

**КВАНТОВО-КАСКАДНЫЕ ЛАЗЕРЫ В МЕДИЦИНЕ И БИОЛОГИИ (Обзор)****П. И. Абрамов<sup>1</sup>, Е. В. Кузнецов<sup>1</sup>, Л. А. Скворцов<sup>1\*</sup>, М. И. Скворцова<sup>2</sup>**

УДК 681.7.069.2;543.42;61

<sup>1</sup> АО НИИ “Полюс” им. М. Ф. Стельмаха,

117342, Москва, ул. Введенского, 3, корп. 1, Россия; e-mail: bereg@niipolyus.ru

<sup>2</sup> МИРЭА — Российский технологический университет, Москва, 119571, Россия

(Поступила 7 июня 2018)

Рассмотрены вопросы применения квантово-каскадных лазеров (ККЛ) в медико-биологической практике. Проведен сравнительный анализ методов лазерной спектроскопии для неинвазивной диагностики заболеваний по выдыхаемому воздуху, приведены примеры практической реализации этой идеи на базе ККЛ. Обсуждаются вопросы применения ККЛ в традиционной лазерной хирургии и лазерной ангиопластике. Особое внимание уделено рассмотрению терагерцового имиджинга мягких тканей, а также вопросам микроспектроскопии и созданию с ее помощью гиперспектральных изображений биоткани в среднем инфракрасном диапазоне. Сформулирован ряд проблем, связанных с применением ККЛ в медицине, а также указаны возможные направления перспективных исследований, где ККЛ могут сыграть решающую роль.

**Ключевые слова:** квантово-каскадные лазеры, мягкая биологическая ткань, инфракрасная спектроскопия поглощения, анализ дыхания, лазерный скальпель, лазерная ангиопластика, терагерцовый имиджинг, микроспектроскопия, инфракрасные гиперспектральные изображения, pump-probe технология.

*The problems of application of quantum-cascade lasers (QCLs) in biomedical practice are considered. A comparative analysis of laser spectroscopy methods for non-invasive diagnostics of diseases by exhaled air has been carried out; examples of the practical implementation of this idea based on QCL are given. The use of QCL in traditional laser surgery and laser angioplasty is discussed. Particular attention is paid to the consideration of terahertz imaging of soft tissues, as well as to the issues of microspectroscopy and the creation with its help of hyperspectral images of biological tissue in the middle infrared range. A number of problems associated with the use of QCL in medicine have been formulated, and possible directions for promising research, where QCL can play a decisive role, are indicated.*

**Keywords:** quantum cascade lasers, soft biological tissue, infrared absorption spectroscopy, breath analysis, laser scalpel, laser angioplasty, terahertz imaging, microspectroscopy, infrared hyperspectral images, pump-probe technology.

**QUANTUM-CASCADE LASERS IN MEDICINE AND BIOLOGY (Review)****P. I. Abramov<sup>1</sup>, E. V. Kuznetsov<sup>1</sup>, L. A. Skvortsov<sup>1\*</sup>, M. I. Skvortsova<sup>2</sup>** (<sup>1</sup> JSC Polyus Research Institute of M. F. Stelmakh, 3-1 Vvedenskogo Str., Moscow, 117342, Russia; e-mail: bereg@niipolyus.ru; <sup>2</sup> MIREA — Russian Technological University, Moscow, 119571, Russia)

\*Автор, с которым следует вести переписку.

## Содержание

*Введение.*

*Общие сведения о физических принципах работы квантово-каскадных лазеров.*

*Диагностика заболеваний путем анализа состава выдыхаемого воздуха.*

*Краткий обзор существующих методов.*

*Методы лазерной спектроскопии для анализа выдыхаемого воздуха.*

*Сравнительные характеристики методов спектрального анализа высокого разрешения, применяемых для анализа выдыхаемого воздуха.*

*Применение ИК квантово-каскадных лазеров в хирургии.*

*Лазерный скальпель.*

*Удаление атеросклеротических бляшек.*

*Формирование изображений срезов биоткани с помощью квантово-каскадных лазеров для диагностики онкологических заболеваний.*

*Терагерцовый имиджинг.*

*Формирование и анализ спектральных изображений в среднем ИК диапазоне спектра.*

*Заключение.*

*Литература.*

**Введение.** Развитие лазерной медицины идет по трем основным направлениям: лазерная хирургия, лазерная терапия и лазерная диагностика. Уникальные свойства лазерного луча позволяют выполнять ранее невозможные операции новыми эффективными и минимально инвазивными методами. При этом применение лазеров в медицине принципиально отличается от их применения в других областях прежде всего многоплановостью, комплексностью и разнообразием. Лазерная медицина включает в себя воздействие лазерного излучения на различные части тела, которые имеют свои свойства, как оптические (спектральные характеристики, коэффициент отражения, глубину проникновения излучения), так и теплофизические (теплопроводность, температуропроводность, теплоемкость), поэтому различается и характер воздействия на них лазерного излучения. Соответственно, в каждом случае необходимо выбирать индивидуальные параметры режима облучения: длину волны, длительность воздействия, мощность, частоту следования импульсов и т. д. Каждая ткань в силу биологической природы неоднородна, имеет сложную микроструктуру. В состав мягких тканей входит значительное количество воды, в состав костей — различные минералы, вследствие этого воздействие излучения с разными длинами волн на разные ткани различается как количественно, так и качественно.

В медико-биологических приложениях особое значение имеет избирательное (селективное) воздействие лазерного излучения на биологические ткани и молекулы, где выбор длины волны играет определяющую роль. До последнего времени в медицинской практике в основном использовались лазеры УФ и видимого диапазонов, а также CO<sub>2</sub>-лазеры среднего ИК диапазона. В то же время выраженные специфические особенности спектра поглощения молекул, входящих в состав биологической ткани или являющихся продуктами жизнедеятельности организма, имеются в среднем ИК и терагерцовом диапазонах [1—4]. Именно наличие характерных особенностей в спектре поглощения молекул позволяет осуществлять селективное воздействие на подверженные патологическим изменениям участки ткани, не затрагивая здоровые органы. Однако для этого необходимы источники лазерного излучения с узкой линией генерации, длины волн которых совпадают с отмеченными выше особенностями спектра поглощения молекул, а энергия кванта света достаточно мала, чтобы воздействие света на биоткань считать малоинвазивным. К сожалению, такие источники, пригодные для использования в практической медицине, до недавнего времени отсутствовали. Ситуация изменилась с появлением квантово-каскадных лазеров (ККЛ), диапазон длин волн которых перекрывает не только всю среднюю ИК (3—25 мкм, ИК ККЛ), но и терагерцовую область электромагнитного спектра, которой условно приписывают частотный интервал 300 ГГц—10 ТГц, или 1 мм—30 мкм (ТГц ККЛ) [5].

В настоящее время много публикаций посвящено применению ККЛ в медицине и биологии. Однако известные нам обзорные статьи в основном имеют отношение к неинвазивной диагностике заболеваний по выдыхаемому воздуху (ВВ) [2, 6—11]. В то же время относительно недавно были получены многообещающие результаты по применению ККЛ в традиционной лазерной хирургии (лазерный скальпель) и офтальмологии [12, 13], в хирургии атеросклеротических бляшек [14, 15]. Несомненную актуальность имеют исследования, направленные на получение изображений внутренних неоднородностей биологических тканей в разных участках электромагнитного спектра для гистологических исследований и диагностики онкологических заболеваний [16—20].

В настоящем обзоре проведен краткий сравнительный анализ современных лазерных спектроскопических технологий, без которых невозможно создать высокочувствительный газоанализатор ВВ для массового обследования населения, а также приведены примеры их практической реализации. Рассмотрены последние достижения, связанные с применением ККЛ в традиционной лазерной хирургии и ангиопластике. Особое внимание уделено таким направлениям, как терагерцовый и ИК гиперспектральный имиджинг мягких тканей, с которым связывают особые надежды по выявлению онкологических заболеваний на ранней стадии, а также новые схемные решения для его осуществления. Именно в этой области ККЛ, как ожидается, могут стать незаменимым инструментом.

**Общие сведения о физических принципах работы квантово-каскадных лазеров.** Вопросам, связанным с рассмотрением физических принципов работы ККЛ, посвящено значительное количество монографий, обзоров и оригинальных статей (см., например, [21—35]). Кратко отметим принципиальное отличие ККЛ от традиционных лазерных диодов и акцентируем внимание на уникальных свойствах излучения ККЛ, которые открывают новые возможности для решения ряда важных проблем в области обороны, безопасности, связи, экологического мониторинга и медицины.

Физические принципы, лежащие в основе работы ККЛ, существенно отличаются от принципов работы обычных полупроводниковых лазерных диодов. В отличие от традиционных полупроводниковых лазеров, в которых генерация фотона является результатом рекомбинации электрона и дырки (биполярный диод), в ККЛ используется только один тип носителей заряда (униполярный лазер) — электроны. Испускаемые ККЛ фотоны появляются в результате квантовых переходов электрона между энергетическими уровнями внутри квантовой ямы. В действительности эти уровни не существуют в полупроводниковых материалах, из которых состоит так называемая активная область лазера. Они создаются искусственно путем конструирования активной области из ультратонких слоев этих материалов, в результате чего она представляет собой набор чередующихся потенциальных барьеров и квантовых ям нанометровой толщины (сверхрешетка). Наложение дополнительного периодического потенциала сверхрешетки на потенциал кристаллического поля вызывает расщепление зоны проводимости на ряд разрешенных (минизона) и запрещенных подзон (минищель). Движение электронов в такой структуре происходит в пределах минизоны перпендикулярно границе раздела слоев. При этом энергия электронов, локализованных в квантовых ямах, квантуется и зависит от ее ширины и высоты потенциального барьера между соседними ямами, но не зависит от материала структуры.

В отличие от лазерного диода в ККЛ электрон остается в зоне проводимости после испускания фотона в результате перехода между энергетическими уровнями в квантовой яме. Поэтому электрон может повторно инжектироваться в идентичную соседнюю активную область, где он испускает другой фотон, и т. д. Для достижения этой каскадной эмиссии фотонов активные области должны чередоваться с легированными областями инжекции электронов. Так называемые каскады, в состав которых входят активная область и инжектор, порождают “энергетическую лестницу”, с которой “спускаются” электроны, излучая фотоны на каждой из “ступеней”, т. е. в каждом из каскадов. Количество каскадов, необходимых для реализации высокоэффективного ИК ККЛ, — 40 и более [24]. Этот каскадный эффект отвечает за очень высокие мощности излучения ККЛ по сравнению с традиционными биполярными лазерными диодами (>1 Вт), так как его квантовая эффективность намного превышает единицу. Отсюда и название — квантово-каскадные лазеры.

На рис. 1 показана типичная энергетическая диаграмма ККЛ, иллюстрирующая принцип его работы. Наклон в зоне проводимости обусловлен наличием приложенного электрического поля. В рассматриваемом примере активная область состоит из двух одинаковых квантовых ям, характеризующихся наличием трех квантованных энергетических состояний. Лазерный переход определяется разностью энергий между состояниями 3 и 2, которая обусловлена главным образом выбранной толщиной квантовых ям. Для получения лазерной генерации необходима инверсия населенностей между уровнями 3 и 2. Этим объясняется требование, чтобы время жизни уровня 3 было существенно больше, чем уровня 2. Для достижения этой цели самый низкий уровень 1 должен располагаться ниже уровня 2 на величину энергии оптического фонона. Выполнение перечисленных требований обеспечивает быстрое опустошение уровня 2 за счет взаимодействия электронов с оптическими фононами, в результате чего электроны оказываются в состоянии 1. Вследствие резонансного характера этот процесс происходит очень быстро и характеризуется временем релаксации  $\sim 0.1$ — $0.2$  пс. В свою очередь электроны на уровне 3 имеют существенно большее время жизни из-за относительно большого энергетического зазора между уровнями 3 и 2, поэтому процесс электрон-фононного взаимодействия в этом случае носит нерезонансный характер, а его вероятность крайне мала.

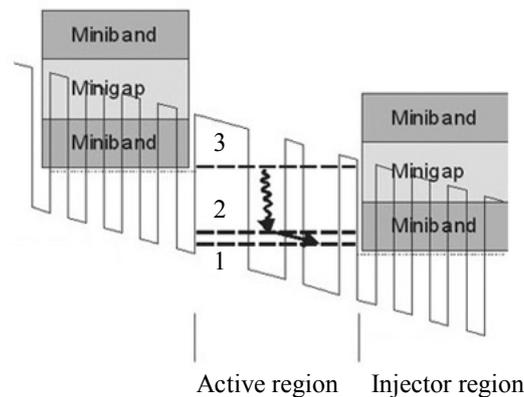


Рис. 1. Энергетическая диаграмма ККЛ с вертикальными переходами внутри одной квантовой ямы; в качестве материала квантового барьера используется тройной твердый раствор InAlAs, в качестве материала квантовой ямы — раствор InGaAs [25]

Для получения лазерной генерации необходимо также подавить нежелательную утечку электронов за счет туннелирования из состояния 3 в состояния, формирующие широкий квазиконтинуум. Утечка электронов приводит к уменьшению населенности верхнего уровня 3. Для предотвращения этого процесса перед следующим каскадом проектируется инжектор, представляющий собой сверхрешетку с низкой плотностью электронных состояний, в которой не существует резонансного электронного состояния, соответствующего энергии  $E_3$  верхнего уровня в квантовой яме. Таким образом, инжектор формирует минищель, которая блокирует переходы с верхнего лазерного уровня. При этом инжектор «настроен» так, что основной уровень электронов в нем совпадает с верхним рабочим уровнем в следующей за ним энергетической яме, когда приложенное напряжение увеличивается выше определенного значения. В этом случае электроны инжектируются на верхний лазерный уровень с помощью процесса, известного как резонансное туннелирование. Поэтому резонансное туннелирование можно рассматривать как своеобразную накачку ККЛ. Как следует из сказанного выше, использование эффектов резонансного туннелирования и проводимости по минищели позволяет связать активные зоны.

В принципиальном плане ККЛ представляет собой помещенную в волновод многослойную гетероструктуру, поперек которой пропускается электрический ток, т. е. перпендикулярно слоям. Структура состоит из чередующихся активных областей, в которых происходит излучение фотонов, и инжекционных областей, через которые носители резонансно туннелируют до следующей активной области. Такая каскадная конструкция лазера обеспечивает довольно простой способ увеличения выходной мощности одиночного прибора. Преодолевая каждый каскад, электрон испускает фотон. За проход через ККЛ один электрон испускает множество фотонов. Чем больше каскадов в ККЛ, тем больше фотонов испускает один электрон за проход. Следовательно, увеличение числа каскадов должно приводить к росту выходной мощности прибора и снижению порогового тока генерации.

На рис. 2 представлена конструкция полоскового ИК ККЛ с указанием характерных размеров. Конечно, существуют и другие, более сложные конструкции активной зоны, однако их анализ выходит за рамки настоящего обзора. Например, в последние несколько лет значительно улучшились характеристики ИК ККЛ (более низкий порог генерации и высокая мощность излучения при комнатной температуре) за счет введения в дизайн гетероструктуры ИК ККЛ так называемого двойного фононного резонанса [26]. Активная область такого лазера имеет уже четыре квантовые ямы и три энергетических состояния, одинаково удаленных друг от друга на величину энергии оптического фона, вместо рассмотренных выше двух уровней. Такой дизайн активной области приводит к большей инверсии населенности, поскольку электроны более эффективно удаляются из нижнего состояния лазерного перехода. Существенное увеличение мощности и снижение порогового тока ИК ККЛ достигаются использованием активной области с набором квантовых ям и барьерных слоев с плавно изменяющимся периодом [27]. В дальнейшем предложено использовать лазеры с дизайном активной области «bound-to-continuum», т. е. с излучательным переходом электронов из связанных состояний в квантовой яме в состояния непрерывного спектра минищели. Такой дизайн дает возможность изго-

тавливать ИК ККЛ с большими коэффициентами усиления в более широкой области частот, что имеет значение для расширения полосы перестройки ИК ККЛ [28].

На сегодняшний день ИК ККЛ являются единственными полупроводниковыми лазерами в среднем ИК диапазоне спектра, которые могут работать при комнатных температурах. В общем случае ИК ККЛ могут быть трех типов: лазеры с резонатором Фабри—Перо, работающие в многомодовом режиме; лазеры с распределенной обратной связью (РОС-ККЛ); лазеры с внешним резонатором (ВР-ККЛ). Последние два типа представляют собой одномодовые источники излучения с возможностью перестройки длины волны генерации, что делает их особенно привлекательными для спектроскопических исследований [3, 5].

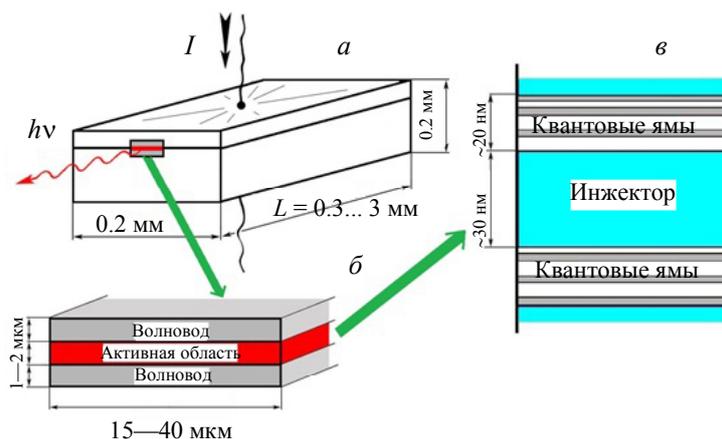


Рис. 2. Типичная конструкция полоскового ИК ККЛ с указанием характерных размеров активного элемента (а), активной области (б) и элементов гетероструктуры (каскада) [25]

Что касается терагерцовых (ТГц) ККЛ, то в частотном диапазоне 2—5 ТГц они фактически являются единственным типом твердотельных источников когерентного электромагнитного излучения с мощностью в области милливаттных значений. ТГц ККЛ делятся на прямые (инверсные) и безынервные, использующие эффект генерации разностной частоты. Последние обладают возможностью перестройки частоты излучения в достаточно широком интервале 1.4—5.9 ТГц и работают при комнатной температуре, однако имеют низкую мощность излучения  $\sim 0.2$  мВт, что затрудняет их применение для большинства практически значимых приложений [29]. Прямые ТГц ККЛ с резонатором Фабри—Перо работают на фиксированной частоте при криогенных температурах и генерируют относительно большую мощность излучения, которая может достигать  $\sim 100$  мВт [30]. Область перестройки одномодового прямого ТГц ККЛ (ТГц ВР-ККЛ) составляет лишь несколько процентов от центральной линии генерации [31].

На рис. 3 представлены энергетическая диаграмма прямого (с инверсной населенностью) ТГц ККЛ и его активная область с волноводной структурой. Отметим, что обычные диэлектрические волноводы, как в ИК ККЛ, не подходят для ТГц лазеров вследствие больших потерь из-за поглощения на свободных носителях и практических ограничений на толщину эпитаксиального роста. На сегодняшний день при изготовлении ТГц ККЛ применяют два типа волноводов — плазмонный и металлический. Второй тип (двойной металлический волновод) обеспечивает более сильную локализацию поля внутри волновода (М-М-волновод).

Наибольшие успехи достигнуты при использовании структур, содержащих в активной зоне две квантовые ямы, с инверсией населенности, основанной на резонансном испускании (за время  $< 1$  пс) продольного оптического (LO) фонона, что позволяет селективно уменьшать населенность нижнего уровня [32]. Кроме того, использование волновода с металлом по обеим сторонам активной части структуры позволило обеспечить высокое модовое ограничение и получить резонатор с малыми потерями для ТГц лазера.

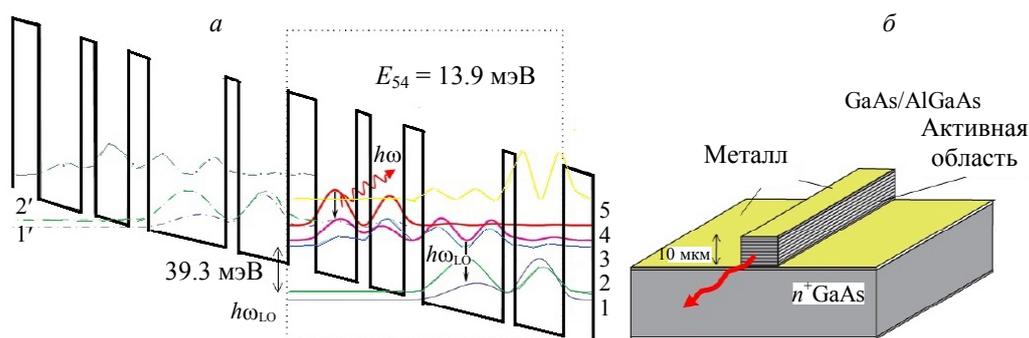


Рис. 3. Энергетическая диаграмма прямого (с инверсной населенностью) ТГц ККЛ (а) и его активная область с волноводной структурой типа металл—металл (б); рабочий переход 5—4 с каналом опустошения основного уровня резонансными LO-фононами [32]

**Диагностика заболеваний путем анализа состава выдыхаемого воздуха. Краткий обзор существующих методов.** Определение микросостава ВВ относится к наиболее сложным аналитическим задачам. Традиционно в высокочувствительном анализе газовой среды преобладали газовая хроматография (ГХ), масс-спектрометрия, совмещенная с газохроматографическим разделением (МС-ГХ), спектрометрия ионной подвижности, техника протонной масс-спектрометрии на основе реакции переноса протона (РПП/МС) [1]. Перечисленные аналитические методы обладают высокой чувствительностью и селективностью, что обеспечивает возможность детектирования следовых количеств исследуемого вещества в многокомпонентной газовой среде при наличии мешающих интерферентов. Для полноценной работы эти методы требуют заметных затрат времени на сбор пробы, преконцентрацию и транспортировку пробы к анализатору, что делает невозможным проведение с их помощью оперативного анализа в режиме реального времени. Кроме того, большинство из них требуют сложного в обслуживании, дорогого и громоздкого оборудования, что существенно ограничивает область их применения. Альтернативные недорогие устройства, такие как термохимические миниатюрные датчики (пеллисторы), полупроводниковые или электрохимические датчики, обеспечивают чувствительность в диапазоне малых концентраций, но не обладают требуемой селективностью.

Помимо физико-химических методов исследования существуют различные спектральные методы, такие как УФ-хемолуминесценция и ИК спектроскопия. Последняя объединяет в себе ИК-фурье-спектроскопию, фотоакустическую и лазерную спектроскопию. Благодаря появлению на рынке ККЛ с их уникальными возможностями спектральные методы в последнее время привлекают пристальное внимание исследователей для создания на их основе компактных устройств для анализа состава ВВ в режиме реального времени.

**Методы лазерной спектроскопии для анализа выдыхаемого воздуха.** Общая характеристика методов лазерной спектроскопии, используемых при анализе газовой среды. Данный подход основан на совпадении частот лазерных переходов с частотой линии поглощения исследуемого газа. Лазерная спектроскопия в ИК диапазоне принадлежит к числу наиболее чувствительных и в то же время селективных аналитических методов, используемых для детектирования молекул в газообразной среде, которые позволяют создать на их основе компактные средства высокочувствительного анализа газовой среды в реальном масштабе времени [33—41]. Этим обусловлена актуальность ее применения для высокочувствительного спектрального анализа состава ВВ. Ниже представлен краткий анализ современных методов, технологий и достижений в области лазерной спектроскопии, позволяющий оценить перспективность и возможные области ее использования в биомедицинской диагностике, основанной на детектировании следов газообразных молекул-биомаркеров в ВВ.

Среди спектральных методов регистрации следов веществ в ВВ наибольшее распространение на практике получили методы, основанные на измерении поглощения лазерного излучения. Эти методы условно можно разбить на две группы.

1. Методы абсорбционной лазерной спектроскопии, регистрирующие изменение интенсивности или фазы лазерного излучения при прохождении им мнопроходной ячейки или лазерного резонатора. Это прямые методы измерений, достоинство которых — возможность прямых измерений абсолютных плотностей поглощающих состояний частиц без привлечения дополнительных измерений,

если свет не вызывает насыщение перехода. Знания механизмов заселения и распада уровней в этом случае не требуется.

2. Фототермические методы, в частности метод фотоакустической спектроскопии (ФАС), основанный на генерации в замкнутой ячейке акустических волн при поглощении в ней лазерного излучения. Эти методы являются альтернативой прямым методам измерений коэффициента поглощения, когда регистрируется изменение того или иного параметра объекта, вызванное проходящим через него светом. В противоположность прямым методам линейной абсорбции используются явления, определяющие поведение возбужденного состояния, например, нагрев объекта при безызлучательной релаксации. В этом случае тем или иным способом могут измеряться изменения температуры (фототермическая радиометрия) или связанные с этим колебания плотности среды (фотоакустическая спектроскопия) [38].

Используемые для детектирования следовых концентраций молекул в ВВ оптические методы, как правило, основаны на различных модификациях абсорбционной лазерной спектроскопии. Все чаще для этой цели используются лазеры с перестраиваемой частотой излучения, что дает возможность более гибкого анализа слабых атомных и молекулярных переходов, особенно для многокомпонентных сред, в которых идентификация исследуемой примеси в присутствии интерферентов возможна при наличии в интегральном спектре поглощения нескольких характерных для нее фрагментов [34, 35]. Кроме того, использование перестраиваемых лазеров позволяет детектировать за один процесс измерений несколько характерных для диагностируемого заболевания маркеров, что существенно повышает достоверность анализа.

*Выбор спектрального диапазона.* С точки зрения выбора спектрального диапазона для проведения высокочувствительного газового анализа важно отметить следующее. Детектирование молекул с полосами поглощения, обусловленными водородными связями, предпочтительно в ближней ИК области, где располагаются их обертоны (обычно это легкие двух-, трехатомные молекулы, например, молекула HF). В то же время в средней ИК области  $2500\text{--}1100\text{ см}^{-1}$  ( $4\text{--}9\text{ мкм}$ ) находятся фундаментальные полосы поглощения, связанные с колебательно-вращательными переходами практически всех известных молекул-маркеров заболеваний (рис. 4).

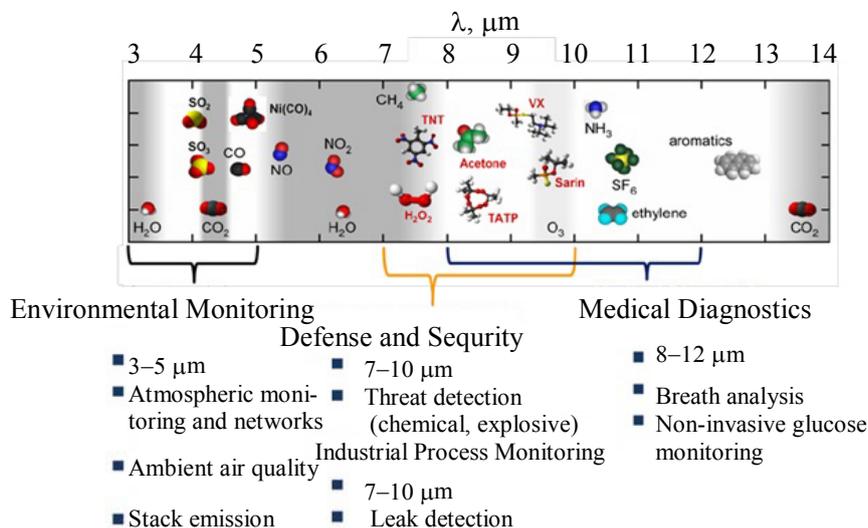


Рис. 4. Спектры поглощения молекул в средней ИК области [39]

Сечение поглощения лазерного излучения в этих полосах на 2—4 порядка выше, чем для полос поглощения, образуемых составными колебаниями и обертонами основных переходов в ближнем ИК диапазоне [1]. Несмотря на преимущества инъекционных лазеров на основе бинарных соединений типа  $A^3B^5$ , обусловленные более высокой степенью развития технологии их изготовления и возможностью работы при комнатных температурах, для получения наибольшей концентрационной чувствительности анализа предпочтительно использование среднего ИК диапазона или униполярных ККЛ на основе пары тройных твердых растворов InGaAs/InAlAs на подложке InP, тем более что они также

работают при комнатных температурах, обладают узкой линией генерации и широкой полосой плавной перестройки. Это крайне важно при анализе многокомпонентных сред, когда необходимо учитывать возможную интерференцию (наложение) спектров поглощения изучаемой молекулы и других компонентов анализируемой газовой среды. При исследовании атмосферного воздуха основное внимание обращается на поглощение воды, имеющей в ИК диапазоне интенсивные и достаточно широкие полосы поглощения. Анализ ВВ проводят в так называемых окнах или микроокнах прозрачности атмосферы.

**Сравнительные характеристики методов спектрального анализа высокого разрешения, применяемых для анализа ВВ.** Диодная лазерная абсорбционная спектроскопия (TDLAS) представляет собой оптический метод, сочетающий традиционный спектральный метод измерения поглощения с перестраиваемыми диодными лазерами [40, 41]. При использовании ККЛ обычно говорят о методе QC-TDLAS. Необходимые чувствительность, селективность и точность анализа в этом случае реализуются за счет высокоточного измерения резонансного поглощения лазерного излучения внутри контура отдельных линий колебательно-вращательных спектров молекул.

Для высокоточного спектрального анализа существенно, чтобы используемый полупроводниковый лазер работал в одночастотном режиме, т. е. все его излучение приходилось преимущественно на одну продольную моду резонатора. В случае лазеров с резонатором типа Фабри—Перо такой режим достигается за счет создания специальных структур с распределенной обратной связью (РОС), распределенными брэгговскими отражателями [42] или путем создания внешнего резонатора с дисперсионным элементом (ВР-ККЛ), в качестве которого используется дифракционная решетка. Чаще всего для этой цели применяются лазеры с внешним резонатором, так как они обеспечивают наибольший диапазон плавной перестройки длины волны генерации. Приемлемым для спектральных и аналитических исследований считается подавление неосновных лазерных мод  $>40$  дБ [1, 2].

В методе TDLAS исследуемая газообразная среда содержится в ячейке, а детектор регистрирует интенсивность прошедшего лазерного излучения во время частотного сканирования контура линии поглощения газа. Соотношение между интенсивностью лазерного излучения на входе ячейки  $I_0$  и интенсивностью на ее выходе  $I$  выражается законом Бугера—Ламберта—Бера:

$$I(\nu) = I_0(\nu)e^{-\alpha(\nu)L}. \quad (1)$$

Здесь  $L$  — длина оптического пути;  $\alpha(\nu)$  — коэффициент поглощения на частоте  $\nu$ , связанный с сечением поглощения  $\sigma(\nu)$ :

$$\alpha(\nu) = \sigma(\nu)n, \quad (2)$$

где  $n$  — концентрация исследуемых молекул в газообразной среде (молек./см<sup>3</sup>). Во многих случаях форма линии поглощения с центральной частотой  $\nu_0$  зависит от давления и температуры газовой среды. Поэтому количественно поглощение более точно определяется путем интегрирования коэффициента поглощения по всему контуру линии. Тогда суммарное поглощение  $A$  за один проход:

$$A = L \int_0^\infty \alpha(\nu) d\nu = nL \int_0^\infty \sigma(\nu) d\nu = SnL, \quad (3)$$

где  $S$  — интенсивность линии, определяемая как  $S = \int_0^\infty \sigma(\nu) d\nu$ .

Интенсивность линий спектральных переходов для многих молекул, являющихся биомаркерами для диагностируемых заболеваний, хорошо известна [43]. Путем преобразования выражения (1) можно показать, что предел обнаружения в терминах минимума поглощения  $A_{\min}$  определяется минимальным значением детектируемого изменения нормированной интенсивности лазера  $\Delta I/I_0$ , где  $\Delta I = I_0 - I$ . Стабильность источника света и электронный шум детектора обычно обеспечивают  $A_{\min} \approx 10^{-2} - 10^{-4}$  [8].

По сравнению с прямым измерением разности интенсивностей  $\Delta I$  измерения с помощью техники диодной спектроскопии TDLAS часто выполняются с использованием метода детектирования гармоник, называемого TDLAS-WM/FM [44]. В последнем случае за счет модуляции длины волны или частоты излучения обеспечивается лучшее отношение сигнал/шум, что позволяет достигать более низкие пределы детектирования  $10^{-4} - 10^{-6}$  [8].

Если в методе TDLAS-WM/FM применяется многопроходная газовая ячейка, например ячейка Херриотта, то достигаемый предел детектирования может быть еще ниже. Ячейка Херриотта (рис. 5) представляет собой многопроходную оптическую полость, состоящую из двух вогнутых сферических зеркал, разделенных фиксированным расстоянием. Через отверстие в одном из зеркал лазерный

луч вводится в ячейку под небольшим углом к ее оси. При соответствующей юстировке ячейки луч после нескольких проходов через ячейку выходит из нее под углом, отличным от угла входа через то же отверстие. Использование ячейки Херриотта дает возможность увеличить эффективную длину пути по сравнению с длиной ячейки более чем в 100 раз, что позволяет технике TDLAS-WM/FM достичь предела детектирования  $\sim 10^{-8}$  [8].

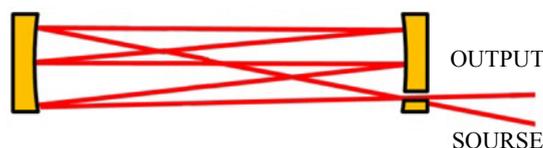


Рис. 5. Схематический вид многопроходной ячейки Херриотта [45]

Область перестройки лазера должна включать в себя полосы поглощения молекул-биомаркеров, подлежащих обнаружению. Отклик мишени на лазерное воздействие в виде изменения интенсивности лазерного излучения, прошедшего через кювету, регистрируется с помощью быстродействующего фотоприемника, чувствительного в средней ИК области спектра. При варьировании длины волны лазера в пределах линии поглощения исследуемого биомаркера изменяется соотношение между поглощенной и падающей энергией лазерного излучения. При этом наилучшие результаты в определении концентрации газовых компонентов в многокомпонентной среде дает метод дифференциального поглощения (ДП) [34], основанный на явлении резонансного поглощения лазерного излучения внутри контура линии поглощения исследуемого газа. Концентрация газа вычисляется с использованием сигналов, измеренных на двух близко расположенных длинах волн, одна из которых находится внутри линии поглощения  $\lambda_1$  ( $\lambda_{on}$ ), а другая  $\lambda_2$  ( $\lambda_{off}$ ) вне ее. В свою очередь сопоставление спектральной зависимости обработанного с помощью специальных алгоритмов сигнала ДП с данными библиотеки спектров, например HITRAN, позволяет выявить и идентифицировать молекулу-биомаркер.

Поскольку резонансное поглощение обладает наибольшим сечением среди всех процессов взаимодействия лазерного излучения с молекулами газовой среды ( $\sigma_{рез} \sim 10^{-17}$  см<sup>2</sup>; для сравнения: сечение поглощения обертонами  $\sigma_{об} < 10^{-19}$  см<sup>2</sup>, сечение комбинационного рассеяния  $\sigma_{кр} \sim 10^{-27}$  см<sup>2</sup>), лазерные комплексы, в основе работы которых лежит метод ДП, обладают наибольшими чувствительностью и быстротой газоанализа [1, 34, 35]. Поэтому вполне естественно, что задача, связанная с созданием средств оперативного (on-line) газового анализа, наиболее эффективно должна решаться на основе ДП-технологий, зарекомендовавших себя в экологическом мониторинге.

Упрощенная схема газового анализатора с многопроходной ячейкой представлена на рис. 6.

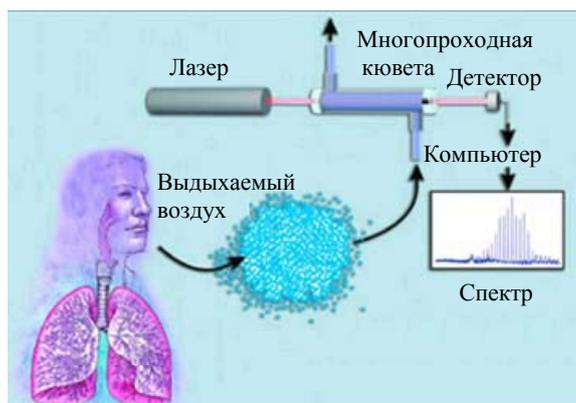


Рис. 6. Упрощенная схема газового анализатора с многопроходной ячейкой [46]

*Спектроскопия CRDS.* Среди лазерных методов спектрального анализа газов в настоящее время активно развивается спектроскопия внутрирезонаторного затухания (CRDS), основанная на измерении времени затухания излучения [47]. Этот принцип положен в основу оптических схем измерений поглощения, где спектр выявляют по амплитуде или фазе излучения в резонаторе.

Упрощенная схема газового анализатора, работа которого основана на использовании спектроскопии CRDS, представлена на рис. 7.

Метод CRDS обладает высокой чувствительностью благодаря многократным проходам лазерного луча внутри пассивного резонатора (эффективная длина пути до нескольких километров). Метод обычно используется с высокостабильным одночастотным источником лазерного излучения. В CRDS лазерный луч вводится через одно торцевое зеркало оптической полости, где инжектированный свет остается “запертым” между зеркальными поверхностями. Интенсивность света в полости экспоненциально убывает со скоростью, определяемой потерями лазерного излучения за два прохода. Эти потери, как правило, обусловлены конечной отражательной способностью зеркал резонатора, оптическим поглощением и/или рассеянием. Время затухания излучения в резонаторе (постоянная затухания) регистрируется фотодетектором, расположенным за вторым зеркалом. Величина поглощения в технологии CRDS выводится из скорости “утечки” импульса из полости резонатора, т. е. времени затухания импульса, делая метод не восприимчивым к флуктуации интенсивности источника света.

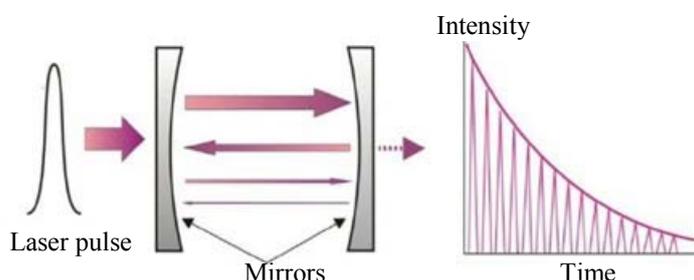


Рис. 7. Схема, иллюстрирующая принцип метода CRDS [48]

В отсутствие поглощения в ячейке время затухания излучения  $\tau_0$  определяется скоростью света  $c$ , отражательной способностью зеркала  $R$  и расстоянием между зеркалами  $d$  [8]:

$$\tau_0 = d/c(1 - R). \quad (4)$$

Если газ заполняет оптическую полость, т. е. присутствуют дополнительные потери, связанные с поглощением, то время затухания находится из уравнения:

$$\tau_0 = d/[c(1 - R + \sigma(\nu)nd)]. \quad (5)$$

Таким образом, для определения поглощения в исследуемой газовой среде отдельно измеряется время затухания при наличии поглощения ( $\tau$ ) и без него ( $\tau_0$ ). Тогда поглощение исследуемого газа рассчитывается по формуле [8, 47]:

$$A = \sigma(\nu)nl = d/c(1/\tau - 1/\tau_0). \quad (6)$$

С помощью (4) и (5) уравнение (6) можно изменить:

$$\sigma(\nu)nl = (1 - R)\Delta\tau/\tau, \quad \Delta\tau = \tau_0 - \tau. \quad (7)$$

При наличии зеркал с коэффициентом отражения в ближней ИК области  $R = 99.9985\%$  и при относительной погрешности измерений  $\Delta\tau/\tau \sim 10^{-3}$  предел детектирования метода CRDS  $\sim 10^{-8}$  [8].

*Разновидности метода CRDS.* Принцип CRDS положен в основу оптических схем измерений, в которых спектр поглощения выявляется по амплитуде или фазе излучения на выходе из резонатора (фазовый метод построен на сопоставлении сдвига фазы модулированного по амплитуде излучения на выходе из объекта с фазой излучения, падающего на объект). Среди этих схем следует отметить спектроскопию интегрального внутрирезонансного выхода (ICOS) [49—52], усиленную внутрирезонаторную абсорбционную спектроскопию (CEAS) [48, 53] и абсорбционную спектроскопию утечки излучения из полости резонатора (CALOS) [54—58]. Перечисленные оптические схемы измерений поглощения представляют собой разновидности оригинальной технологии CRDS и используют для повышения чувствительности одну и ту же многопроходную схему измерений. Наиболее популярна схема, в которой применяются непрерывные лазеры и анализ проводится по изменениям интенсивности излучения на выходе из резонатора при перестройке частоты. При этом регистрируется уже не затухание света на каждой длине волны, а интегральный сигнал, поэтому метод получил название

“спектроскопия интегрального внутрирезонаторного выхода” (ICOS). Поглощение, измеряемое с помощью этих методов, при коэффициенте отражения, близком к единице ( $R \approx 1$ ), определяется выражением [8, 48]:

$$A = (1 - R)\Delta I/I_0. \quad (8)$$

Сравнивая (7) и (8), видим, что методы ICOS или CEAS и CALOS характеризуются такой же чувствительностью, как и CRDS.

Общей проблемой для метода CRDS и перечисленных выше его версий оказывается согласование пространственных профилей пучков и частот падающего на ячейку излучения с собственными модами резонансных ячеек. Особую остроту она приобретает в случае аксиальных схем, когда резонансы ячейки соответствуют максимально добротным модам  $TEM_{mn}$  с малыми значениями  $n$  поперечных индексов, при этом случайные рассогласования могут вызывать флуктуации интенсивности прошедшего через ячейку регистрируемого сигнала вплоть до значений, близких к 100 % [59]. Предлагались разные способы уменьшения влияния этих флуктуаций. Наиболее очевидный из них — длительное накопление регистрируемого сигнала. Однако в этом случае помимо снижения быстродействия системы регистрации поглощения результат ограничен погрешностью, связанной с долговременной нестабильностью интенсивности зондирующего излучения либо с дрейфом регистрирующей системы в целом. Для уменьшения времени усреднения флуктуаций, обусловленных согласованием излучения с собственными модами резонатора, применяют модуляцию длины резонатора пьезокерамикой [60]. Еще один способ основан на отказе от аксиального ввода излучения в ячейку. В этом случае используются моды ячеек с большими поперечными индексами  $n$ , имеющие плотную сетку собственных частот [61]. При этом эффекты рассогласования заметно подавляются, но ослабляются резонансные свойства ячейки, по которым она становится близкой к классическим ячейкам. Одновременно с этим интенсивность регистрируемого излучения оказывается существенно меньше, чем в схеме с осевым вводом излучения [62].

Таким образом, проблема подавления флуктуаций известна давно, но не имеет пока удовлетворительного решения. В работе [63] предложена идея подавления флуктуаций за счет использования комбинаций сигнала, полученного методом ICOS, с сигналом отраженного от резонатора света (метод R-ICOS). Это позволило повысить устойчивость оптической системы к внешним возмущениям, однако зарегистрировать спектры слабого поглощения не удалось. Причина этого установлена в [64]: резкое несоответствие ширины лазерной линии ширинам мод резонатора. Авторы заявляют, что после устранения этого несоответствия были зарегистрированы спектры слабого поглощения с большим отношением сигнал/шум.

*Фотоакустическая спектроскопия* (ФАС) принципиально отличается от описанных выше методов измерения малых поглощений. В ее основе лежит фотоакустический эффект, суть которого заключается в следующем [65—68]. Образец, размещенный в специальной ячейке, облучают модулированным лазерным излучением, которое полностью или частично поглощается в образце, вызывая его нагрев. Выделяющееся тепло передается находящейся в фотоакустической ячейке газовой среде, что приводит к периодическому изменению давления. Возбуждаемые таким образом акустические волны регистрируются высокочувствительным микрофоном, встроенным в ячейку (рис. 8).

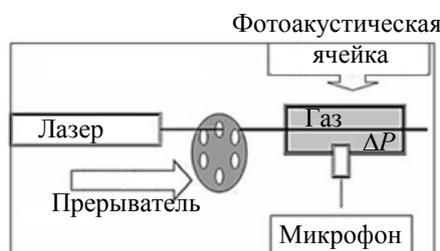


Рис. 8. Схематическое представление фотоакустического метода [67]

ФАС — один из наиболее чувствительных методов газового анализа [69, 70]. Это обусловлено тем, что ФАС относится к категории так называемых “нулевых методов”, в которых регистрируемый сигнал пропорционален концентрации исследуемого вещества. ФАС обладает преимуществами при детектировании тех газообразных веществ, которые имеют линии поглощения, хорошо совпадающие

с линиями генерации ККЛ среднего ИК диапазона. В целом фотоакустическое детектирование обладает низким пределом обнаружения, хорошим временным разрешением и достаточной селективностью, чтобы различать газы. В оптимальных условиях предел детектирования может составлять  $\sim 10$  ppb при быстрейшем в несколько секунд [71, 72]. Кроме того, не требуется аккумулировать и обогащать исследуемое вещество, так как достаточно небольшого объема газовой пробы ( $\sim 10$  мл). При этом исследуемый газ можно непрерывно прокачивать через фотоакустическую ячейку.

Предел обнаружения молекул газа (по поглощению)  $A_{\min}$  для метода ФАС можно выразить согласно [73]:

$$A_{\min} = \alpha(\nu)L = P_{\min}L/cW_L, \quad (9)$$

где  $P_{\min}$  — минимальный детектируемый фотоакустический сигнал (звуковое давление);  $L$  — длина акустической ячейки (длина поглощения лазерного излучения);  $W_L$  — мощность лазерного излучения;  $c$  — коэффициент преобразования поглощенной мощности в акустический сигнал для данной ячейки.

Минимальное регистрируемое звуковое давление при чувствительности типичного ФАС-микрофона  $\sim 100$  мВ/Па находится в диапазоне  $P_{\min} = 10^{-5}—10^{-7}$  Па. При постоянной  $c = 1750$  Па·см/Вт и длине пути поглощения 10 см предел обнаружения системы для рассматриваемого метода имеет порядок  $A_{\min} = 10^{-6}—10^{-8}$  при мощности лазера 1 Вт [73]. При использовании новых подходов к решению проблем, связанных с фоновыми шумами, конструкцией ячейки ФАС, чувствительностью детектора и методами обработки сигналов, предел обнаружения может быть уменьшен до  $10^{-7}—10^{-9}$  [73]. Другими словами, в зависимости от типа газа следовые количества молекул с помощью метода ФАС могут быть обнаружены на уровне ppt–ppb. Более подробная информация о результатах исследований по локальному обнаружению следовых количеств вещества в газовой фазе методом ФАС содержится, например, в обзоре [74].

В последнее время уделяется внимание развитию фотоакустических систем (QEPAS) с чувствительным элементом в виде настраиваемого кварцевого камертона, которые рассматриваются как перспективные устройства для детектирования следов химических соединений [75]. В QEPAS-системах энергия акустических волн, возникающих в результате поглощения лазерного излучения в газовой среде, поглощается в узкополосном акустическом преобразователе, когда акустическая волна находится в резонансе с собственной частотой кварцевого камертона. Кроме того, появились фотоакустические газоанализаторы на основе микроэлектромеханических систем (МЭМС), в которых МЭМС-микрофоны кантилеверного типа с оптическим считыванием позволяют увеличить чувствительность и динамический диапазон измерений примерно на порядок по сравнению с конденсаторными микрофонами [76, 77] (рис. 9).

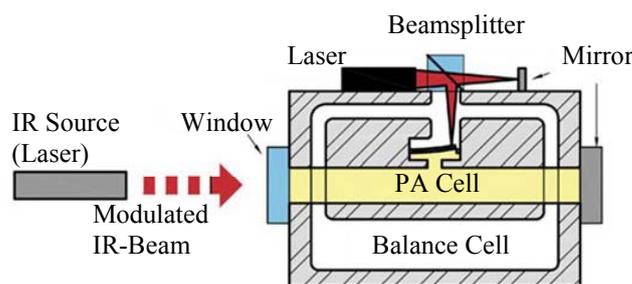


Рис. 9. Схема современного фотоакустического детектора кантилеверного типа [78]

*Коммерческие системы для анализа состава ВВ.* Как известно, еще в 2003 г. в США получено разрешение Food and Drug Administration (FDA) и начато промышленное производство детекторов окиси азота NO как биомаркера бронхиальной астмы. Кроме того, получил практическое распространение метод, позволяющий детектировать в ВВ молекулы CO, которые связываются с гемоглобином крови, образуя карбоксигемоглобин (COHb), мешающий эритроцитам переносить кислород [79, 80].

Помимо подходов, подробно описанных в [3] и направленных на обнаружение одного вида газа, предпринимались попытки одновременно выполнить анализ нескольких компонентов, содержащихся в ВВ [81]. В работе [82] для многокомпонентного анализа дыхания два коммерчески доступных

ИК ККЛ с фиксированными длинами волн объединены в один измерительный блок (рис. 10). Установка содержит устройство отбора проб дыхания для нескольких потоков выдоха и связанную с ним систему накачки вместе с двумя газовыми датчиками, использующими многопроходную ячейку (75 м), а также импульсные РОС ККЛ (DFB-QCL). Система настраивалась на длины волн, соответствующие  $1900\text{ см}^{-1}$  для анализа NO и  $\text{CO}_2$  и  $2190\text{ см}^{-1}$  для CO и  $\text{N}_2\text{O}$ . Как известно, молекулы NO и CO в ВВ являются биомаркерами астмы и хронической обструктивной болезни легких (ХОБЛ). Для NO при времени интегрирования 1 с получен минимальный порог обнаружения  $\text{LOD} = 0.9\text{ ppbv}$ . Сенсорное устройство позволяло собирать данные в режиме реального времени со скоростью 10 Гц. Эта установка стала первой системой на основе ИК ККЛ, используемой для клинического изучения ВВ у пациентов с астмой и ХОБЛ [82].



Рис. 10. Диагностическая установка с двумя ККЛ [82]

В работах [83, 84] для многокомпонентного газового анализа ВВ использован непрерывно перестраиваемый в пределах  $830\text{—}1250\text{ см}^{-1}$  импульсный ИК ККЛ с внешним резонатором (ЕС-QCL), работающий с многопроходной ячейкой (оптическая длина пути 55 м). Согласно [83, 84], определение концентрации возможно для молекул с широким спектральным профилем, таких как ацетон и этанол, но затруднено для молекул, спектральные линии которых имеют острый максимум, таких как диоксид углерода. Созданная установка разработана для клинического исследования детей с астмой и кистозным фиброзом.



Рис. 11. ККЛ-газоанализатор фирмы Toshiba [84, 85]

Фирма Toshiba Inc. также анонсировала создание компактной установки для анализа состава ВВ на базе ККЛ [84]. В настоящее время установка тестируется на предмет обнаружения следов ацетальдегида (промежуточный продукт метаболизма алкоголя), ацетона (промежуточный продукт метаболизма жирных кислот, показатель ожирения и диабета), окиси углерода (промежуточный продукт катаболизма гема, показатель курения). В ближайшем будущем планируется расширить круг детектируемых молекул, включив в него метан (продукт метаболизма кишечной флоры, индикатор состояния кишечной среды), окись (монооксид) азота (показатель астмы, образуется при воспалении дыхательных путей) и углекислый газ, в состав которого входит тяжелый изотоп углерода  $^{13}\text{C}$  (показатель гастрита, обусловленного наличием в желудке бактерий *Helicobacter pylori*). Прототип системы показан на рис. 11.

Фирма Aerodyne Research, Inc. (США) приступила к коммерческому выпуску компактного газоанализатора на основе ИК ККЛ для регистрации следовых количеств метана,  $\text{N}_2\text{O}$ ,  $\text{NO}$ ,  $\text{NO}_2$ ,  $\text{CO}$ ,  $\text{CO}_2$ , формальдегида, муравьиной кислоты, этилена, ацетилена, аммиака и др. (рис. 12) [86]. Газоанализатор Quantum Cascade Laser Mini Monitor массой 25 кг предназначен, в частности, для анализа ВВ и позволяет проводить измерения  $\text{CO}$  и  $\text{NO}$  в режиме реального времени и со значительно большей (примерно на порядок) чувствительностью, чем предлагаемые на рынке приборы, использующие диодные лазеры ближнего ИК диапазона. Например, чувствительность к  $\text{CO}$  составляет 0.1 ppb при времени измерения 1 с. ККЛ Quantum Cascade Laser Mini Monitor в силу своей компактности с успехом может быть использован в амбулаторных исследованиях.



Рис. 12. Коммерческий ККЛ-газоанализатор Quantum Cascade Laser Mini Monitor фирмы Aerodyne Research, Inc. [86]

*Проблемы и перспективы.* Несмотря на несомненные достижения в области создания высокочувствительных методов спектрального анализа газовой среды с применением перестраиваемых ИК ККЛ, неинвазивная диагностика заболеваний путем анализа состава ВВ на их основе еще далека до внедрения в широкую медицинскую практику. Проблемы анализа дыхания с использованием методов лазерной спектроскопии включают в себя ряд аспектов: стоимость анализаторов дыхания, устранение влияния мешающих интерферентов, выбор техники дыхания (стандартизация методик) и проблему количественной корреляции концентрации биомаркера с уровнем диагностического агента на основе анализа крови. Предстоит большая работа, связанная с обнаружением и классификацией устойчивых биомаркеров для составления “метаболического” профиля конкретного патологического состояния [3, 4].

Поскольку один биомаркер может быть связан с различными заболеваниями или метаболическими расстройствами (“биологическая интерференция”), диагностирование конкретного заболевания в общем случае необходимо осуществлять путем регистрации нескольких характерных для него биомаркеров, составляющих “метаболический” профиль заболевания. В свою очередь “спектроскопическая интерференция”, т. е. наличие в составе ВВ молекул, линии поглощения которых накладываются на линию поглощения биомаркера, характерного для конкретного заболевания, затрудняют или делают невозможным его детектирование. Кроме того, применение неинвазивной диагностики путем анализа ВВ особенно эффективно в амбулаторных условиях, например, при массовой диспан-

серизации населения, когда одновременно диагностируется не одно, а целый ряд заболеваний. Решение перечисленных проблем возможно только при использовании перестраиваемых в широком диапазоне длин волн ИК ККЛ, которые в настоящее время являются достаточно дорогими изделиями по сравнению с традиционными лазерными диодами. В то же время темпы развития производства ИК ККЛ позволяют надеяться на то, что в ближайшей перспективе перестраиваемые ИК ККЛ станут доступными для широкого клинического применения.

Техника дыхания представляет собой особую проблему для анализа ВВ методами лазерной спектроскопии, поскольку в этом случае анализ осуществляется в режиме реального времени. Для понимания механизма газообмена в легких важно определение состава альвеолярного воздуха, который отличается от состава ВВ [87]. Поэтому необходима стандартизированная методика их разделения, один из возможных вариантов которой рекомендован в [80]. Наконец, проблема количественной корреляции концентрации биомаркера с уровнем диагностического агента на основе анализа крови связана не столько с использованием лазерных методов анализа состава ВВ, сколько с общей проблемой диагностирования заболеваний по ВВ. Дело в том, что для ряда заболеваний существует большое различие между количественной концентрацией биомаркера конкретного заболевания, содержащегося в ВВ, и уровнем установленного на основе анализа крови диагностического агента этого заболевания. Например, для пациента с диабетом первого типа с помощью CRDS-газоанализатора в режиме реального времени можно получить достаточно точную концентрацию ацетона в ВВ. Однако отсутствие количественной корреляции концентрации ацетона в ВВ с уровнем глюкозы в крови делает измерения концентрации ацетона в ВВ средством только контроля, а не диагностики для пациентов с диабетом. По-видимому, эта проблема также должна решаться путем создания “метаболического” профиля конкретного патологического состояния пациента.

Анализ последних достижений в области спектроскопии показывает, что особое внимание уделяется перспективным широкополосным когерентным источникам. Так, комбинируя новую оптическую гребенчатую технологию (OFC) с технологией CEAS, авторы [88] разработали новый метод OFC-CEAS, который сочетает высокую чувствительность метода CEAS с широкополосным лазерным источником, что делает возможным одновременное детектирование в ВВ молекул-биомаркеров нескольких видов [89]. Однако, несмотря на прогресс в этом отношении, перестраиваемые ИК ККЛ остаются наиболее востребованным для проведения спектральных исследований инструментом [6].

**Применение ИК ККЛ в хирургии. Лазерный скальпель.** Биологическая ткань содержит молекулы воды, белки и липиды, которые поглощают свет за счет возбуждения колебательных и вращательных состояний входящих в их состав молекул. В настоящее время в клинических целях наибольшее применение получили лазеры, работающие в диапазоне длин волн 2—3 мкм, что связано с высоким поглощением в этой области спектра одного из основных компонентов биологической ткани — воды. Поэтому в хирургии более распространены прецизионные эрбиевые YSSG:Er ( $\lambda = 2.79$  мкм) и YAG:Er ( $\lambda = 2.94$  мкм), гольмиевые YSSG:Ho ( $\lambda = 2.09$  мкм), а также CO<sub>2</sub>-лазеры ( $\lambda = 10.6$  мкм) [90—93]. Однако существуют еще сильные полосы поглощения в диапазоне 6—8 мкм, где присутствуют линии поглощения воды (максимум 6.1 мкм) и белков (~6.1 мкм амидогруппа Амид I; ~6.45 мкм Амид II; ~7.6 мкм Амид III), что активно используется, например, в спектроскопии (рис. 13) [94—96]. Поэтому можно предположить, что эффективность резания и удаления (абляция) биологической ткани можно улучшить при использовании лазера, который излучает в этом диапазоне.

В настоящее время в практической медицине лазерные устройства, которые могут излучать на длинах волн 6—8 мкм, не используются [12]. Это не означает, что таких источников не существует. Так, СО-лазеры способны излучать на длинах волн 4.7—8.2 мкм [96], но они редко применяются в клинической практике из-за токсичности активной среды. Лазеры на свободных электронах также могут излучать в области среднего ИК диапазона [97—101], однако они слишком громоздкие и дорогие, чтобы быть практичными для клинических применений. Альтернативой являются лазеры, использующие нелинейно-оптические методы для преобразования длины волны излучения, такие как генератор разностной частоты [102], параметрический генератор света (ПГС) [103] и комбинационные (КР) лазеры [104, 105]. ПГС в последнее время получили заметное развитие. Однако их диапазон генерации ограничивается краем полосы поглощения нелинейного кристалла и не превышает ~8 мкм (ПГС на кристалле ZGP), т. е. не захватывает сильную полосу поглощения белковых соединений (Амид III). Мощность излучения волоконных КР-лазеров также сильно падает с ростом длины волны излучения [106].

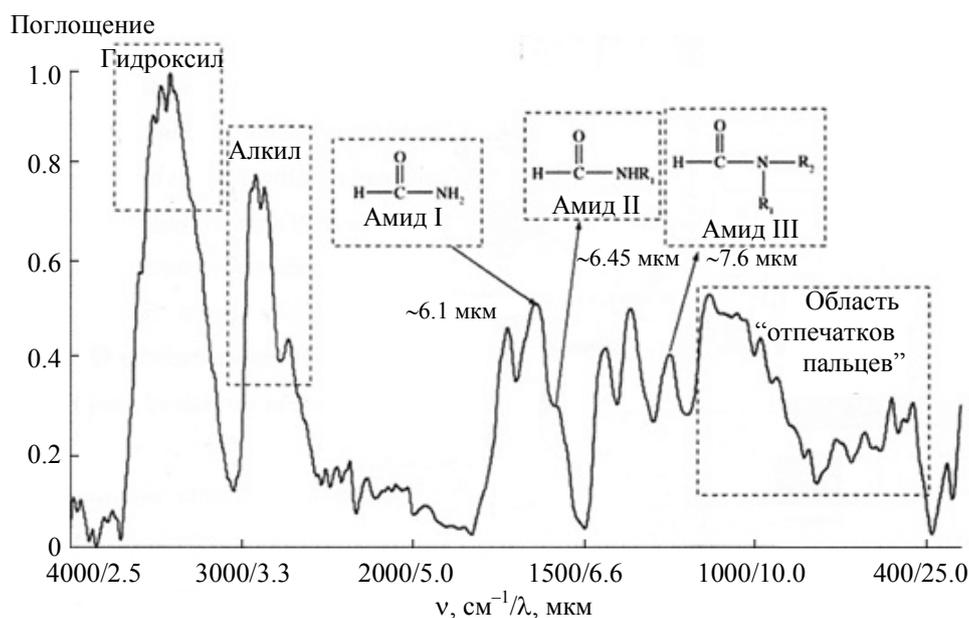


Рис. 13. ИК спектр чистого рекомбинантного белка MPB70 [95]

ККЛ представляют особый интерес для лазерной хирургии, поскольку являются компактными полупроводниковыми приборами с плавно изменяемой длиной волны излучения, способными излучать в указанном спектральном диапазоне. Поэтому работы, направленные на исследование возможности их применения в качестве лазерного скальпеля, представляют особый интерес. В качестве одной из первых работ, связанных с изучением возможности применения ИК ККЛ в традиционной хирургии для рассечения мягких биологических тканей, следует упомянуть [12]. Цель этого исследования — сравнение эффективности воздействия на мягкую ткань куриной грудки лазерного излучения ИК ККЛ с  $\lambda = 5.76$  мкм и излучения  $\text{CO}_2$ -лазера, нашедшего широкое применение в практической лазерной хирургии. Выбор  $\text{CO}_2$ -лазера обусловлен тем, что для него механизм абляции мягких биологических тканей наиболее изучен ( $\lambda = 10.6$  мкм). Использован ИК ККЛ с резонатором Фабри—Перо, работающий в многомодовом режиме генерации. Спектральный состав излучения находится в пределах 5.6—5.9 мкм с максимумом на  $\lambda = 5.76$  мкм. В обоих случаях образцы подвергались воздействию лазерного излучения с плотностями мощности 1250 и 2500 Вт/см<sup>2</sup>. При этом размер лазерного пятна 180×280 и 300×260 мкм<sup>2</sup> для ККЛ и  $\text{CO}_2$ -лазеров.  $\text{CO}_2$ -лазер работал в непрерывном режиме, ККЛ — в импульсном режиме генерации при длительности импульса 500 нс и частоте следования 1000 кГц (рабочий цикл 50 %).

Поскольку  $\text{CO}_2$ -лазер работал в непрерывном режиме, время взаимодействия  $\tau_{\text{вз}}$  лазерного излучения с образцом эквивалентно времени облучения. При этом облучение  $\text{CO}_2$ -лазером индуцирует в образцах фототермические эффекты, так как  $\tau_{\text{вз}} > \tau_{\text{тепл}}$ . Здесь время тепловой релаксации  $\tau_{\text{тепл}}$  определяется выражением:

$$\tau_{\text{тепл}} = \delta^2 / 4\alpha = 1/4\alpha\mu^2, \quad (10)$$

где  $\delta$  — глубина поглощения излучения;  $\alpha$  — коэффициент температуропроводности ткани;  $\mu$  — коэффициент ее поглощения на соответствующей длине волны.

Рассчитанное по формуле (10) для сухой кожи цыпленка  $\tau_{\text{тепл}} = 11$  и 5.6 мс для  $\lambda = 5.76$  и 10.6 мкм. Поскольку ККЛ работает в импульсном режиме, можно предположить, что фототермические эффекты не наблюдаются. Однако ККЛ обладают очень малой энергией в импульсе (~1 мкДж), которой недостаточно, чтобы вызвать абляцию, следовательно, удаление ткани зависит от накопления тепла в течение нескольких импульсов. Таким образом, ККЛ действует как квазинепрерывный лазер, а в образцах, по мнению авторов [12], индуцируются фототермические эффекты, как и в случае  $\text{CO}_2$ -лазера. Повышение температуры, связанное с фототермическими эффектами, приводит к таким реакциям, как коагуляция, испарение и карбонизация, что согласуется с полученными в [12] результатами.

На рис. 14 представлены изображения поверхности и поперечного сечения куриной грудки после воздействия на нее лазерного излучения ККЛ.

По мнению авторов [12], высокая средняя мощность ККЛ, достигающая нескольких ватт, обеспечивает такое же фототермическое воздействие на биологическую ткань, как и излучение CO<sub>2</sub>-лазера. Следовательно, при надлежащем выборе длины волны ККЛ, совпадающей со специфической полосой поглощения ткани, данный лазер можно использовать в качестве эффективного лазерного скальпеля для абляции мягких биологических тканей и ее коагуляции в процессе хирургического вмешательства. В то же время акцентируется внимание на том, что воздействие излучения ККЛ на ткань индуцирует в ней нежелательные термические повреждения, что связано с низкой энергией в лазерном импульсе, необходимостью ее накопления и, как следствие, рассеянием тепла в окружающую область. По мнению авторов, этот факт свидетельствует о том, что ККЛ не является лучшей лазерной системой в отношении тепловых эффектов, тем не менее они считают, что ИК ККЛ перспективны для применения в лазерной хирургии при условии устранения нежелательных термических эффектов при облучении биологической ткани излучением ККЛ.

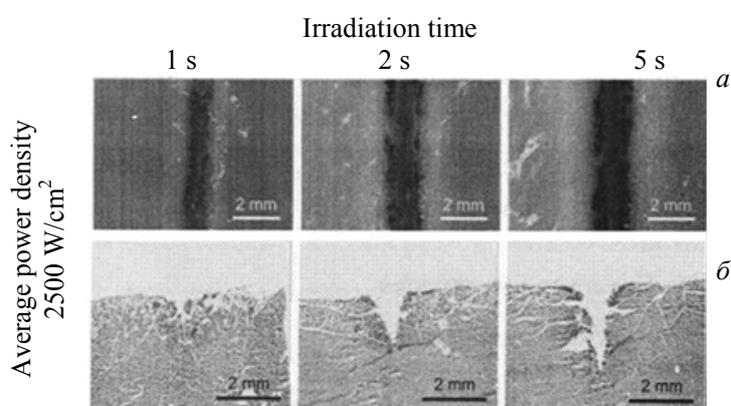


Рис. 14. Эффекты воздействия излучения ИК ККЛ на ткань куриной грудки: вид поверхности (а) и поперечное сечение (б) [12]

К такому же выводу приходят и авторы [13], изучая влияние излучения ИК ККЛ с  $\lambda_{\text{ген}} = 6.1$  мкм на роговицу глаза. Выбор длины волны генерации объясняется тем, что в этой области спектра находится обусловленный деформационными колебаниями максимум поглощения воды ( $1650 \text{ см}^{-1}$ ) и полоса поглощения входящей в состав белков амидогруппы. Именно такое совпадение, по мнению авторов, позволяет считать лазер с  $\lambda_{\text{ген}} = 6.1$  мкм лучшим инструментом для абляции мягких тканей. В [12] *in vitro* исследовалось воздействие излучения такого лазера на роговицу (stroma) глаза животного. Показано, что образование кратеров в роговице сопровождается меньшими побочными повреждениями, если она содержит меньше воды. При этом отмечено, что для аккуратной и точной абляции ткани роговицы необходима оптимизация режима облучения, в частности, увеличение пиковой мощности излучения.

Один из возможных путей повышения энергии в импульсе более чем на порядок состоит в формировании линеек из отдельных ККЛ [21, 22]. Кардинальным решением проблемы, связанной с устранением нежелательных термических эффектов при хирургическом вмешательстве, по-видимому, является подбор параметров режима генерации, обеспечивающих низкотемпературную кавитационную фрагментацию биологических тканей [107—110]. Есть основания полагать, что линейки РОС ИК ККЛ представляют для этого наиболее подходящий инструмент. Действительно, особенностью ИК ККЛ является генерация периодически следующих лазерных импульсов с относительно небольшой пиковой мощностью (несколько ватт) с возможностью изменения в широких пределах их длительности и частоты следования. При надлежащем выборе длины волны генерации такие лазеры в наибольшей степени подходят для реализации условий низкотемпературной хирургии, которая в последнее время интенсивно развивается [109].

**Удаление атеросклеротических бляшек.** При выполнении некоторых операций, когда требуется малоинвазивное лечение, работающие в диапазоне длин волн 5—7 мкм ККЛ могут обладать существенными преимуществами по сравнению с традиционными медицинскими лазерами. К операциям

такого типа относятся процедуры, в ходе которых добиваются лазерного повреждения определенных образований без нарушения целостности окружающей ткани. Эта цель достигается подбором характеристик лазера — длины волны и режима облучения. Они должны обеспечить поглощение лазерного света целевым образованием, что приведет к его разрушению за счет превращения энергии излучения в тепловую (фототермолиз), а в некоторых случаях и в механическую энергию. Одним из таких образований может быть атеросклеротическая бляшка, удаление которой необходимо для лечения и профилактики ишемической болезни сердца [111—113]. При этом доставка излучения к пораженному органу осуществляется с помощью ИК оптического волокна [94, 114, 115].

Атеросклеротические бляшки состоят в основном из сложных эфиров холестерина, а валентные колебания двойной связи  $C=O$  в холестериновых эфирах сильно поглощают излучение с  $\lambda = 5.75$  мкм. Поэтому для клинического применения малоинвазивной лазерной ангиопластики требуется компактный лазер с  $\lambda_{\text{ген}} = 5.75$  мкм. Воздействуя на атеросклеротическую бляшку излучением с указанной длиной волны, можно своевременно проводить малоинвазивные внутрисосудистые операции для лечения и профилактики ишемической болезни сердца [111—113].

В работах [116, 117] исследовалась возможность применения ИК ККЛ для малоинвазивной лазерной ангиопластики. Показано, что при средней плотности мощности лазерного излучения  $180 \text{ Вт/см}^2$  (длительность импульса 500 нс, частота следования 1000 кГц) атеросклеротическая аорта удаляется за время облучения  $\geq 1$  с, тогда как нормальная аорта удалялась за время  $>10$  с (эксперименты проводились на грудной аорте кролика). Это наглядно демонстрирует тот факт, что достигнута избирательная абляция атеросклеротической и нормальной аорты (рис. 15). При этом авторы отмечают, что для уменьшения тепловых эффектов, приводящих к коагуляции и карбонизации сосудов, необходим подбор оптимального режима облучения.

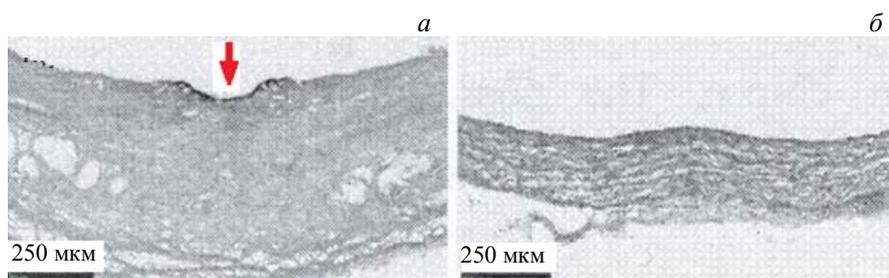


Рис. 15. Поперечные срезы атеросклеротических поражений (а) и нормальная грудная аорта после облучения излучением ККЛ с  $\lambda_{\text{ген}} = 5.75$  мкм (б) (средняя плотность мощности лазерного излучения  $180 \text{ Вт/см}^2$ , время облучения 3 с) [117]; стрелкой показана удаленная лазером часть атеросклеротической бляшки

Представляет интерес также работа [118], в которой приведены результаты исследований по направленному (избирательному) воздействию излучения ККЛ на вполне определенные молекулярные связи. В качестве целевого объекта выбран триацилглицерол, доля которого 16—23 % массы тела взрослого человека. Продемонстрирован метод непосредственной стимуляции биомолекул путем воздействия лазерным излучением с длиной волны, попадающей в область “отпечатков пальцев” для целевого объекта с центром контура линии поглощения на частоте  $1738 \text{ см}^{-1}$  (5.75 мкм). При определенных условиях облучения зарегистрирован факт гибели жировых клеток, который устанавливался с помощью FITC-меченого аннексина V и этидиума гомодимера III. Полученные данные свидетельствуют о том, что селективная доставка лазерной энергии в эндогенные молекулы может влиять на биологические процессы в живом организме. При этом из представленных работ следует, что ККЛ являются в настоящее время наиболее подходящим “инструментом” для селективного воздействия на молекулярные связи компонентов биоткани.

**Формирование изображений срезов биоткани с помощью ККЛ для диагностики онкологических заболеваний. Терагерцовый имиджинг.** Освоение терагерцового диапазона частот — одно из наиболее “горячих” и бурно развивающихся направлений современной физики. В терагерцовом диапазоне лежат вращательные спектры многих органических молекул, включая колебания биологически важных коллективных мод ДНК и белков, что позволяет развивать новые методы спектроско-

пии биологических структур [119, 120]. В отличие от рентгена ТГц излучение не опасно, поскольку не ионизирует среду и не повреждает биомолекулы. Кроме того, уникальная чувствительность ТГц излучения к воде обуславливает значительный интерес к его применению в офтальмологии [121].

Следует ожидать, что из-за слабого неионизирующего влияния ТГц излучения на объект и относительно малого влияния интерференционных эффектов формирование его ТГц изображения станет мощным методом для безопасного медицинского осмотра *in vivo*, например, при оценке эффективности заживления ран и отслеживании прогрессирования рака, а также при подробном рассмотрении мягких тканей [17, 18]. Так, в работе [122] показано, что ТГц изображение может быть полезно для диагностики ожога. Продемонстрировано обнаружение с его помощью кариеса и рака кожи [123, 124], сообщалось о формировании изображений злокачественных и нормальных биологических тканей для их сравнения и диагностики заболевания [125—127].

Эти первые успехи стали возможными благодаря применению техники формирования изображений в ТГц диапазоне спектра с помощью ТГц-спектроскопии во временной области (ТРП) и с помощью непрерывного (CW) ТГц излучения. Преимущество формирования изображений во временной области заключается в том, что экспонирование объекта осуществляется с применением широкого частотного спектра [128—130]. Однако этот метод использует пикосекундные ТГц импульсы, для получения которых требуется дорогостоящий фемтосекундный лазер [5]. Кроме того, существуют проблемы, связанные с генерацией узких спектральных линий. В отличие от этого метода технология формирования изображений с помощью непрерывного ТГц излучения более привлекательна для когерентного детектирования, так как обеспечивает большое отношение сигнал/шум благодаря высокой спектральной плотности мощности. Однако в этом случае на частотах  $>1$  ТГц не удастся получить мощность излучения  $>1$  мкВт [5, 131].

Как отмечалось выше, технологические достижения в области ККЛ позволили создать ТГц ККЛ, работающие в ТГц области спектрального диапазона [30]. Несмотря на то что ТГц ККЛ работают при криогенных температурах, они представляют собой компактные и экономически эффективные устройства, обеспечивающие гораздо более мощное излучение, чем известные твердотельные источники. Для визуализации медико-биологических объектов последнее обстоятельство дает большое преимущество ТГц ККЛ перед традиционной технологией получения ТГц излучения, где требуются громоздкие и дорогие фемтосекундные лазеры [5, 21]. ТГц ККЛ обладают и другим преимуществом, связанным с возможностью когерентного детектирования сигнала, существенно увеличивая отношение сигнал/шум.

Ниже дан краткий анализ результатов применения ТГц ККЛ для ТГц имиджинга биологических объектов, по-видимому, впервые полученных в [17, 18]. Построенная на основе ТГц ККЛ система формирования изображений (визуализации), работающая на пропускание, состоит из четырех внеосевых параболических зеркал, в которых лазерный луч сфокусирован в малое пятно. На рис. 16 показана схема формирования изображения в проходящем свете.

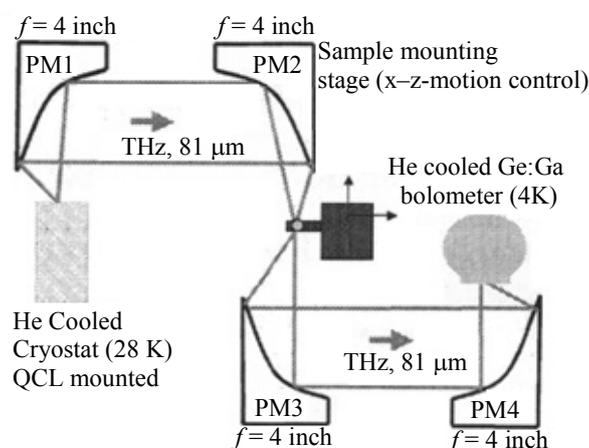


Рис. 16. Принципиальная схема системы формирования изображений с ТГц ККЛ, работающей на “пропускание” [17]

Образец толщиной 2 мм монтировался на управляемом компьютером столике с возможностью поступательного перемещения образца в плоскости  $X-Y$ , перпендикулярной оптической оси. Держатель образца спроектирован таким образом, чтобы он был прозрачным для лазерного луча, а биологическая ткань могла быть на нем надежно закреплена. Размер сфокусированного лазерного пучка, определяющий разрешение изображения, составлял  $280 \times 340 \text{ мкм}^2$  ( $X-Y$ ), что далеко от дифракционного предела. Оценка другого важного параметра системы показала, что ее динамический диапазон составляет 2000:1, что соответствует 33 дБ.

При построении изображений биомедицинских объектов с использованием ТГц ККЛ проведен анализ двух основных факторов — контрастности и мощности ТГц излучения. Контраст получаемых изображений определялся различием в соотношении содержания воды и жира в разных тканях. Печень содержит больше жировых клеток, чем ткани мышц или сухожилий. Поэтому печень и жир демонстрируют одинаковое пропускание. В свою очередь в мышцах и сухожилиях более высокое содержание воды и малое количество жира, поэтому они отличаются от жировых клеток небольшим пропусканием и создают темное изображение. Коэффициенты поглощения четырех различных тканей получены на частоте 3.7 ТГц путем измерения мощности проходящего через них излучения. С учетом разницы коэффициентов поглощения в жировой ткани (жир+вода), печени ( $0.05 \text{ см}^{-1}$ ), мышцах ( $19.15 \text{ см}^{-1}$ ) и сухожилиях ( $19.04 \text{ см}^{-1}$ ) получены количественные различия в содержании воды в каждом из исследуемых типов биологической ткани. Печень имеет аналогичное содержание воды, а контраст между жиром и мышцей (или сухожилием) соответствует увеличению содержания воды на 7.8 %. В работах [17, 18] изучены изображения печени мыши с развитыми опухолями в ТГц спектральном диапазоне при различных уровнях мощности излучения. Показано, что мощность ТГц излучения критически влияет на разрешение и контраст изображения.

На рис. 17 приведены изображения тонких участков содержащей опухоль печени, которые фиксировались в формалине и разрезались до толщины 2 мм. Образец не подвергался дегидратации в спирте, а высушивался на воздухе непосредственно перед сканированием ТГц излучением, тем самым обеспечивая естественный уровень содержания воды в структурах для получения ТГц изображения. ТГц изображение на рис. 17, б состоит из 2196 пикселей с интервалом 200 мкм. Как видно, изображение печени очень сложное, так как опухоль полностью развита, что вызывает неоднородную плотность тканей. Из сравнения рис. 17, а и б следует, что между изображениями гистологического образца толщиной 5 мкм в ТГц и видимом диапазонах имеется явное соответствие. Изображение образца, полученное в ТГц диапазоне спектра, содержит гораздо больше информации по сравнению с оптическим изображением, а его характер можно объяснить наличием в образце серьезных структурных деформаций и изменений плотности ткани из-за опухолей в печени. Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о потенциальных возможностях построения ТГц имиджинговых систем на базе ККЛ для выявления онкологических заболеваний. Отметим, что в настоящее время ТГц ККЛ обеспечивают милливаттную мощность излучения в частотном диапазоне 4.4—2.0 ТГц [132, 133]. На более низких частотах контраст между опухолями и нормальными тканями и глубина проникновения излучения в ткань больше. Поэтому создание ТГц ККЛ, работающих в нижнем конце ТГц частотного спектра ( $< 2 \text{ ТГц}$ ) и обладающих необходимой мощностью излучения (несколько милливатт), весьма желательно. В этом случае ККЛ с их отличным отношением сигнал/шум и небольшими размерами идеально подходят для использования в медико-биологической практике.

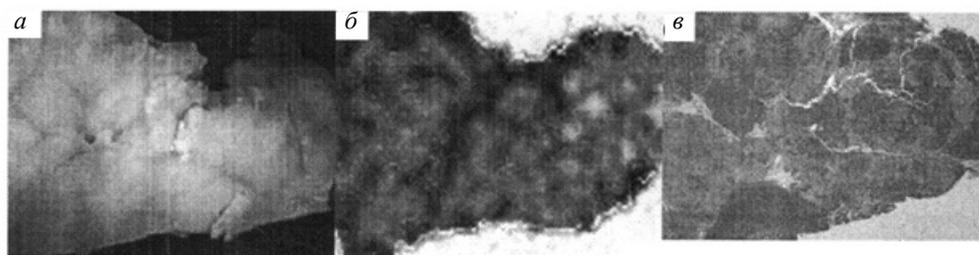


Рис. 17. ТГц изображение образца печени мыши с опухолями (б), полученное в схеме пропускания, по сравнению с оптическим изображением (а) и изображением образца, взятого для гистологического анализа (в); для ТГц изображений места с низким пропусканием имеют темный цвет, с высоким — белый [17, 18]

**Формирование и анализ спектральных изображений в среднем ИК диапазоне спектра.** ИК-Фурье-микроскопия объединяет в себе возможности микроскопического пространственного анализа и спектроскопического анализа химического состава. Одно из главных преимуществ ИК-фурье-визуализации — возможность обнаружения едва различимых химических превращений в тканях и клетках без контрастирования, что обеспечивает улучшенную диагностику онкологических заболеваний на ранних стадиях [134]. ИК-Фурье-микроскопия может служить дополнением к традиционным методам гистопатологии и цитологии для исследования болезней посредством визуализации крупных фрагментов пробы ткани. Однако длительное время, необходимое для получения изображения при картировании поверхности исследуемого образца, препятствует широкому внедрению этой технологии в медицинскую практику [19, 135].

Естественно предположить, что применение в качестве источника излучения перестраиваемых в широком спектральном диапазоне ИК ККЛ поможет устранить этот недостаток. Действительно, в ряде работ показано [135—140], что ИК микроскопы на основе ИК ККЛ существенно выигрывают у ИК-Фурье-техники в производительности и спектральном разрешении. Это связано с высокой спектральной плотностью излучения, быстротой и спектральной перестройки в широком спектральном интервале и малой шириной линии генерации ИК ККЛ.

*Микроспектроскопия с применением перестраиваемых ИК ККЛ.* В работе [19] представлены результаты исследований по применению ИК ККЛ в микроскопии для быстрого анализа и классификации тканей с патологией (колоректальный рак). Используемый ИК микроскоп на базе ККЛ обеспечивал возможность получения ИК изображений для точной классификации тканей в течение нескольких минут (рис. 18).

Обследовано 110 пациентов с колоректальным раком II и III стадии. Время получения изображения образца биоткани размером  $2 \times 2$  мм при сканировании в диапазоне  $1800\text{—}948\text{ см}^{-1}$  с разрешением  $2\text{ см}^{-1}$  составляло 47 с. При этом достигнуты высокие чувствительность и специфичность метода — 96 и 100 % по сравнению с гистопатологией, являющейся “золотым стандартом” в клинической диагностике рака. Для получения столь значимого результата авторам пришлось решить ряд серьезных проблем, среди которых — устранение интерференционных эффектов [135], обусловленных когерентной природой излучения, а также повышение стабильности мощности лазерного излучения. На базе алгоритма RF (Random Forest) разработан новый алгоритм QCLRf для быстрой обработки данных, необходимых для формирования и классификации изображений. Алгоритм QCLRf включает в себя две стадии: на первой осуществляется дискриминация здоровых тканей и клеток, подверженных патологическим изменениям, на второй различаются раковые области на срезе ткани (рис. 19).

Таким образом, авторам [19], по-видимому, удалось преодолеть препятствия для внедрения в клиническую практику нового метода диагностики рака, основанного на формировании за короткое время высококачественных гиперспектральных изображений в спектре рассеянного образцом излучения ИК ККЛ.

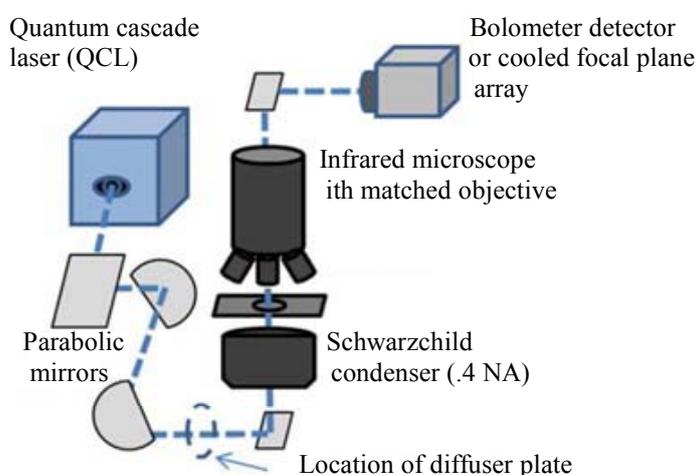


Рис. 18. Одна из возможных схем ИК ККЛ-микроскопа [135]

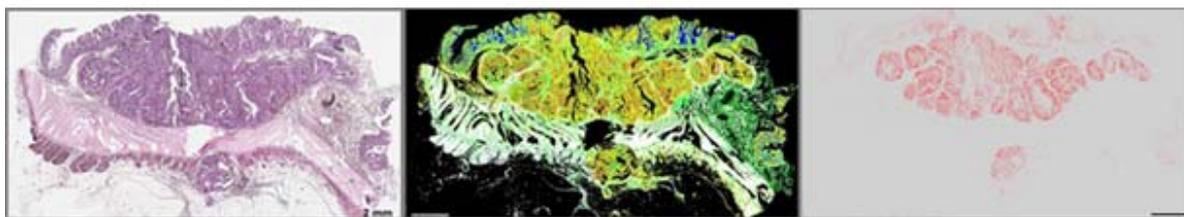


Рис. 19. Полученное с помощью ИК ККЛ изображение среза ткани, пораженной колоректальным раком [20]

*“Pump-probe” ИК фототермическая микроспектроскопия.* Один из недостатков описанного выше метода — относительно низкое пространственное разрешение, обусловленное большой ( $\sim 10$  мкм) длиной волны рассеянного объектом излучения. Чтобы улучшить этот параметр, в работе [20] усовершенствована конструкция ИК микроскопа за счет применения “pump-probe” схемы облучения исследуемого объекта (рис. 20).

В этой схеме излучение накачки вследствие поглощения в объекте приводит к возникновению тепловой линзы, искажающей волновой фронт пробного луча, что фиксируется чувствительным фотодетектором (PD). Эти изменения зависят от длины волны излучения накачки и позволяют при ее перестройке формировать гиперспектральные изображения объекта с пространственным разрешением, определяемым коротковолновым излучением пробной волны.

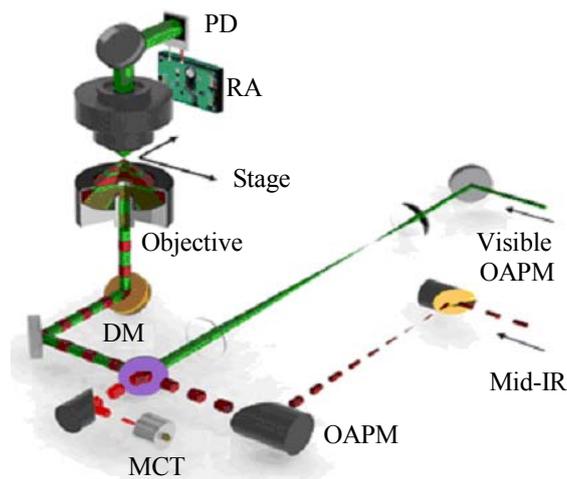


Рис. 20. Одна из возможных схем “pump-probe” ИК фототермического микроскопа (фрагмент рисунка из [20])

Источником излучения накачки служил импульсный перестраиваемый ИК ККЛ, а непрерывный лазер видимого диапазона являлся источником пробного излучения. Пара внеосевых (off-axis) параболических зеркал (ОАРМ) формирует пучок накачки и направляет его на кремниевое дихроичное зеркало (DM), с помощью которого формируется единый пучок, попадающий в объектив микроскопа. Остаточное отражение ИК луча накачки от дихроичного зеркала регистрируется фотоприемником на основе полупроводникового твердого раствора CdHgTe (МСТ, КРТ). Пробное излучение собирается конденсором с ирисовой диафрагмой, и после прохождения через закрепленный на предметном столике объект попадает на приемную площадку кремниевого фотоприемника (PD), сигнал с которого поступает на резонансный усилитель (RA), а затем на фазочувствительный синхронный детектор (lock-in-amplifier). Перестраиваемый в диапазоне частот  $1345\text{—}1905\text{ см}^{-1}$  ККЛ имел в одночастотном режиме генерации (ширина линии  $<1\text{ см}^{-1}$ ) среднюю мощность излучения 2 мВт при частоте следования импульсов 102 кГц. Мощность источника пробного излучения 10 мВт на  $\lambda_{\text{ген}} = 785\text{ нм}$ .

Чувствительность метода оценивалась путем визуализации небольшой молекулы  $\gamma$ -валеролактона в растворе дисульфида углерода при резонансной настройке излучения накачки на линию поглощения, связанную с колебаниями связи  $C=O$  ( $1775\text{ cm}^{-1}$ ). При указанных мощностях накачки и пробного излучения предел обнаружения в терминах объемной молярной концентрации равен  $10\text{ мкМ}$ . Полученная оценка чувствительности намного превышает ее значение для современных ИК микроскопов на основе комбинационного рассеяния, широко используемых для безмаркерной визуализации на внутриклеточном уровне. Для сравнения — предел обнаружения микроскопии вынужденного комбинационного рассеяния  $200\text{ мкМ}$  для самой сильной полосы, создаваемой связями  $C\equiv C$ , достигнут при мощности накачки  $120\text{ мВт}$  и мощности стока пучка  $130\text{ мВт}$ .

Достигнутые предел чувствительности обнаружения, а также субмикронное поперечное пространственное разрешение существенно превышают чувствительность известных методов ИК спектроскопии, а также дифракционный предел ИК микроскопии и позволяют осуществлять безмаркерную химическую визуализацию отдельных живых клеток и организмов в водной среде. Пример изображения клетки РС3 аденокарциномы простаты человека, полученного с помощью *pump-probe* ИК фототермического микроскопа на базе ИК ККЛ, показан на рис. 21.

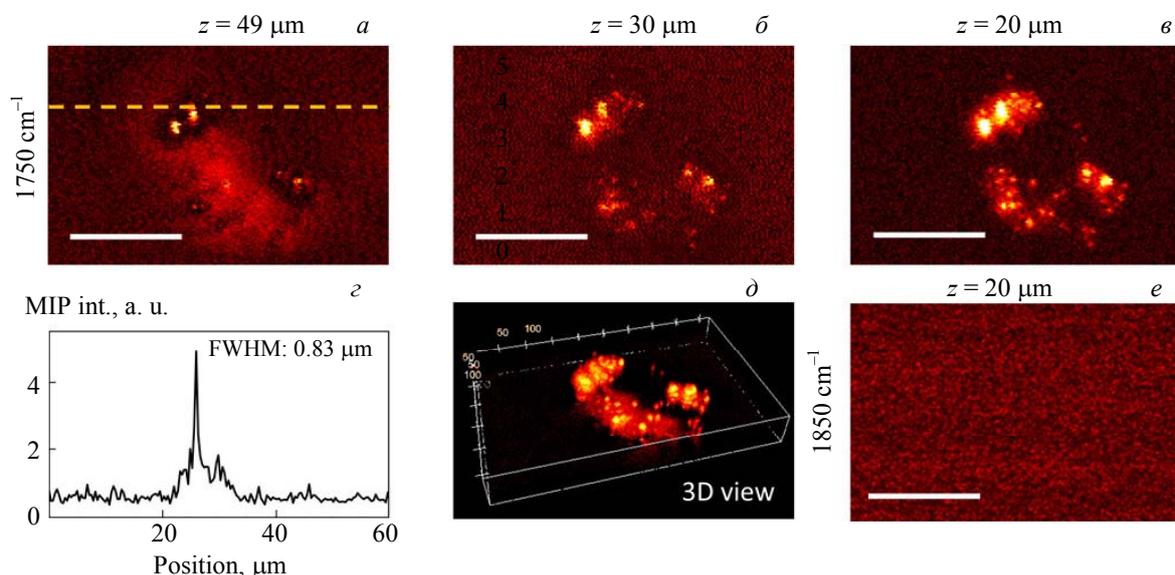


Рис. 21. 3D-изображения липидов в живых клетках: *a–в* — фототермические изображения РС3 клеток в среднем ИК диапазоне при настройке излучения накачки на линию поглощения  $1750\text{ cm}^{-1}$ , связанную с валентными колебаниями группы  $C=O$ , полученные на разной глубине; *z* — профиль линии *a* показывает для маленькой липидной капли субмикронное значение  $\text{FWHM} = 0.83\text{ мкм}$ ; *д* — восстановленное трехмерное изображение той же клетки, показывающее отдельные капли липидов над телом клетки; *е* — вне резонанса ( $1850\text{ cm}^{-1}$ ) изображение отсутствует; масштабный отрезок  $20\text{ мкм}$ , время задержки пикселя  $1\text{ мс}$  [20]

Аналогичные исследования, связанные с развитием *pump-probe* ИК фототермической микроскопии, проводят и другие коллективы авторов. Так, с помощью фототермической микроскопии в [141] продемонстрирована визуализация митохондрий. В [142] с помощью аналогичной технологии достигнута чувствительность, необходимая для обнаружения отдельных молекул. В [143] с помощью фототермического микроскопа на базе ИК ККЛ получены изображения мелких кристаллов и полимерного покрытия на устройствах MEMS. В [144] приведено изображение среза мозга птиц, полученное с помощью *pump-probe* фототермического микроскопа, в котором источником излучения накачки служил ККЛ, работающий в среднем ИК диапазоне, а источником пробного излучения — волоконный лазер ближнего ИК диапазона, работающий на безопасной для глаз длине волны [145].

На основании вышесказанного можно сделать вывод, что рассматриваемая *pump-probe* фототермическая микроскопия с применением перестраиваемых ИК ККЛ имеет многообещающие перспективы от мониторинга метаболических активностей до картирования молекул лекарственного средства с высоким разрешением в живых системах, что недоступно для существующих методов ИК микроскопии.

**Заключение.** Анализ результатов исследований не оставляет сомнений в том, что квантово-каскадные лазеры имеют большие потенциальные возможности в медико-биологической практике. Наиболее продвинутыми можно считать разработки, связанные с созданием систем на базе ИК квантово-каскадных лазеров для неинвазивной диагностики заболеваний по выдыхаемому воздуху. Сравнение различных методов спектрального лазерного анализа показало, что существуют технологии, обеспечивающие минимальный порог обнаружения молекул-биомаркеров на уровне  $ppb$  при времени интегрирования  $\sim 1$  с. Однако для широкого внедрения анализаторов дыхания на базе ИК квантово-каскадных лазеров в медицинскую практику необходимо решить ряд серьезных проблем: выбор оптимальной оптической схемы измерений, создание систем на основе ИК квантово-каскадных лазеров, перестраиваемых в широком спектральном интервале, разработка надежных методов устранения влияния интерферентов и, конечно, снижение стоимости коммерческих квантово-каскадных лазеров.

Что касается лазерной хирургии, то основные проблемы имеют отношение к вопросам устранения нежелательных тепловых эффектов, которые могут приводить к повреждению здоровой ткани. Один из путей ее решения заключается в повышении энергии в импульсе за счет создания линеек из квантово-каскадных лазеров с распределенной обратной связью. По-видимому, кардинальным решением этой проблемы является подбор параметров режима генерации, обеспечивающих низкотемпературную кавитационную фрагментацию биологических тканей [107—110]. Использование лазеров среднего ИК диапазона для клинических приложений ограничивается сложностью подбора гибкого оптического тракта для подведения и фокусировки излучения на биообъект. Например, для диапазона 6—8  $\mu m$ , который перспективен для офтальмо- и ангиохирургии, в настоящее время отсутствуют коммерчески доступные и прошедшие клинические испытания световоды [94].

Анализ результатов исследований показывает лишь принципиальную возможность терагерцового имиджинга срезов биологических тканей. Еще предстоит решить вопросы повышения контраста изображений и мощности излучения терагерцовых квантово-каскадных лазеров. Не менее важна проблема, связанная с созданием перестраиваемых терагерцовых квантово-каскадных лазеров и формированием мульти/гиперспектральных изображений исследуемого биообъекта, решение которой существенно повысит информативность метода. Разработка терагерцовых квантово-каскадных лазеров, работающих при комнатной температуре, также актуальна и для медико-биологических приложений.

Большой оптимизм вселяют достижения ИК микроскопии на базе квантово-каскадных лазеров в получении гиперспектральных изображений, особенно с зондирующим коротковолновым пучком, что позволяет продвинуться в субмикронную область пространственного разрешения при построении изображений отдельных клеток и даже молекул. Существующие в этой области проблемы связаны в основном с получением контрастных гиперспектральных изображений, не “зашумленных” интерференционными эффектами.

При исследовании и лечении биологических объектов особенно актуальны дистанционный контроль нагрева и корректировка лазерного воздействия. В работах [38, 146—149] показано, что метод, основанный на импульсной фототермической радиометрии обеспечивает в режиме реального времени эффективную обратную связь между лазером и объектом исследования или лечения, контролируя и поддерживая на заданном уровне температуру в области лазерного воздействия. Поэтому создание комбинированных лазерных устройств, поддерживающих эту функцию, на наш взгляд, крайне необходимо для рассмотренных медико-биологических приложений.

[1] **Е. В. Степанов.** Тр. Ин-та общей физики им. А. М. Прохорова, **61** (2005) 47—53

[2] **Е. В. Степанов, В. А. Миляев.** Квант. электрон., **32**, № 11 (2002) 987—992

[3] **В. Л. Вакс, Е. Г. Домрачева, Е. А. Собакинская, М. Б. Черняева.** Успехи физ. наук, **184**, № 7 (2014) 739—758

[4] **V. Vaks.** J. Infr. Millim. Terahertz Waves, **33**, N 1 (2012) 43—53

[5] **Л. А. Скворцов.** Журн. прикл. спектр., **81**, № 5 (2014) 653—678 [**L. A. Skvortsov.** J. Appl. Spectr., **81** (2014) 725—749]

[6] **A. Schwaighofer, M. Brandstetter, B. Lendl.** Chem. Soc. Rev., **46**, N 19 (2017) 5903—5924

[7] **K. Wörle, F. Seichter, A. Wilk, C. Armacost, T. Day, M. Godejohann, U. Wachter, B. Mizaikoff.** Analyt. Chem., **85**, N 5 (2013) 2697—2702

[8] **C. Wang, P. Sahay.** Sensors, **9**, N 10 (2009) 8230—8262

[9] **V. Spagnolo, R. Lewicki, L. Dong, F. K. Tittel.** Proc. 2011 IEEE International Workshop on Medical Measurements and Applications (MeMeA) (2011) 332—335

- [10] T. H. Risby, F. K. Tittel. *Opt. Eng.*, **49** (2010) 111123—111137
- [11] J. H. Shorter, D. D. Nelson, J. B. McManus, M. S. Zahniser, D. K. Milton. *IEEE Sens. J.*, **10**, N 1 (2010) 76—84
- [12] K. Hashimura, K. Ishii, N. Akikusa, T. Edamura, H. Yoshida, K. Awazu. *J. Innovat. Opt. Health Sci.*, **7**, N 3 (2014) 1450029-1—9
- [13] Y. Huang, J. Kang. *Proc. SPIE*, **8209** (2012) 82091W
- [14] K. Hashimura, K. Ishii, N. Akikusa, T. Edamura, H. Yoshida, K. Awazu. *Adv. Biomed. Engin.*, **1** (2012) 74—80
- [15] K. Hashimura, K. Ishii, K. Awazu. *Opt. Rev.*, **23**, N 2 (2016) 299—306
- [16] A. Schwaighofer, M. Montemurro, S. Freitag, C. Kristament, M. Culzoni, B. Lendl. *Analyt. Chem.*, **90**, N 11 (2018) 7072—7079
- [17] S. Kim, F. Hatami, A. Gu, A. Kurian, J. Ford, J. Harris, G. Scalari, J. Faist. In *Lasers and Electro-Optics Society, LEOS 2006, 19th Annual Meeting of the IEEE (2006)* 231—232
- [18] S. Kim, F. Hatami, G. Harris, A. Kurian, J. Ford, D. King, G. Scalari, M. Giovanny, M. Hoyler, J. Faist. *Appl. Phys. Lett.*, **88**, N 15 (2006) 153903-1—153903-3
- [19] C. Kuepper, A. Kallenbach-Thieltges, H. Juette, A. Tannapfel, F. Großerueschkamp, K. Gerwert. *Sci. Rep. (Nature Publisher Group)*, **8**, N 1 (2018) 1—10
- [20] D. Zhang, C. Li, C. Zhang, M. Slipchenko, G. Eakins, J. Cheng. *Sci. Adv.*, **2**, N 9 (2016) e1600521-1—7
- [21] M. Vitiello, G. Scalari, B. Williams, P. Natale. *Opt. Express*, **23**, N 4 (2015) 5167—5182
- [22] M. Razeghi, Q. Lu, N. Bandyopadhyay, W. Zhou, D. Heydari, Y. Bai, S. Slivken. *Opt. Express*, **23**, N 7 (2015) 8462—8475
- [23] R. Curl, F. Capasso, C. Gmachl, A. Kosterev, B. McManus, R. Lewicki, M. Pusharsky, G. Wysocki, F. Tittel. *Chem. Phys. Lett.*, **487** (2010) 1—18
- [24] A. Lyakh, R. Maulini, A. Tsekoun, R. Go, C. Pflugl, L. Diehl, Q. Wang, F. Capasso, C. Kumar, N. Patel. *Appl. Phys. Lett.*, **95**, N 14 (2009) 14113-1—14113-9
- [25] И. И. Засавицкий. XII Всеросс. молодежная конкурс-конференция по оптике и лазерной физике, 12—16 ноября 2014 г., Самара (2014); <http://www.myshared.ru/slide/968796>
- [26] J. Faist, D. Hofstetter, M. Beck, T. Aellen, M. Rochat, S. Blaser. *IEEE J. Quantum Electron.*, **38**, N 6 (2002) 533—546
- [27] A. Tredicucci, F. Capasso, C. Gmachl, D. Sivco, A. Hutchinson, A. Cho. *Appl. Phys. Lett.*, **73**, N 15 (1998) 2101—2103
- [28] J. Faist, M. Beck, T. Aellen, E. Gini. *Appl. Phys. Lett.*, **78**, N 2 (2001) 147—149
- [29] M. Belkin, F. Capasso. *Phys. Scripta*, **90**, N 1 (2015) 118002-13
- [30] B. Williams, S. Kumar, Q. Hu, J. Reno. *Electron. Lett.*, **42**, N 2 (2006) 89—91
- [31] A. Lee, B. Williams, S. Kumar, Q. Hu, J. Reno. *Opt. Lett.*, **7**, N 35 (2010) 910—912
- [32] B. Williams. *Nature Photon.*, **1**, N 9 (2007) 517
- [33] Л. Скворцов. *Квант. электрон.*, **41**, № 12 (2011) 1051—1060
- [34] Л. Скворцов. *Лазерные методы дистанционного обнаружения химических соединений на поверхности тел*, Москва, Техносфера (2014)
- [35] Л. Скворцов. *Квант. электрон.*, **42**, № 1 (2012) 1—11
- [36] H. Preier. *Semicond. Sci. Technol.*, **5** (1990) S12—S20
- [37] Ю. Курицын. *Инфракрасная спектроскопия с инжекционными лазерами. Лазерная аналитическая спектроскопия*, под ред. В. С. Летохова, Москва, Наука (1986) 120—173
- [38] Л. Скворцов. *Основы фототермической радиометрии и лазерной термографии*, Москва, Техносфера (2017)
- [39] D. Caffey, M. Radunsky, V. Cook, M. Weida, P. Buerki, S. Crivello, T. Day. *Proc. SPIE*, **7953** (2011) 79531K
- [40] R. Mihalcea, D. Baer, R. Hanson. *Appl. Opt.*, **35** (1996) 4059—4064
- [41] D. Baer, R. Hanson, M. Newfield, N. Gopaul. *Opt. Lett.*, **19** (1994) 1900—1902
- [42] П. Елисеев. *Введение в физику инжекционных лазеров*, Москва, Наука (1983)
- [43] I. Gordon, L. Rothman, C. Hill, R. Kochanov, Y. Tan, P. Bernath, B. Drouin. *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transfer*, **203** (2017) 3—69
- [44] P. Kluczynski, J. Gustafsson, A. Lindberg, O. Axner. *Spectrochim. Acta B*, **56** (2001) 1277—1354
- [45] B. Brumfield, M. M. Taubman, M. Phillips. *Photonics*, **3**, N 2 (2016) 33

- [46] **J. Haus.** Optical Sensors: Basics and Applications, John Wiley & Sons (2010)
- [47] **P. Zalicki, R. Zare.** *J. Chem. Phys.*, **102**, N 7 (1995) 2708—2717
- [48] **J. Wojtas, J. Mikolajczyk, Z. Bielecki.** *Sensors*, **13**, N 6 (2013) 7570—7598
- [49] **J. Scherer, J. Paul, H. Jiao, A. O'Keefe.** *Appl. Opt.*, **40** (2001) 6725—6732
- [50] **D. Baer, J. Paul, J. Gupta, A. O'Keefe.** *Appl. Phys. B: Las. Opt.*, **75** (2002) 261—265
- [51] **Y. Bakhirkin, A. Kosterev, C. Roller, R. Curl, F. Tittel.** *Appl. Opt.*, **43** (2004) 2257—2266
- [52] **Y. Bakhirkin, A. Kosterev, R. Curl, F. Tittel, D. Yarekha, L. Hvozدارa, M. Giovannini, J. Faist.** *Appl. Phys. B: Las. Opt.*, **82** (2006) 149—154
- [53] **R. Peeters, G. Berden, A. Apituley, G. Meijer.** *Appl. Phys. B: Las. Opt.*, **71** (2000) 231—236
- [54] **H. Dahnke, D. Kleine, P. Hering, M. Mürztz.** *Appl. Phys. B: Las. Opt.*, **72** (2001) 971—975
- [55] **H. Dahnke, D. Kleine, C. Urban, P. Hering, M. Murtz.** *Appl. Phys. B: Las. Opt.*, **72** (2001) 121—125
- [56] **G. von Basum, D. Halmer, P. Hering, M. Murtz, S. Schiller, F. Mueller, A. Popp, F. Kuehnemann.** *Opt. Lett.*, **29** (2004) 797—799
- [57] **D. Halmer, S. Thelen, P. Hering, M. Mürztz.** *Appl. Phys. B: Las. Opt.*, **85** (2006) 437—443
- [58] **D. Halmer, G. von Basum, P. Hering, M. Murtz.** *Opt. Lett.*, **30** (2005) 2314—2316
- [59] **П. Короленко, И. Николаев, В. Очкин, С. Цхай.** *Квант. электрон.*, **44**, № 4 (2014) 353—361
- [60] **A. O'Keefe, J. Scherer, J. Paul.** *Chem. Phys. Lett.*, **307**, N 5-6 (1999) 343—349
- [61] **J. Paul, L. Lapson, J. Anderson.** *Appl. Opt.*, **40**, N 27 (2001) 4904—4910
- [62] **G. Engel, W. Drisdell, F. Keutsch, E. Moyer, J. Anderson.** *Appl. Opt.*, **45**, N 36 (2006) 9221—9229
- [63] **I. Nikolaev, V. Ochkin, M. Spiridonov, S. Tskhai.** *Laser Phys.*, **21** (2011) 2088
- [64] **I. Nikolaev, V. Ochkin, S. Tskhai.** *Laser Phys. Lett.*, **10** (2013) 115701
- [65] **L. Kreuzer.** *J. Appl. Phys.*, **42** (1971) 2934
- [66] **A. Rosenzweig, A. Gersho.** *J. Appl. Phys.*, **47** (1976) 64
- [67] **Л. Скворцов.** *Квант. электрон.*, **43**, № 1 (2013) 1—13
- [68] **L. Skvortsov.** *Recent Patent. Eng.*, **3**, N 2 (2009) 129—145
- [69] **B. Paldus, T. Spence, R. Zare, J. Oomens, F. Harren, D. Parker, A. Hutchinson.** *Opt. Lett.*, **24**, N 3 (1999) 178—180
- [70] **F. Harren, G. Cotti, J. Oomens, S. Hekkert.** *Encyclopedia. Analyt. Chem.*, **3** (2000) 2203—2226
- [71] **M. Haisch, P. Hering, P. Schadevaldt, H. Brosicke, B. Braden, S. Koletzko, C. Steffen.** *Isotop. Environ. Health Stud.*, **30**, N 2-3 (1994) 253—257
- [72] **F. Harren, J. Reuss.** *Progress in Photothermal and Photoacoustic Science and Technology, Life and Earth Science*, Eds. A. Mandelis, P. Hess, SPIE, Bellingham, WA, **3** (1997) 83—127
- [73] **A. Miklos, P. Hess, Z. Bozoki.** *Rev. Sci. Instrum.*, **72** (2001) 1937—1955
- [74] **A. Elia, P. Lugarà M, C. Di Franco, V. Spagnolo.** *Sensors*, **9** (2009) 9616
- [75] **A. Kosterev, Y. Bakhirkin, R. Curl, F. Tittel.** *Opt. Lett.*, **27**, N 21 (2002) 1902—1904
- [76] **S. Ohira, K. Toda.** *Analyt. Chim. Acta*, **619**, N 2 (2008) 143—156
- [77] **P. Pellegrino, R. Polcawich.** *Chem. Biol. Sensing IV*, **5085** (2003) 52—64
- [78] **M. Bain, N. Mitchell, B. Armstrong, J. Uotila, I. Kauppinen, E. Terray, B. Ward.** *Miniaturisation and Integration of a Cantilever Based Photoacoustic Sensor into Micro Micromachined Device*, *Abst.*, N 45 (2011) 2579
- [79] **A. Slutsky.** *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **160** (1999) 2104—2117
- [80] *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **171**, N 8 (2005) 912—930
- [81] **P. Mazzone, X. Wang, Y. Xu, T. Mekhail, M. Beukemann, J. Na, M. Sasidhar.** *J. Thoracic Oncol.*, **7**, N 1 (2012) 137—142
- [82] **J. Shorter, D. Nelson, J. McManus, M. Zahniser, D. Milton.** *IEEE Sensors J.*, **10**, N 1 (2010) 76—84
- [83] **A. Reyes-Reyes, Z. Hou, E. van Mastriigt, R. Horsten, J. De Jongste, M. Pijnenburg, N. Bhattacharya.** *Opt. Express*, **22**, N 15 (2014) 18299—18309
- [84] **A. Reyes-Reyes, R. Horsten, H. Urbach, N. Bhattacharya.** *Analyt. Chem.*, **87**, N 1 (2014) 507—512
- [85] *Toshiba Develops Breath Analyzer for Medical Applications*, Toshiba, Press Release (18 Mart, 2014)
- [86] *Aerodyne Research Inc., Single Laser Quantum Cascade Laser Trace Gas Monitors: The Mini Monitor* (2016)
- [87] *Состав вдыхаемого, выдыхаемого и альвеолярного воздуха*; <http://www.amedgrup.ru/vozduh.html>
- [88] **M. Thorpe, K. Moll, J. Jones, B. Safdi, J. Ye.** *Science*, **311** (2006) 1595—1599
- [89] **M. Thorpe, D. Balslev-Clausen, M. Kirchner, J. Ye.** *Opt. Express*, **16** (2008) 2387—2397
- [90] **M. Bader, D. Tilki, G. Gratzke, R. Sroka, C. Stief, O. Reich.** *World J. Urol.*, **28** (2010) 169—172

- [91] N. Kelbauskienė, K. Baseviciene, A. Goharkhay, V. Moritz, V. Machiulskienė. *Laser. Med. Sci.*, **26** (2011) 445—452
- [92] S. Renvert, C. Lindahl, A. Jansåker, G. Persson. *J. Clin. Periodontol.*, **38** (2011) 65—73
- [93] A. Chapas, L. Brightman, S. Sukal, E. Hale, D. Daniel, L. Bernstein, R. Geronemus. *Lasers Surg. Med.*, **40** (2008) 381—386
- [94] Н. Калинцева, В. Серебряков. Волоконные системы доставки излучения для медицинских лазеров среднего ИК диапазона: требования и параметры; book.sarov.ru/wp-content/uploads/lazer-X-2017-15.pdf
- [95] Б. Тарасевич. ИК спектры основных классов органических соединений, справ. матер., МГУ им. М. В. Ломоносова (2012)
- [96] Y. Andreev, A. Ionin, I. Kinyaevsky, Y. Klimachev, A. Kozlov, A. Kotkov, A. Shaiduko. *Quantum Electron.*, **43**, N 2 (2013) 139
- [97] G. Edwards, R. Logan, M. Copeland, L. Reinisch, J. Davidson, B. Johnson, R. Maciunas, M. Mendenhall, R. Osso, J. Tribble, J. Werkhaven, D. O'Day. *Nature*, **371** (2004) 416—419
- [98] J. Youn, G. Peavy, V. Venugopalan. *Lasers Surg. Med.*, **36** (2005) 202—209
- [99] M. Heya, Y. Fukami, H. Nagats, Y. Nishida, K. Awazu. *Nucl. Instrum. Method. Phys. Res.*, **A 507**, (2003) 564—568
- [100] M. Mackanos, J. Kozub, D. Hachey, K. Joos, D. Ellis, E. Jansen. *Phys. Med. Biol.*, **50** (2005) 1885—1899
- [101] Y. Nakajima, K. Iwatsuki, K. Ishii, S. Suzuki, T. Fujinaka, T. Yoshimine, K. Awazu. *J. Neurosurg.*, **104** (2006) 426—428
- [102] H. Hazama, Y. Takatani, K. Awazu. *Proc. SPIE*, **6455** (2007) 645507
- [103] M. Mackanos, D. Simanovskii, K. Joos, H. Schwettman, E. Jansen. *Lasers Surg. Med.*, **39** (2007) 230—236
- [104] J. Kozub, B. Ivanov, A. Jayasinghe, R. Prasad, J. Shen, M. Klosner, D. Heller, M. Mendenhall, D. Piston, K. Joos, M. Hutson. *Biomed. Opt. Express*, **2** (2011) 1275—1281
- [105] G. Edwards, R. Pearlstein, M. Copeland, M. Hutson, K. Latone, A. Spiro, G. Pasmanik. *Opt. Lett.*, **32** (2007) 1426—1428
- [106] H. Rong, S. Xu, O. Cohen, O. Raday, M. Lee, V. Sih, M. Paniccia. *Nature Photon.*, **2**, N 3 (2008) 170
- [107] F. Koenz, M. Frenz, H. Prastisto, H. Weber, A. Silenok, V. Konov. *Proc. SPIE*, **2624** (1996) 67
- [108] A. Oraevsky, S. Jacques, R. Esenaliev, F. Tittel. *Laser. Surg. Med.*, **18**, N 3 (1996) 231
- [109] Г. Желтов, О. Романов, В. Бурко, Э. Соболев. *Лазер. мед.*, **20**, № 3 (2016) 96
- [110] G. Zheltov, V. Lisinetskii, A. Grabtchikov, V. Orlovich. *Appl. Opt.*, **47**, N 3 (2008) 3549
- [111] T. Hutchens, A. Darafsheh, A. Fardad, A. Antoszyk, H. Ying, V. Astratov, N. Fried. *J. Biomed. Opt.*, **19**, N 1 (2014) 018003-1—018003-8
- [112] Y. Fukami, K. Awazu. *Jpn. J. Appl. Phys.*, **42**, N 6 (2015) 3716—3721
- [113] S. Suzuki-Yoshihashi, S. Yamada, I. Sato, K. Awazu. *Proc. SPIE*, **6083** (2006) 60830I-1
- [114] В. Серебряков, Э. Бойко, Н. Петрищев, А. Ян. *Опт. журн.*, **77**, № 1 (2010) 9—23
- [115] В. Тучин. *Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях*, Москва, Физматлит (2010)
- [116] K. Hashimura, I. Katsunori, A. Kunio. *Jpn. J. Appl. Phys.*, **54**, N 11 (2015) 112701
- [117] K. Hashimura, K. Ishii, N. Akikusa, T. Edamura, H. Yoshida, K. Awazu. *Transact. Jpn. Soc. Med. Biol. Eng.*, **51**(Supplement) (2013) R-178
- [118] N. Masaki, S. Okazaki. *Biomed. Opt. Express*, **9**, N 5 (2018) 2095—2103
- [119] S. Smye, J. Chamberlain, A. Fitzgerald, E. Berry. *Phys. Med. Biol.*, **46**, N 9 (2001) R101—R112
- [120] R. Huber, F. Tauser, A. Brodschelm, M. Bichler, G. Abstreiter, A. Leitenstorfer. *Nature*, **414** (2001) 286—289
- [121] D. Bennett, Z. Taylor, P. Tewari, R. Singh, M. Culjat, W. Grundfest, E. Brown. *J. Biomed. Opt.*, **16**, N 5 (2011) 057003
- [122] D. Mittleman, M. Gupta, R. Neelamani, R. Baraniuk, J. Rudd, M. Koch. *Appl. Phys. B*, **68**, N 6 (1999) 1085—1094
- [123] D. Crawley, C. Longbottom, V. Wallace, B. Cole, D. Arnone, M. Pepper. *J. Biomed. Opt.*, **8**, N 2 (2003) 303—308
- [124] R. Woodward, P. Wallace, R. Pye, B. Cole, D. Arnone, E. Linfield, M. Pepper. *J. Investigat. Dermatol.*, **120**, N 1 (2003) 72—78

- [125] **M. Lazebnik, D. Popovic, L. McCartney, C. Watkins, M. Lindstrom, J. Harter, W. Temple.** *Phys. Med. Biol.*, **52**, N 20 (2007) 6093
- [126] **E. Pickwell, B. Cole, A. Fitzgerald, M. Pepper, V. Wallace.** *Phys. Med. Biol.*, **49**, N 9 (2004) 1595
- [127] **R. Weissleder, M. Pittet.** *Nature*, **452**, N 7187 (2008) 580
- [128] **D. Mittleman, R. Jacobsen, M. Nuss.** *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, **2** (1996) 679
- [129] **R. Woodward, B. Cole, V. Wallace, R. Pye, D. Arnone, E. Linfield, M. Pepper.** *Phys. Med. Biol.*, **47**, N 21 (2002) 3853—3863
- [130] **P. Bolivar, M. Brucherseifer, M. Nagel, H. Kurz, A. Bosserhoff, R. Büttner.** *Phys. Med. Biol.*, **47** (2002) 3815
- [131] **T. Chan, J. Bjarnason, A. Lee, M. Celis, E. Brown.** *Appl. Phys. Lett.*, **85** (2004) 2523
- [132] **R. Köhler, A. Tredicucci, F. Beltram, H. Beere, E. Linfield, A. Davies, F. Rossi.** *Nature*, **417**, N 6885 (2002) 156
- [133] **C. Worrall, J. Alton, M. Houghton, S. Barbieri, H. Beere, D. Ritchie, C. Sirtori.** *Opt. Express*, **14**, N 1 (2006) 171—181
- [134] **G. Bellisola, C. Sorio.** *Am. J. Cancer Res.*, **2**, N 1 (2012) 1
- [135] **M. Kole, R. Reddy, M. Schulmerich, M. Gelber, R. Bhargava.** *Analyt. Chem.*, **84** (2012) 10366—10372
- [136] **N. Kröger-Lui, N. Gretz, K. Haase, B. Kränzlin, S. Neudecker, A. Pucci, W. Petrich.** *Analyst*, **140**, N 7 (2015) 2086—2092
- [137] **K. Haase, N. Kröger-Lui, A. Pucci, A. Schönhals, W. Petrich.** *Faraday Discuss.*, **187** (2016) 119—134
- [138] **P. Bassan, M. Weida, J. Rowlette, P. Gardne.** *Analyst*, **139** (2014) 3856—3859
- [139] **M. Pilling, A. Henderson, P. Gardner.** *Analyt. Chem.*, **89** (2017) 7348—7355
- [140] **M. Pilling, A. Henderson, B. Bird, M. Brown, N. Clarke, P. Gardner.** *Faraday Discuss.*, **187** (2016) 135—154
- [141] **D. Lasne, G. Blab, F. De Giorgi, F. Ichas, B. Lounis, L. Cognet.** *Opt. Express*, **15** (2007) 14184—14193
- [142] **A. Gaiduk, M. Yorulmaz, P. V. Ruijgrok, M. Orrit.** *Science*, **330** (2010) 353—356
- [143] **R. Furstenberg, C. A. Kendziora, M. R. Papantonakis, V. Nguyen, R. McGill.** *Proc. SPIE Defense, Security, and Sensing*, Baltimore, MD, **9455** (2012) 945501
- [144] **A. Märtiri, A. Totachawattana, H. Liu, M. K. Hong, T. Gardner, M. Y. Sander, S. Erramilli.** *Conference on Lasers and Electro-Optics (CLEO'14)*, San Jose, CA, 8—13 June 2014 (2014)
- [145] **M. Y. Sander.** *Mid-infrared Photothermal Imaging*, in *Frontiers in Optics 2015*, San Jose, CA, 18—22 October 2015 (2015)
- [146] **G. Chebotareva.** *Laser Phys.*, **8** (1998) 941
- [147] **B. Wong, T. Milner, B. Anvari, A. Sviridov, A. Omel'chenko, V. Bagratashvili, E. Sobol, J. Nelson.** *Laser. Med. Sci.*, **13**, N 1 (1998) 66—72
- [148] **Л. Скворцов, В. Кириллов.** *Квант. электрон.*, **33**, N 12 (2003) 1113—1117
- [149] **В. Кириллов, Л. Скворцов.** *Квант. электрон.*, **36**, N 8 (2006) 797—799