики.
4. Применения рамановской спектроскопии в онкологии.

## **3 ОПТИЧЕСКАЯ МИКРОСКОПИЯ**

### **3.1. Теоретические основы**

Оптический микроскоп или световой микроскоп - это тип микроскопа, который использует видимый свет и систему линз для увеличения изображений небольших объектов. Простой микроскоп использует объектив или набор линз для увеличения объекта только с помощью углового увеличения, что дает зрителю вертикальное увеличенное виртуальное изображение. Увеличение, создаваемое одной линзой, составляет приблизительно  $25/f$ , где  $f$  - фокусное расстояние объектива в сантиметрах. Для повышения увеличения, фокусное расстояние должно быть уменьшено, что на практике требует, чтобы линза имела больший радиус кривизны. Лупа  $\times 10$  уже представляет собой луковичный кусок стекла и дает значительные дефекты формирования изображения.

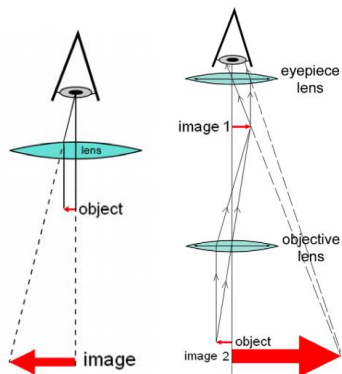


Рисунок 7 - Оптическая схема микроскопа

Комбинированный микроскоп использует две линзы. Линза рядом с объектом называется объективом. Она собирает свет, который фокусирует реальное изображение объекта внутри микроскопа (image 1). Вторая линза или группа линз (называемая окуляром), дает наблюдателю увеличенное перевернутое виртуальное изображение объекта (image 2), затем увеличивает это изображение. Использование комбинированной системы «объектив-окуляр» позволяет значительно увеличить изображение. Обычные комбинированные микроскопы часто имеют сменные объективы, позволяющие пользователю быстро регулировать увеличение. Комбинированный микроскоп также обеспечивает более качественные настройки освещения, такие как фазовый контраст.

Некоторые из современных микроскопов выполняют в тринокулярном исполнении. Тринокулярный микроскоп имеет два окуляра, например, бинокулярный микроскоп и дополнительную третью глазную трубку для подключения камеры микроскопа. Таким образом, они представляют собой бинокль с подвижным призматическим узлом, в котором свет направлен либо на бинокулярный узел микроскопа, либо на камеру. Лучшие модели этого микроскопа будут иметь по крайней мере три положения, позволяя 100% света

бинокулярному, 80% к камере и 20% к биноклю или просто 100% к камере.



Рисунок 8 – Микроскоп

Основные компоненты современного оптического микроскопа:

- Камера (1)
- Окуляр (окулярная линза)(2)

-

Объективная башня, револьвер или вращающаяся носовая часть (для крепления нескольких объективов) (3)

- Объективные линзы (4)
- Стадия (удерживать образец)(5)

-

Ручки фокусировки (для перемещения сцены): грубая регулировка (6), точная регулировка (7)

- Диафрагма и конденсатор (8)
- Источник света (свет или зеркало) (9).

### 3.2 Темы для подготовки докладов

1. Конфокальная микроскопия.
2. Поляризационная микроскопия.
3. Дифференциальная интерференционно-контрастная микроскопия.

4. Фазо-контрастная микроскопия.
5. Темнопольная микроскопия.
6. Флуоресцентная микроскопия.
7. Микроскопия сверхвысокого разрешения.

## **4 ЛАЗЕРНАЯ ХИРУРГИЯ**

### **4.1 Теоретические основы**

Применение лазеров в медицине в последние годы завоевало прочные позиции в самых различных областях медицины: диагностике, терапии и хирургии.

В лазерной хирургии используются весьма мощные лазеры, мощность излучения которых достаточна для удаления, разрушения или термического некроза клеток, тканей или иных объектов, подлежащих ликвидации. Методами лазерной хирургии являются:

- непосредственное удаление вещества (абляция),
- термо- или фотокоагуляция,
- сварка (соединение),
- дробление (с помощью ударной волны).

Лазеры, применяемые в медицине, очень разнообразны, что обусловлено сложным составом и разнообразием биологических тканей. Использование того или иного лазера определяется спецификой операции и зависит от спектральной поглощающей способности биологических тканей. Такие лазеры, как Ar-лазер, лазеры на красителях, Nd:YAG, Nd:YAG с удвоением частоты воздействуют преимущественно на гемоглобин, меланин и другие органические компоненты тканей, их действие основано на коагуляционном эффекте. CO<sub>2</sub> и Er:YAG (мкм) лазеры из-за высокого поглощения их излучения водой подходят для рассеечения ткани. ( $\lambda=2,9$  мкм).

Процесс нагревания ткани и температура, до которой она нагреется, зависят от следующих факторов:

- а) объемной плотности мощности поглощенного излучения  $Q$  [Вт/м<sup>3</sup>],

- б) эффективности перевода поглощенной энергии в тепло,
- в) времени облучения,
- г) теплоотода из области поглощения в прилежащие области за счет теплопроводности ткани,
- д) других типов теплоотода, в частности, кровотоком.

Биологические ткани вследствие своего сложного состава отличаются широким спектральным диапазоном показателя поглощения и, соответственно, глубины проникновения излучения. Глубина проникновения излучения  $l_{opt} \approx 1/\alpha$  изменяется от микронного диапазона (для жесткого УФ и дальней и средней ИК-области – Er:YAG, CO<sub>2</sub>-лазеры) до миллиметрового диапазона (видимая область) и сантиметрового диапазона (ближний ИК диапазон – Nd:YAG-лазер).

Размер слоя, прогретого за счет теплопроводности, составляет величину  $l_{терм} \approx 2\sqrt{\alpha\tau}$ . Длительность воздействия в различных медицинских приложениях меняется также в очень широких пределах: от наносекунд до десятков минут и даже больше. Соответствующие значения глубины проникновения энергии в ткань за счет теплопроводности в таком диапазоне длительностей воздействия изменяются от сотых долей микрона до нескольких сантиметров.

Таким образом, в зависимости от длины волны используемого излучения, может преобладать или оптический перенос энергии, глубина проникновения излучения в этом случае  $l_{opt} > l_{терм}$  (например, при облучении ткани излучением Nd:YAG-лазера  $\lambda=1,06$  мкм при длительности воздействия меньше минуты), или перенос энергии за счет теплопроводности – термический перенос энергии  $l_{opt} < l_{терм}$  (например, при использовании CO<sub>2</sub> лазера при длительности воздействия  $\tau > 1$ мс).

В терминах обычных лазерных технологий оптический перенос энергии соответствует «слабому поглощению» (см. раздел 3), а термический перенос энергии – «сильному поглощению» (по сравнению с теплопроводностными



явлениями). Для практических целей эти два случая отличаются тем, что при термическом переносе энергии возможно управление глубиной прогретого слоя изменением длительности воздействия, тогда как при оптическом переносе энергии толщина прогретого слоя определяется только показателем поглощения ткани.

При термическом переносе энергии вглубь материала, когда глубина проникновения света в материал  $\delta=1/\alpha$  ( $\alpha$  – показатель поглощения света) много меньше толщины прогретого слоя  $\sqrt{a\tau}$  ( $a$  – температуропроводность биоткани,  $\tau$  – длительность воздействия), температура биоткани на поверхности в центре облученной области определяется следующим образом:

- в неустановившемся режиме, при  $r_0 \gg \sqrt{a\tau}$

$$T = \frac{2q_0 A \sqrt{a\tau}}{k\sqrt{\pi}} + T_H, \quad (1)$$

- в стационарном режиме, при  $r_0 \ll \sqrt{a\tau}$

$$T = \frac{q_0 A r_0}{k} + T_H, \quad (2)$$

где  $q_0$  – плотность мощности падающего излучения,  $A$  – поглощательная способность биоткани,  $k$  – теплопроводность биоткани,  $T_H$  – начальная температура,  $r_0$  – радиус облученной области.

При оптическом переносе энергии вглубь материала, когда глубина проникновения света в материал  $\delta=1/\alpha$  больше толщины прогретого слоя  $\sqrt{a\tau}$ ,

- при  $r_0 \gg \sqrt{a\tau}$

$$T = \frac{q_0 A a \tau}{k\delta} + T_H, \quad (3)$$

- при  $r_0 \ll \sqrt{a\tau}$

$$T = \frac{q_0 A r_0^2}{4k\delta} \ln(19,4 \frac{a\tau}{r_0^2}) + T_H, \quad (4)$$

В живых биологических системах тепловая энергия из облученной области отводится не только путем теплопроводности, но и с потоком крови через сосудистую систему. В оценочных расчетах для учета теплоотвода принимают обычно следующую модель. Кровь с нормальной артериальной температурой поступает в облученный объем и

сразу же нагревается до локальной температуры в капиллярной области. Получаемая кровью тепловая энергия определяется удельной теплоемкостью составных частей крови:  $E=cm\Delta T$ ,  $c$  – средняя теплоемкость элементов крови. Кровь, текущая по венам, транспортирует эту тепловую энергию.

Поскольку учет теплоотвода кровотоком значительно усложняет теоретическую постановку задачи исследования локального нагревания ткани лазерным излучением, то имеет смысл каким-то образом определить, когда можно пренебречь влиянием теплоотвода кровотоком, а когда нельзя. При этом основной характеристикой является время воздействия излучения  $\tau$ . Если  $\tau$  меньше некоторой величины  $t^*$  то влияние кровотока можно не учитывать, так как оно мало, а если  $\tau > t^*$ , влияние теплоотвода кровотоком учитывать необходимо. Характерное время  $t^*$  есть время перфузии, то есть время, за которое заменяется вся кровь в ткани:

$$\tau_* = \frac{1}{v_* \rho}, \quad (5)$$

где  $\rho$  – плотность ткани,  $v_*$  – интенсивность кровотока в ткани.

Влияние кровотока на стационарное температурное распределение имеет значение только в том случае, если протяженность облученной области  $r_0$  больше, чем длина теплопроводности  $\sqrt{a\tau}$ . Если  $r_0 < \sqrt{a\tau}$ , то перенос тепла определяется преимущественно теплопроводностью.

Лазерное хирургическое воздействие может происходить как в абляционном, так и в субабляционном режиме. В последнем случае осуществляется достаточно мягкое воздействие при невысоких значениях мощности излучения и продолжительных экспозициях. Воздействие излучения приводит к нагреванию биоткани и последующей коагуляции ее в зоне воздействия.

Особенностью воздействия излучения на биоткань является то, что температура начала коагуляции белков зависит от времени, в течение которого ткань пребывает в нагретом состоянии, то есть от длительности воздействия

лазерного излучения. Значение температуры коагуляции можно определить из графика (см. рисунок 9).

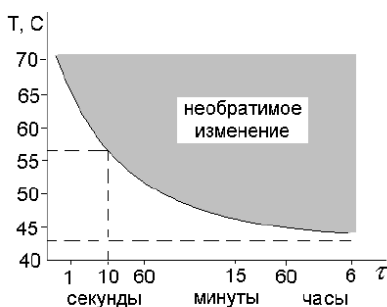


Рисунок 9 – Зависимость температуры, при которой происходят необратимые изменения в биоткани, от продолжительности нагрева

При расчете результатов лазерного нагрева ткани необходимо учитывать, что свойства ткани (в особенности оптические) изменяются в ходе процесса ее лазерного нагревания. В частности, показатель поглощения ткани увеличивается при коагуляции. В результате значения температуры, достигаемой в области воздействия вблизи поверхности, возрастают, а процесс нагрева становится нелинейным.

Температура, до которой нагревается биоткань при действии лазерного излучения, зависит от оптических свойств биоткани (поглощательная способность, глубина проникновения излучения в биоткань) и ее теплофизических свойств, определяющих эффективность преобразования полученной энергии в тепло и отведения ее из облученной области в результате теплопроводности.

В последние годы стали широко применяться лазерные эндоскопические операции. В частности, лазерное хирургическое лечение злокачественной опухоли производится путем введения зонда в ее центр, через который с помощью оптического волокна подается лазерное

излучение. Конец зонда излучает световую энергию равномерно во все стороны, что обеспечивается соответствующим видом излучающего торца световода. Требование равномерности излучения следует из необходимости получения сферической формы коагулированной области, характерной для опухоли печени. При этом используются достаточно продолжительные экспозиции, так как необходимым условием успешного проведения операции является не только коагуляция патологической ткани, но и категорическое требование отсутствия карбонизации (в наиболее горячей области – непосредственно рядом с наконечником световода). Распределение температуры в биоткани в соответствии с диаграммой направленности излучения от наконечника световода имеет сферическую симметрию и определяется зависимостью (исключая область  $r < \sqrt{at}$ , соответствующую области зонда):

$$T = \frac{P}{4\pi kr} \operatorname{erfc} \frac{r}{2\sqrt{at}} + T_H, \quad (6)$$

где  $P$  – мощность излучения,  $r$  – радиус в сферической системе координат, центр которой совпадает с центром симметрии распределения интенсивности излучения,  $T_H$  – начальная температура.

При расчете температуры можно воспользоваться таблицами функции интеграла вероятности  $\operatorname{erfc} z$  или использовать следующие приближения. Для малых значений аргумента:

$$\operatorname{erfc} z = 1 - \frac{2}{\sqrt{\pi}} z, \quad (7)$$

а для больших значений аргумента:

$$\operatorname{erfc} z = \frac{2}{\sqrt{\pi} z} \exp(-z^2). \quad (8)$$

Наиболее употребительными в лазерной хирургии являются Nd:YAG и CO<sub>2</sub>-лазеры. Nd:YAG-лазер по причине глубокого проникновения его излучения в биоткань применяется преимущественно для коагуляции ткани и остановки (или предупреждения) кровотечения. CO<sub>2</sub>-лазер используется как лазерный скальпель. Его излучение интенсивно поглощается молекулами воды, содержащейся в

ткани, показатель поглощения при этом на 3-4 порядка выше, чем для Nd:YAG-лазера. Поэтому при поглощении непрерывного излучения CO<sub>2</sub>-лазера биотканью происходит очень быстрый разогрев воды в тонком приповерхностном слое, а от нее и неводных компонентов ткани. В результате происходит абляция – как стремительное (взрывное) испарение тканевой воды и извержение паров воды и вместе с ними фрагментов клеточных и тканевых структур. В процессе абляции происходит формирование абляционного кратера. Вместе с перегретым материалом из ткани удаляется большая часть энергии. Вокруг кратера находится область нагретого материала довольно малой толщины. Соответственно, толщина области с термическими повреждениями материала также мала, порядка 50 мкм за пределами абляционного кратера. Такой характер процесса абляции позволяет предположить, что температура на поверхности ткани при абляции составляет величину около 150°С (испарение воды в условиях высокого давления).

Эти данные позволяют при расчете пренебрегать теплопроводностными явлениями и считать, что энергия лазерного излучения  $E$  расходуется на нагревание удаляемого объема ткани и абляцию:

$$E \cdot A = m(c(T_a - T_H) + L). \quad (9)$$

Применение в медицине эксимерных лазеров связано с малой глубиной проникновения излучения (до нескольких микрон), малой длительностью импульса (снижающей теплопроводностные явления) и механизмом поглощения их излучения, заключающемся в разрыве межмолекулярных связей при поглощении кванта излучения. В результате действие эксимерного лазера на биоткань приводит к так называемой «холодной абляции», когда тепловые явления практически отсутствуют. При этом толщина удаленного слоя определяется выражением

$$h_{\text{абл}} = \frac{1}{\alpha} \ln \frac{\varepsilon \alpha}{Q_{\text{кр}}}, \quad (10)$$

где  $Q_{\text{кр}}$  – удельная энергия абляции (на единицу объема),  $\alpha$  – показатель поглощения биоткани,  $\rho$  – плотность энергии импульса излучения на поверхности биоткани.

## 4.2. Практические задания

1. Определить диапазон скоростей сканирования пучка непрерывного лазерного излучения при диаметре пятна в фокусе  $d = 10$  мкм, если диапазон допустимых длительностей воздействия находится в диапазоне от 10 мс до 10 мкс.

2. Определить, какую скорость сканирования нужно выбрать, чтобы обеспечить время воздействия излучения на биоткань  $\tau = 10$  мс, при диаметре пятна  $d = 100$  мкм

3. Определить мощность Nd:YAG-лазера, необходимую для достижения плотности мощности  $Q = 10$  Вт/см<sup>3</sup> в приповерхностном слое кожи при проведении операции коагуляции кожного новообразования, если диаметр облученной области составляет 1 мм, показатель поглощения 5 см<sup>-1</sup>. Коэффициент отражения (включая диффузное отражение) принять равным 0,3.

4. Определить энергию, сообщенную биоткани при облучении ее поверхности импульсами излучения XeCl-лазера длительностью 10-8 с энергией 2 Дж при частоте следования импульсов 20 Гц в течение 1 с.

5. Определить толщину удаленного слоя при площади облученной области 1 см<sup>2</sup>, если известно, что глубина проникновения излучения 6 мкм, а порог абляции составляет 0,8 Дж/см<sup>2</sup>. Определить толщину удаленного слоя биоткани импульсом KrF-лазера (248 нм), если известно, что плотность энергии на поверхности составляет 5 Дж/см<sup>2</sup>, глубина проникновения излучения в биоткань – 2 мкм, а порог абляции – 0,5 Дж/см<sup>2</sup>.

6. Найти плотность мощности непрерывного излучения Ar и Nd:YAG-лазеров, необходимую для термокоагуляции мягкой ткани (температура коагуляции  $T = 42^\circ\text{C}$ ) при времени воздействия излучения 1 с, а также необходимую мощность и скорость сканирования пучка при радиусе облученной области  $r = 1$  мм.

7. Оценить, какая часть энергии, поступившей в кожу при облучении ее непрерывным лазерным излучением в

течение 3 минут, удаляется из области воздействия кровотоком, если кожа в области воздействия нагревается с 25°C до 60°C. Интенсивность кровотока принять равной 0,15 мл/мин·г.

8. Определить, во сколько раз плотность мощности излучения Ar-лазера на поверхности кожи должна быть больше плотности мощности излучения Nd:YAG-лазера, чтобы обеспечить одинаковую плотность мощности на глубине 1 мм.

9. Определить в пренебрежении теплопроводностью, какая температура будет достигнута на поверхности облучаемой кожи при воздействии Ar и Nd:YAG-лазеров непрерывного действия, если мощность выбрана такой, чтобы температура на глубине 1 мм достигала 60°C при начальном значении 25°C. Определить для каждого случая, возможна ли карбонизация поверхности.

10. Определить диапазон значений мощности излучения Kr-лазера (длина волны излучения 568 нм) для коагуляции новообразования на коже в дистанционном режиме, обеспечивающий температуру на поверхности облученной области в ее центре в диапазоне значений от температуры коагуляции до температуры карбонизации. Теплоотвод конвекцией не учитывать.

Исходные данные:

Глубина проникновения излучения в кожную ткань  $\delta = 0,5$  мм.

Температура карбонизации 150°C.

Температуропроводность кожи  $a = 1,2 \cdot 10^{-7}$  м<sup>2</sup>/с.

Теплопроводность кожи  $k = 0,45$  Вт/м·К.

Начальная температура  $T_H = 20^\circ\text{C}$ .

Поглощательная способность пигментированного новообразования до коагуляции  $A = 0,85$ , после коагуляции  $A = 0,9$ .

Поглощательная способность непигментированного новообразования до коагуляции  $A = 0,6$ , после коагуляции  $A = 0,8$ .

№ варианта задания	Длительность воздействия излучения $\tau$	Диаметр новообразования $d_0$	Характеристика новообразования
1	1 мин	1 мм	Непигментированное
2	1 мин	3 мм	Непигментированное
3	2 мин	1 мм	Непигментированное
4	2 мин	3 мм	Непигментированное
5	10 мин	3 мм	Непигментированное
6	1 мин	1 мм	Пигментированное
7	1 мин	3 мм	Пигментированное
8	2 мин	1 мм	Пигментированное
9	2 мин	3 мм	Пигментированное
10	10 мин	3 мм	Пигментированное

11. Определить время воздействия непрерывного излучения Nd:YAG-лазера при внутритканевой коагуляции опухоли печени с помощью световода, конец которого введен через зонд в центр опухоли. При решении задачи проанализировать необходимость учета влияния кровотока на теплоотвод из облученной области. При необходимости (если полученное время воздействия окажется больше времени перфузии  $* t$ , в данном случае 1 мин.) учесть влияние кровотока путем умножения значения температуры на поправочный коэффициент  $K = 0,8$ . При необходимости дать рекомендации по изменению мощности излучения.

Исходные данные:

Температуропроводность  $a = 1,5 \cdot 10^{-7}$  м<sup>2</sup>/с.

Теплопроводность  $k = 0,57$  Вт/мК.

Температура коагуляции 48°C.



Температура карбонизации  $150^{\circ}\text{C}$ .  
 Начальная температура  $HT = 37^{\circ}\text{C}$ .  
 Диаметр наконечника световода  $0\ d = 3\ \text{мм}$ .

№ варианта задания	Мощность излучения	Диаметр новообразования $d_0$
1	6 Вт	2 см
2	4 Вт	2 см
3	2 Вт	2 см
4	3 Вт	1 см
5	2 Вт	1 см
6	1 Вт	1 см
7	10 Вт	3 см
8	5 Вт	3 см
9	3 Вт	3 см
10	3 Вт	0,5 см

12. Определить мощность пучка лазерного излучения, необходимую для рассечения кожи непрерывным излучением  $\text{CO}_2$ -лазера в дистанционном режиме.

Исходные данные:

Плотность кожи  $\rho = 1 \cdot 10^3\ \text{кг/м}^3$ .

Теплоемкость кожи  $c = 4 \cdot 10^3\ \text{Дж/кг}\cdot\text{К}$ .

Температуропроводность кожи  $a = 1,2 \cdot 10^{-7}\ \text{м}^2/\text{с}$ .

Температура абляции  $T = 150^{\circ}\text{C}$ .

Удельная теплота абляции  $L = 2 \cdot 10^6\ \text{Дж/кг}$ .

Поглощательная способность кожи  $A = 0,8$ .

Начальная температура  $HT = 25^{\circ}\text{C}$ .

№ варианта задания	Характер воздействия излучения	Время воздействия $t, \text{с}$	Диаметр пучка $d_0, \text{мкм}$	Глубина абляции $h, \text{мкм}$
--------------------	--------------------------------	---------------------------------	---------------------------------	---------------------------------

1	Неподвижный источник	1	500	300
2	Неподвижный источник	2	400	500
3	Неподвижный источник	1	300	200
4	Сканирование на расстояние $l = 1$ см	2	500	300
5	Сканирование на расстояние $l = 2$ см	1	400	500
6	Сканирование на расстояние $l = 3$ см	1	300	200
7	Сканирование на расстояние $l = 1$ см	1	400	200
8	Сканирование со скоростью $V = 1$ см/с	1	400	500
9	Сканирование со скоростью $V = 1$ см/с	2	300	200
10	Сканирование со скоростью $V = 0,5$ см/с	3	300	300

## БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЕ ИСТОЧНИКИ

1. Тучин, В.В. Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях [Текст]/ В.В. Тучин. – Саратов: Изд-во Саратов. ун-та, 1998. -483 с. - ISBN 978-5-9221-1278-9
2. Федорова, О.А. Методы оптической спектроскопии (методическое пособие к задачам спецпрактикума кафедры химии нефти и органического катализа) [Текст]: учеб. пособие для вузов / Федорова О.А., Кулакова И.И., Сотникова Ю.А. и др.; под. ред. Кулакова И.И., Федорова О.А., Хорошитина А.В. –М.: Изд-во МГУ им. Ломоносова, 2015. -117 с.
3. Тимченко П.Е Спектроскопия рассеянного излучения [Текст]: учеб. пособие / П.Е. Тимченко, Е.В. Тимченко. – Самара. - М: Изд-во Самар. гос. аэрокосм. ун-та, 2015. – 88 с.
4. Губарев А.Ф. Микроскопические и эндоскопические исследования [Текст] / А.Ф. Губарев. – М: Изд-во ТГПУ, 2017. -10 с.
5. Вейко В.П. Лазерные технологии в задачах и примерах [Текст]: учеб. пособие для вузов / В.П. Вейко, Е.А. Шахно. – СПб.: Университет ИТМО, 2014. – 88 с.

*Учебное издание*

## **БИОФОТОНИКА**

*Методические указания к практическим работам*

Составители: Захаров Валерий Павлович  
Артемьев Дмитрий Николаевич

Самарский государственный национальный университет  
имени академика С.П. Королева» (Самарский университет)  
443086 Самара, Московское шоссе, 34