

Łukasz GRYKO\*  
Andrzej ZAJĄC\*

## **ANALIZA ROZKŁADU GĘSTOŚCI MOCY W KOMORZE POMIAROWEJ DO OBIEKTYWIZACJI ZABIEGU BIOSTYMULACJI LASEROWEJ**

W artykule została przedstawiona analiza możliwości uzyskania równomiernej ekspozycji promieniowaniem z zakresu okna optycznego tkanek 600÷1000 nm próbek biologicznych – monowarstwy żywych linii komórkowych – umieszczonych w wielodołkowych laboratoryjnych szalkach Petriego. Zachowanie jednakowej gęstości mocy/energii w każdym dołku podczas napromieniowania pozwala na obiektywne porównanie odpowiedzi biologicznych komórek poddanych naświetlaniu promieniowaniem w procedurach biostymulacyjnych.

### **1. WSTĘP**

Niejednoznaczności w uzyskiwanych wynikach przeprowadzanych na całym świecie doświadczeń laserowej biostymulacji (ang. Low Level Laser Therapy) – podobna jest ilość doniesień podających pozytywne oraz negatywne efekty lub brak skutku terapeutycznego w tkankach po naświetlaniu – mobilizują do poszukiwań jednoznacznych metod doboru parametrów promieniowania laserowego, które będą powodowały oczekiwaną skuteczność terapeutyczną. Stosowane są różne źródła promieniowania – obecnie prawie wyłącznie diody LED i lasery półprzewodnikowe – o długości fali z zakresu 600÷1064 nm oraz o mocy promieniowania optycznego od kilku mW do 500 mW [1]. Parametry ekspozycji dobierane są tak, aby nie wywołać w naświetlanym ośrodku skutku termicznego – wzrost temperatury tkanki nie przekracza 1 K.

Zakłada się, że u podstaw systemu biochemicznych przemian stymulowanych i wzbudzanych promieniowaniem leżą procesy zachodzące na poziomie komórkowym i molekularnym [2, 3]. Dlatego też przyczynowo-skutkowe powiązanie parametrów promieniowania z efektami terapeutycznymi powinno zostać przeprowadzone poprzez badania żywych linii komórkowych poddanych naświetlaniu, a następnie zbadanie ich odpowiedzi biologicznych. Autorzy artykułu we współpracy z Katedrą i Zakładem Laseroterapii i Fizjoterapii oraz Katedrą

---

\* Politechnika Białostocka.

Patofizjologii UMK w Bydgoszczy przeprowadzają badania na monowarstwach linii komórkowych śródbłónka naczyniowego HUVEC.

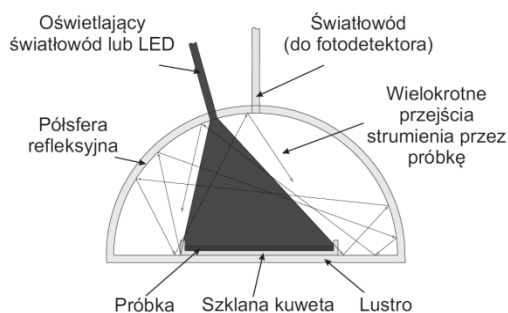
Odpowiedź komórkowa związana jest z dawką promieniowania przez nią zaabsorbowaną [4]. Zatem w celu dostosowania wielkości dawki promieniowania zaabsorbowanej przez komórki charakteryzujące się spektralnie zmiennym współczynnikiem absorpcji promieniowania niezbędne staje się opracowanie optoelektronicznego układu umożliwiającego pomiar tego parametru. Określenie spektralnego rozkładu promieniowania zaabsorbowanego przez linię komórkową o grubości rzędu pojedynczych mikronów na podstawie spektralnego rozkładu promieniowania transmitowanego bądź odbitego jest niemożliwe – niedostrzegalne są różnice między słabo oraz silnie absorbowanymi długościami fal. Względne różnice mieszczą się w zakresie 1%, czyli na granicy błędów detektora. Należy, zatem zastosować układ pozwalający na wielokrotne przejścia promieniowania przez próbkę – zwiększona zostanie ilość pochłoniętej przez nią energii. Możliwe będzie wówczas określenie widmowego współczynnika absorpcji. Uzyskana wiedza o pasmach absorpcyjnych poszczególnych biologicznych fotoakceptorów umożliwi dostosowywanie parametrów energetycznych i spektralnych wiązki promieniowania o długościach fal z zakresu okna terapeutycznego tkanek.

Do naświetlań linii komórkowych wykorzystane są półprzewodnikowe źródła promieniowania – diody laserowe oraz diody LED. Do badań opracowano szerokopasmowy oświetlacz, złożony z diod LED dużej mocy, emitujący zbliżony do jednorodnego rozkład w zakresie 600-1000 nm [1, 5] w konfiguracji pozwalającej na wielokrotne przejścia promieniowania przez próbkę. Dodatkowo układ umożliwia pomiar jej widmowego współczynnika absorpcji. W przypadku diod laserowych dopasowanie linii emisji promieniowania do maksimum widma absorpcji fotoakceptora odbywa się poprzez strojenie termiczne ( $\Delta\lambda/\Delta T=0,2-0,4$  nm/K) – takie rozwiązanie pozwala na uzyskanie pokrycia widma z przedziału 620÷990 nm za pomocą 18 laserów półprzewodnikowych o mocach 100-500 mW [1, 5].

## **2. KOMORA POMIAROWA DO OBIEKTYWIZACJI ZABIEGU BIOSTYMULACJI LASEROWEJ**

Dotychczas realizowane badania odpowiedzi tkanek (zarówno in vivo jak i in vitro) na naświetlanie niskoenergetycznym promieniowaniem laserowym często odbywają się w nieobiektywnych warunkach. Badacze nie uwzględniają geometrii oraz rozkładu natężenia promieniowania w przekroju poprzecznym wiązki użytego do naświetleń źródła. Eksperymenty przeprowadzane są poprzez: bezpośrednie naświetlenie próbek promieniowaniem emitowanym przez diodę laserową, poprzez światłowód sprzężony z diodą laserową lub poprzez soczewkowe układy optyczne sprzężone z diodą laserową [6, 7]. Niestety stosowane układy optyczne nie zapewniają równomiernego napromieniowania próbki (próbek).

W celu obiektywizacji zabiegu biostymulacji laserowej wielu próbek jednocześnie niezbędne jest zapewnienie naświetlenia promieniowaniem o jednorodnym rozkładzie powierzchniowej gęstości mocy. Naturalnym wyborem komory pomiarowej spełniającej ww. warunek jest optyczna komora całkująca [8] – kula Ulbrichta lub półsfera Ulbrichta. Realizację komory do naświetlań oparto na półsferze pokrytej warstwą o wysokim współczynniku odbicia promieniowania.



Rys. 1. Optyczny schemat komory pomiarowej umożliwiającej zwiększenie możliwości aplikacji energii do cienkiego ośrodka biologicznego

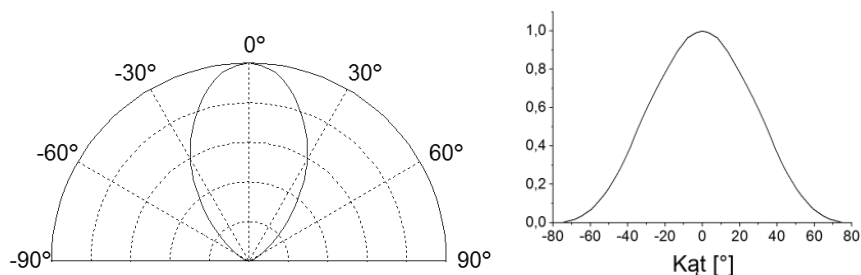
Symulacje rozkładów powierzchniowej gęstości mocy na podstawie komory pomiarowej dla wybranych warstw wysokorefleksyjnych i źródeł półprzewodnikowych o zmiennym kącie świecenia zostały przeprowadzone w programie TracePro. Powierzchnie półsfer i podstawy komory pomiarowej pokryto warstwami wysokorefleksyjnymi. Przyjęte powierzchnie do symulacji to:

- wypolerowana powierzchnia aluminium – powierzchnia objijająca lustrzanie o odbiciu równym 80% (l80),
- powierzchnia wytrawionego aluminium – powierzchnia objijająca dyfuzyjnie o odbiciu równym 80% (d80),
- powierzchnia pokryta białą farbą – powierzchnia odbijająca dyfuzyjnie o odbiciu równym 90% (d90),
- zwierciadło płaskie – powierzchnia objijająca lustrzanie o odbiciu równym 95% (l95),
- powierzchnia pokryta siarczanem baru – powierzchnia odbijająca dyfuzyjnie o odbiciu równym 99% (d99).

Bryła fotometryczna obliczona dla powierzchni odbijających dyfuzyjnie została przedstawiona na rysunku 2. Wskaźnik rozpraszania przez odbicie powierzchni odbijających dyfuzyjnie wynosi  $\sigma \approx 0,4$ :

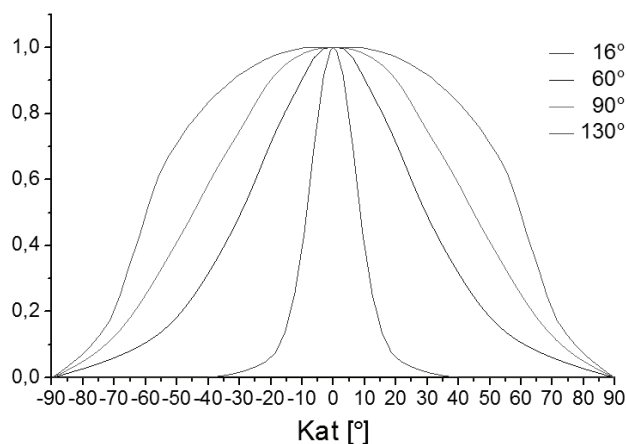
$$\sigma = \frac{L_{20} + L_{70}}{2L_5} \quad (1)$$

gdzie:  $L_5$ ,  $L_{20}$ ,  $L_{70}$  – luminancje odpowiednio pod kątem  $5^\circ$ ,  $20^\circ$  i  $70^\circ$ .



Rys. 2. Krzywa wskaźnikowa luminancji powierzchni we współrzędnych biegunowych i prostokątnych

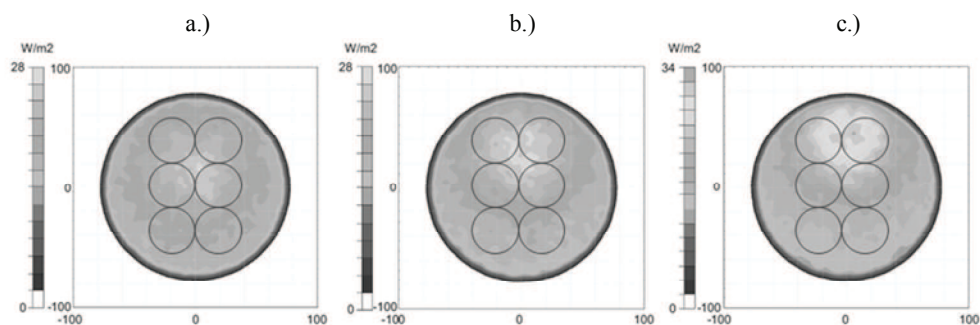
Do symulacji rozkładów przyjęto cztery źródła promieniowania o mocy 1 W i połówkowych kątach rozbieżności promieniowania  $2\alpha = 16^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $90^\circ$  i  $130^\circ$  (Rys. 3). Diody LED o kącie świecenia  $2\alpha = 130^\circ$  zamontowano bezpośrednio na kopule komory pomiarowej. Promieniowanie emitowane przez diodę laserową, wymagającą chłodzenia – chłodziarki Peltiera – wprowadzono do komory przy wykorzystaniu plastikowych światłowodów o średnicy 1-2 mm. Połwkowy kąt świecenia na wyjściu światłowodu jest równy  $2\alpha = 16^\circ$ . Średnica komory pomiarowej przyjęta do symulacji wynosi 150 mm. Do obliczeń równomierności rozkładu powierzchniowej gęstości mocy podstawa komory pomiarowej została podzielona na N kwadratowych pól o powierzchni  $1 \text{ mm}^2$ .



Rys. 3. Charakterystyka kątowa źródeł światła o kącie świecenia:  $16^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $90^\circ$  i  $130^\circ$

### 3. WPŁYW POŁOŻENIA ŹRÓDŁA NA RÓWNOMIERNOŚĆ ROZKŁADU MOCY NA PODSTAWIE KOMORY

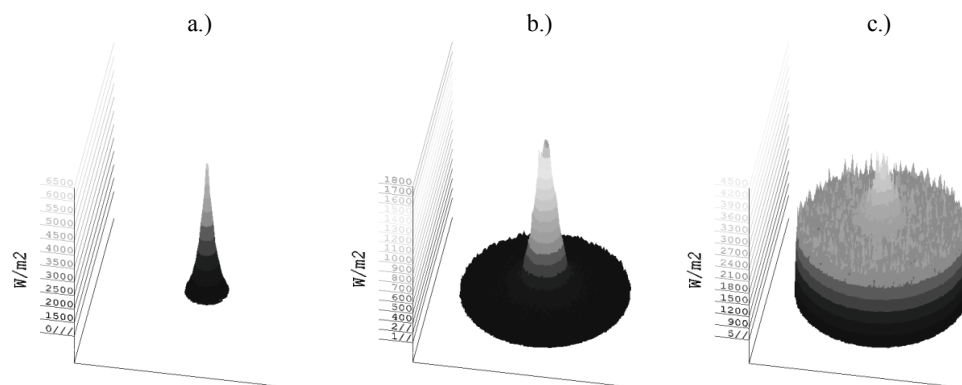
W celu wyboru optymalnego miejsca wprowadzenia promieniowania do komory pozwalającego na uzyskanie równomiernego napromieniowania jej podstawy przeprowadzono badania wpływu położenia źródła na kopule komory pomiarowej. Symulacje zostały przeprowadzone dla wybranych ścian najściabiej odbijających, co prowadzi do najmniej równomiernego rozkładu mocy na powierzchni podstawy. Analiza otrzymanych rozkładów powierzchniowej gęstości mocy na podstawie (Rys. 4) wskazuje, że źródło powinno zostać zamocowane na półsfery pod kątem nie większym niż  $30^\circ$  względem normalnej do podstawy, najlepiej  $15^\circ$ .



Rys. 4. Rozkłady powierzchniowej gęstości mocy na powierzchni podstawy odbijającej promieniowanie lustrzanie o  $R = 80\%$ , dioda LED o kącie świecenia  $2\alpha = 130^\circ$  zamontowana na wewnętrznej powierzchni dyfuzyjnie odbijającej półsfery o  $R = 80\%$  pod kątem: a.)  $15^\circ$ , b.)  $30^\circ$  i c.)  $45^\circ$  do normalnej do podstawy (czerwonymi okręgami zaznaczono położenie dołków z komórkami w szalkach laboratoryjnych, średnica dołka wynosi 35 mm)

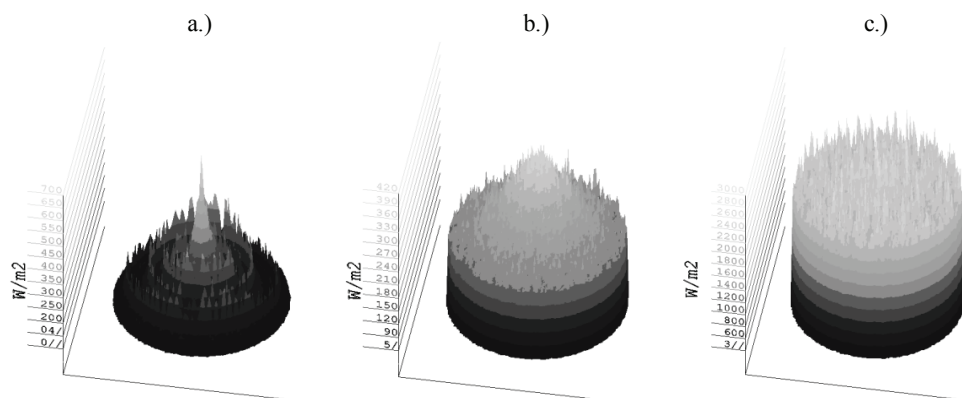
### 4. WPŁYW KĄTA ŚWIECENIA ŹRÓDŁA ORAZ RODZAJU POWIERZCHNI ODBIJAJĄCEJ NA RÓWNOMIERNOŚĆ ROZKŁADU MOCY NA PODSTAWIE KOMORY

W przypadku wprowadzenia promieniowania diod laserowych do komory pomiarowej wyjście światłowodu sprzężonego ze źródłem zamontowano na półsfery pod kątem  $15^\circ$ . Wyniki symulacji rozkładu mocy na podstawie dla takiego źródła ( $2\alpha = 16^\circ$ ) i powierzchni refleksyjnych komory o wysokich współczynnikach odbicia zostały przedstawione na rysunku 5. Uzyskane rozkłady powierzchniowej gęstości mocy na powierzchni podstawy komory dla kąta świecenia źródła równego  $2\alpha = 16^\circ$  nie są zadowalające, gdyż nie pozwalają na zastosowanie takiego układu do równomiernych naświetleń kilku próbek jednocześnie. Taki układ nie zapewni powtarzalności procedury terapeutycznej.



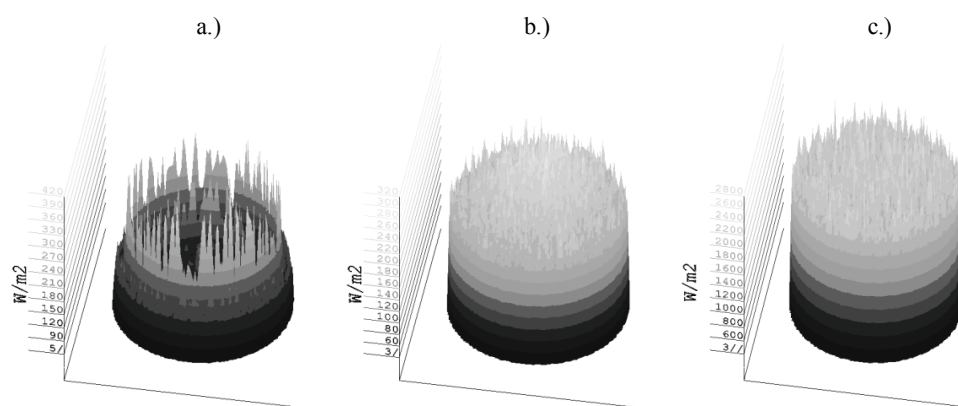
Rys. 5. Rozkłady powierzchniowej gęstości mocy na podstawie komory pomiarowej dla światłowodu sprzężonego z diodą laserową, wynosi  $16^\circ$ ; powierzchnie ścian i podstawy: a.) 180, b.) d90, c.) d99

W celu osiągnięcia mniejszej nierównomierności rozkładu na podstawie należy zwiększyć kąt rozbieżności wiązki wyjściowej ze światłowodu. Optymalnie procedura ta może zostać zrealizowana poprzez wstawienie soczewki kulkowej z materiału optycznego o wysokim współczynniku załamania światła  $n$ . Soczewka szafirowa o  $n = 1,77$  umożliwia zwiększenie kąta  $2\alpha$  w takim układzie do ok.  $60^\circ$ . Wyniki przeprowadzonych symulacji potwierdzają wzrost równomierności rozkładu powierzchniowej gęstości mocy na podstawie (Rys. 6). Satisfakcjonująca nierównomierność (poniżej 15%) uzyskana została już dla powierzchni dyfuzyjnej o  $R = 90\%$  na podstawie i powierzchni dyfuzyjnej  $R = 99\%$  na kopule, tabela 1.



Rys. 6. Rozkłady powierzchniowej gęstości mocy na podstawie komory pomiarowej dla układu z soczewką, kąt świecenia wynosi  $60^\circ$ , powierzchnie ścian i podstawy: a.) 180, b.) d90, c.) d99

Przeprowadzono również symulacje przy wykorzystaniu diody LED zamocowanej na kopule komory pomiarowej pod kątem 15° do normalnej do podstawy. Celem symulacji było zbadanie rozkładów powierzchniowej gęstości mocy na podstawie dla wiązki o szerokim kącie świecenia  $2\alpha$ . Bezpośrednio oświetlana jest wówczas nie tylko podstawa komory pomiarowej jak to miało miejsce dla diody laserowej, ale również ściany kopuły. Wyniki symulacje zostały przedstawione na rysunku 7. Satysfakcjonującą nierównomierność (poniżej 15%) uzyskana została już dla powierzchni lustrzanej o  $R = 80\%$  na podstawie i powierzchni dyfuzyjnej  $R = 80\%$  na kopule, tabela 1.



Rys. 7. Rozkłady powierzchniowej gęstości mocy na podstawie komory pomiarowej dla diody LED, kąt świecenia wynosi 130°, powierzchnie ściany i podstawy: a.) l80, b.) d90, c.) d99

W tabeli 1 zestawiono wyniki symulacji: zwiększenia energii padającej na podstawę i zaabsorbowanej w próbce w porównaniu do bezpośredniego naświetlania, a także nierównomierności rozkładu gęstości mocy na podstawie w porównaniu do średniej gęstości mocy na podstawie. Nierównomierność rozkładu powierzchniowej gęstości mocy  $f_{sr}$  została obliczona według wzoru:

$$f_{sr} = \frac{\sum_{i=1}^n |Y_i - Y_{sr}|}{(N - 1)Y_{sr}} \quad (2)$$

gdzie:  $Y_i$  – gęstość mocy w  $i$ -tym kwadratowym polu podstawy;  $Y_{sr}$  – średnia gęstość mocy na podstawie;  $N$  – ilość kwadratowych pól o rozmiarze 1x1 mm.

Eksperyment przeprowadzony na cienkich próbkach biologicznych przy wykorzystaniu komory pomiarowej o wysokim współczynniku odbicia jej ścian pozwala na zwiększenie ilości zaabsorbowanego promieniowania przez próbki w porównaniu do bezpośredniego naświetlania co najmniej 3-krotnie (w zależności od wartości współczynnika odbicia powierzchni komory), co dodatkowo pozwala na zmniejszenie mocy źródła, a zatem i jego kosztu.

Tabela 1. Zwiększenie w porównaniu do bezpośredniego naświetlania energii padającej na podstawę i zwiększenie energii zaabsorbowanej w próbce oraz nierównomierność gęstości mocy na podstawie dla różnych materiałów pokrywających powierzchnię półsferyczną i podstawę komory pomiarowej, a także dla różnych kątów rozbieżności wiązki promieniowania wprowadzonego do komory pomiarowej

Kąt rozbieżności wiązki	Podstawa	180	180	d80	195	d90	195	d90	195	d99
	Sfera	180	d80	d80	d80	d90	d90	d99	d99	d99
16°	Zysk [%]	164	115	115	173	280	349	749	1328	3288
	Zysk abs [%]	375	286	286	432	622	775	1513	2685	6642
	$f_{sr}$ [%]	126,6	70,4	68,9	56,2	39,9	35,2	20,0	15,4	12,0
60°	Zysk [%]	111	96	96	149	262	327	744	1321	3271
	Zysk abs [%]	281	252	252	385	588	733	1504	2670	6608
	$f_{sr}$ [%]	38,6	24,9	24,9	20,7	15,1	14,5	10,8	9,7	10,1
90°	Zysk [%]	101	90	90	141	256	320	743	1319	3264
	Zysk abs [%]	261	242	241	371	577	719	1502	2666	6595
	$f_{sr}$ [%]	27,2	17,4	17,9	15,4	11,9	12,1	9,1	9,3	10,2
130°	Zysk [%]	79	78	78	126	245	307	740	1314	3253
	Zysk abs [%]	222	220	220	341	555	693	1496	2657	6573
	$f_{sr}$ [%]	29,4	12,9	13,3	12,2	10,0	9,5	8,7	9,1	10,2

Wykorzystanie światłowodu detekcyjnego zamontowanego na komorze i sprzężonego z nim scalonego spektrometru umożliwia bezpośredni pomiar widma promieniowania zaabsorbowanego przez próbkę poprzez analizę różnic widm: promieniowania odbitego w pustej komorze pomiarowej oraz promieniowania odbitego w komorze z próbką biologiczną. Pomiar mocy promieniowania odbitego w komorze wykonane przy wykorzystaniu miernika mocy pozwalają natomiast określić ilość dawki energii dostarczonej komórkom. Do tej pory takie działania nie zostały podjęte przez naukowców zajmujących się badaniami LLLT.

## 5. PODSUMOWANIE

Komora pomiarowa w postaci półsfery ze ścianami pokrytymi warstwami wysokorefleksyjnymi, przy odpowiednim doborze współczynników odbicia powierzchni półsfery i podstawy oraz kąta rozbieżności wiązki promieniowania wprowadzonego do komory zapewnia równomierny rozkład powierzchniowej gęstości mocy na podstawie, co potwierdzono przeprowadzonymi symulacjami. Układ taki może być wykorzystany do równomiernego napromieniowania komórek hodowanych w laboratoryjnych szalkach – dostarczona gęstość mocy/energii dla komórek w poszczególnych dołkach szalki jest taka sama. Badania przy wykorzystaniu omówionego rozwiązania mogą być przeprowadzane w warunkach umożliwiających weryfikację wyników ekspozycji próbek oraz standaryzację procedur naświetlania w przeciwieństwie do dotychczas stosowanych procedur naświetlania.



## LITERATURA

- [1] Gryko Ł., Zając A., Szymańska J., „Nowe emitery i detektory w urządzeniach do terapii LLLT”, *Przegląd Elektrotechniczny*, 32-35, 11b/2012.
- [2] Karu T., “Primary and secondary mechanisms of action of visible-to-near IR radiation on cells”, *J. Photochem. Photobiol. B Biol.*, 1-17, vol. 49, no. 1, 1999.
- [3] Schroeder P., Pohl C., Marks C., Calles C., Wild S., Krutmann J., “Cellular response to infrared radiation involves retrograde mitochondrial signaling”, *Free Radic. Biol. Med.*, 128-135, vol. 43, no. 1, 2007.
- [4] Kassák P., Sikurová L., Kvasnicka P., Bryszewska M., “The response of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase of human erythrocytes to green laser light treatment”, *Physiol Res.*, 189-194, vol. 55, no. 2, 2006.
- [5] Gryko Ł., Gilewski M., Szymańska J., Zając A., Roś D., “The concept of the set to objectification of LLLT exposure”, *Proc. SPIE 8703, Laser Technology 2012: Applications of Lasers*, 870302.
- [6] Karu T.I., Kolyakov S.F., “Exact action spectra for cellular responses relevant to phototherapy”, *Photomedicine and Laser Surgery*, 355-361, vol. 23, no. 4, 2005.
- [7] Vinck E., Cagnie B., Cornelissen M., Declercq H., Cambier D., “Increased fibroblast proliferation induced by light emitting diode and low power laser irradiation”, *Lasers in Medical Science*, 95-99, vol. 18, no. 2, 2003.
- [8] Karrer E., “The use of the Ulbricht sphere in measuring reflection and transmission factors”, *Journal of Optical Society of America*, 96-119, Vol. 5, no. 1, 1921.



Publikacja współfinansowana ze środków Unii Europejskiej w ramach Europejskiego Funduszu Społecznego.

### ANALYSIS OF POWER DENSITY DISTRIBUTION IN THE MEASURING CHAMBER TO OBJECTIFY LASER BIOSTIMULATION TREATMENT

This article presents analysis capabilities to obtain uniform radiation exposure of biological samples placed in laboratory multiwall Petri dishes. Living monolayer cell lines are subjected to biostimulation procedures by radiation from range of tissue optical window 600 ÷ 1000 nm. Maintaining equal power/energy density in each well during irradiation allows for an objective comparison of the biological response of irradiated cells.