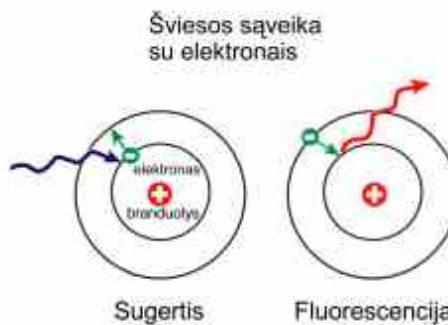


5. Fluorescencijos dėsningumai

5.1 Fotono ir molekulės sąveika

Visi fotofizikiniai ir fotocheminiai vyksmai prasideda audinio molekulei sugėrus šviesos fotoną. Molekuliniu lygmeniu šviesos ir audinio sąveika yra aprašoma kaip šviesos dalelės, kitaip tariant fotono, ir audinį sudarančių molekulių sąveika.

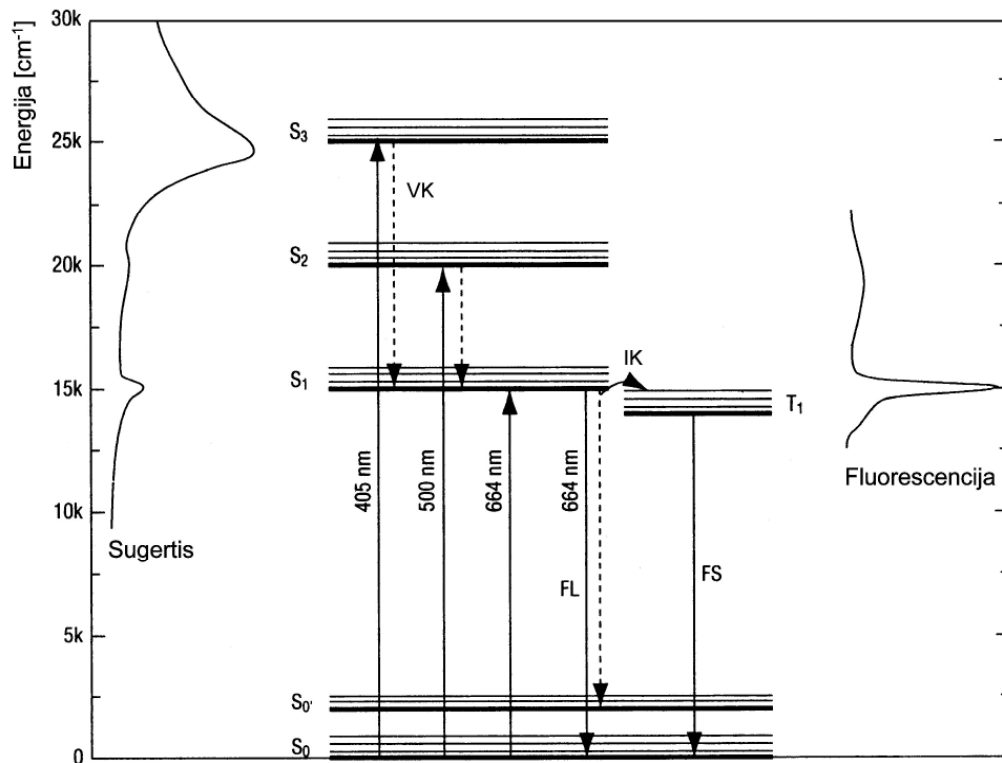
Fotonai sąveikauja su atomų ir molekulių elektroniniais apvalkalais (debesėliais). Sugerties (absorbcijos) vyksmo metu fotonas atiduoda savo energiją molekulei, ir ši tampa elektroniškai sužadinta. Vandenilio atomo sąveika su šviesos fotonu pavaizduota 5.1 paveiksle. Sugerties metu fotonas perduoda energiją vandenilio elektronui, kuris peršoka iš pagrindinio atomo lygmens į aukštesnės energijos lygmenį. Taip atomas tampa sužadintosios būsenos (įvyksta šviesos sugertis). Sužadintoji atomo būseną yra nestabili, todėl elektronas grįžta į pagrindinę būseną, atiduodamas energijos perteklių aplinkai, arba išspinduliuodamas šviesos kvantą (įvyksta fluorescencija).



5.1 Šviesos sąveika su vandenilio atomo elektronais

Elektronai atomuose ir molekulėse gali egzistuoti būdami tam tikros energinės būsenos, kuri yra vadinama energijos lygmeniu (orbitale). Pagrindinės būsenos molekulės visos molekulinės orbitalės yra užpildytos elektronų poromis. Pagal Pauli draudimo principą, viename energiniame lygmenyje gali būti tik du elektronai, turintys skirtingus sukinius, todėl pagrindinės būsenos suminis sukinytis lygus nuliui. Sužadintos molekulės išorinio apvalkalo elektronas peršoka į aukštesnę orbitale. Elektronų sukiniai gali būti orientuoti ta pačia arba priešinga kryptimi. Todėl sužadinta molekulė gali būti dvejopų būsenų, kurių suminiai sukinių kvantiniai skaičiai yra 0 ir 1. Išoriniame arba vidiniame magnetiniame lauke pirmuoju atveju sukinių projekcija gali įgyti vieną kvantinio skaičiaus vertę (0), antruoju – tris vertes (–1, 0 ir 1), todėl šios būsenos atitinkamai vadinamos singuletinėmis ir tripletinėmis. Paprastai daugiaatomių molekulių pagrindinės būsenos yra singuletinės. Išimtį sudaro kai kurios dviatomės molekulės (pavydžiui,

deguonis O₂), kurių pagrindinė būseną yra tripletinė. Daugiaatomių molekulių elektronų šuoliai ir galimi spinduliniai ir nespinduliniai vyksmai paprastai aiškinami pasitelkiant lenkų mokslininko Jablonskio (1898–1980) pasiūlytą energijos lygmenų diagramą (5.2 pav.). Kiekvienai daugiaatomei molekulei yra būdinga tam tikra energinių lygmenų sistema, o kiekvienas energinis lygmuo turi daug virpesinių rotacinių polygmenų. Sužadintos šviesa medžiagos molekulės iš pagrindinės singuletinės S₀ būsenos peršoka į aukštesnes sužadintas singuletines būsenas (S_(1...n)) (5.2 pav.).



5.2 pav. Porfirinės kilmės molekulių Jablonskio diagrama. Ištinės linijos nurodo spindulinius vyksmus, trūkios linijos – nespindulinius. S_i – singuletinės būsenos; T_i – tripletinės būsenos; VK – vidinė konversija; IK – interkombinacinė konversija; FL – fluorescencija; FS - fosforescencija

Šviesos fotonų sugertis (arba sugertos šviesos spalva) yra skirtinga įvairioms molekulėms ir priklauso nuo molekulės elektroninių būsenų sandaros. Optines atomo ar molekulės savybes nulemia jų elektronų šuoliai iš energiškai aukščiausios arba išorinės užpildytos orbitalės (pagrindinės būsenos) į aukštesnes neužpildytas molekulės orbitales.

Kad sąveikos metu įvyktų fotono sugertis, energinis skirtumas tarp aukščiausios užpildytos elektronais orbitalės ir aukštesnių elektronais neužpildytų orbitalių turi atitikti su molekule sąveikaujančio fotono energiją, t. y. molekulę sužadinti gali tik tas fotonas, kurio energija lygi šių molekulės elektroninių lygmenų energijų skirtumui:

$$E_{\text{fotono}} = h\nu = E_2 - E_1 = \Delta E; \quad (5.1)$$

čia h yra Planko konstanta, ν – fotono dažnis, E_1 ir E_2 – molekulės nesužadintosios ir sužadintosios būsenų energijos.

Elektroninių būsenų energijų skirtumai tiksliai apibrėžti atomams, todėl jų sugerties spektrai yra siaurų linijų rinkinys. Molekulės yra sudarytos iš daugelio tam tikra tvarka išsidėsčiusių atomų, kurie tam tikrose ribose gali judėti, sukis, keisti tarpusavio padėtį. Dėl to molekulėse atsiranda virpesiniai ir rotaciniai elektroninių lygmenų polygmenys, ir molekulių sugerties spektras yra ne siaurų linijų rinkinys, o plačios juostos.

Sugerties metu fotonas savo energiją atiduoda molekulei, ir ši tampa elektroniškai sužadinta (5.2 pav.). Kambario temperatūroje praktiškai visos molekulės yra pagrindinės (nesužadintos) būsenos. Tai būseną, kai molekulės energija mažiausia ir visi elektronai išsidėstę energiškai žemiausiuose molekulės lygmenyse. Aukščiausia elektronais užpildyta orbitalė vadinama S_0 lygmeniu. Sužadinus molekulę elektronas iš aukščiausio užpildyto lygmens (S_0) peršoka į aukštesnį neužpildytą energinį lygmenį ($S_{(1...n)}$), turintį didesnę energiją; tokiu būdu molekulė yra sužadinama, tai reiškia, kad ji turi energijos perteklių, kurį atitinkamu pavidalu perduoda aplinkai grįždama į pagrindinę būseną.

Jablonskio daugiaatomės molekulės lygmenų diagramoje (5.2 pav.) pažymėti galimi elektronų šuoliai bei sužadintos molekulės energijos praradimo keliai. Sužadintos molekulės elektronas iš aukštesnių didesnės energijos lygmenų per labai trumpą laiką (10^{-13} s) nespinduliniu būdu peršoka į energiškai žemiausio sužadintojo elektroninio lygmens nulinį virpesinį polygmenį, atiduodamas aplinkai energiją šilumos pavidalu (virpesinė relaksacija). Nespindulinis šuolis tarp elektroninių lygmenų vadinamas vidine konversija. Iš žemiausio sužadintojo elektroninio lygmens S_1 galimi trys relaksacijos vyksmai: vidinė konversija $S_1 \rightarrow S_0$ (energija atiduodama aplinkai šilumos

pavidalu) (5.2 pav. VK), interkombinacinė konversija $S_1 \rightarrow T_1$ (elektronas peršoka į tripletinę energinę būseną, iš kurios molekulė gali inicijuoti fotocheminius vyksmus, kurie fotosensibilizuotos terapijos atveju sukelia vėlesnę ląstelės žūtį) (5.2 pav. IK) ir fluorescencija (molekulės sugrįžimas į pagrindinę S_0 būseną išspinduliuojant fotoną) (5.2 pav. FL). Molekulės grįžimas iš tripletinės T_1 į pagrindinę S_0 būseną išspinduliuojant energiją šviesos pavidalu vadinamas fosforescencija (5.2 pav. FS).

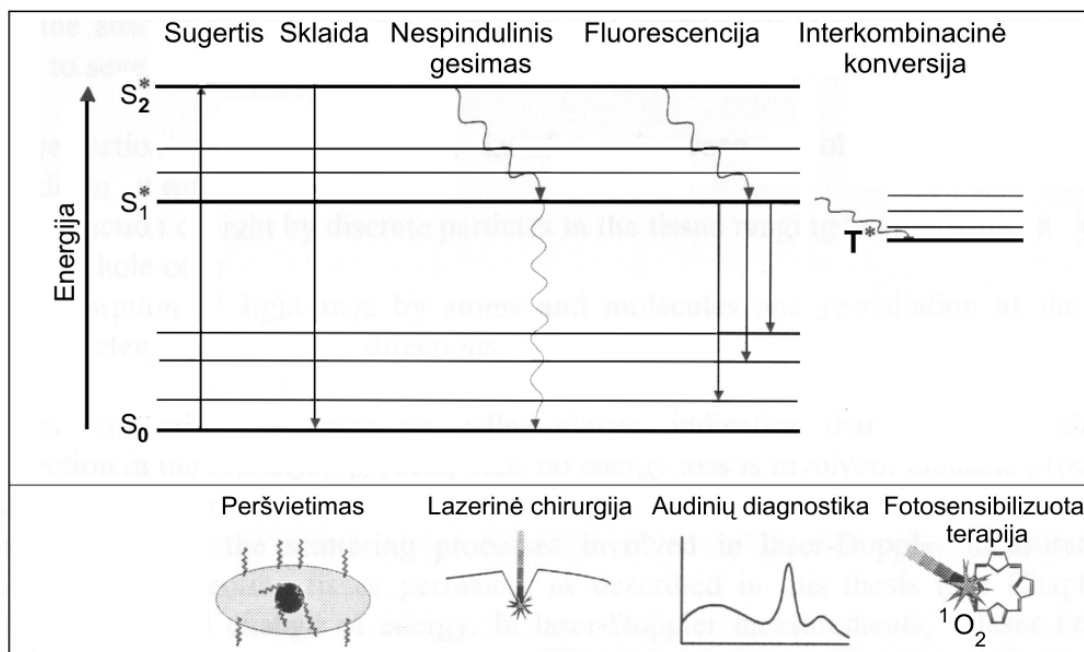
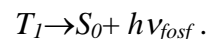
Šių vyksmų tikimybės priklauso nuo energinio tarpo ΔE tarp S_1 ir S_0 lygmenų. Kuo ΔE didesnis, tuo vidinės konversijos $S_1 \rightarrow S_0$ tikimybė mažesnė, o fluorescencijos tikimybė didesnė. Dėl šios priežasties molekulės, kurių pagrindinės sugerties juostos yra raudonojoje arba artimojoje infraraudonojoje spektro srityje (700-1200 nm) paprastai fluorescuoja silpnai arba visai nefluorescuoja. Taigi fluorescencijos tikimybė (drauge ir kvantinis našumas) priklauso nuo konkuruojančių vyksmų, kurie mažina sužadintojo S_1 lygmens užpildą.

Toliau pateikiamas trumpas optinio sužadinimo sukeltų vyksmų apibūdinimas (skliaustuose nurodytos vyksmų spartos konstantų k apytikslės vertės; $k = 1/\tau$, čia τ yra vyksmo trukmė):

- sužadinimas – fotono sugertis
 $(k_Z \sim 10^{18} \text{ s}^{-1})$ $h\nu_0 + S_0 \rightarrow S_1 (S_2, \dots, S_n);$
- vidinė konversija – nespindulinis sugerto fotono energijos praradimas
 $(k_{VK} \sim 10^{15} - 10^{13} \text{ s}^{-1})$ $S_n, \dots, S_2 \rightarrow S_1 + \text{šiluma};$
- vidinė konversija – nespindulinis sugerto fotono energijos praradimas
 $(k_{VK} \sim 10^{10} \text{ s}^{-1})$ $S_1 \rightarrow S_0 + \text{šiluma};$
- interkombinacinė konversija – molekulės šuolis iš singuletinės būsenos į tripletinę, iš kurios prasideda pirminiai fotocheminiai vyksmai
 $(k_{ST} \sim 10^7 \text{ s}^{-1})$ $S_1 \rightarrow T_1 + \text{šiluma};$
- vidinė konversija – nespindulinis sugerto fotono energijos praradimas
 $(k_T \sim 10^{-2} - 10^2 \text{ s}^{-1})$ $T_1 \rightarrow S_0 + \text{šiluma};$
- fluorescencija – sugerto fotono energijos praradimas išspinduliuojant fluorescencijos fotoną
 $(k_{fl} \sim 10^8 - 10^{11} \text{ s}^{-1})$ $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu_{fl};$

- fosforescencija – sugerto fotono energijos praradimas išspinduliuojant fosforescencijos fotoną

$$(k_{fosf} < 10^6 \text{ s}^{-1})$$



5.3 pav. Molekulės energinių lygmenų schema, rodanti galimus vyksmus molekulei sugėrusi fotoną. Paveikslo apačioje – vyksmų panaudojimas

5.2 Šviesos ir audinio sąveikos sukelti vyksmai

Šviesos ir biologinio objekto, ar tai būtų paskira ląstelė, ar visas audinys, sąveika yra sudėtingas procesas, dažnai sukeliantis visą seką fizikinių, cheminių, termininių ir mechaninių vyksmų, kurie gali būti panaudoti diagnostikos ir gydymo tikslais (5.3 pav.) (plačiau žr. Niemz, 2004). Šviesos sukelti vyksmai prasideda, kai biologinio objekto arba specialiai į organizmą įterptos jautrumą šviesai padidinančios medžiagos komponentai sugeria šviesos fotoną. Tai gali įvykti tada, kai fotono energija yra lygi energijos skirtumui tarp dviejų chromoforo (šviesą sugeriančio junginio) energijos lygmenų (5.3 pav.). Sugėrusi fotono energiją molekulė sužadinama į aukštesnį lygmenį (S_2^*), iš kurio nespindulinės relaksacijos būdu grįžta į žemesnį sužadintąjį lygmenį (S_1^*). Iš šio trumpai gyvuojančio žemesniojo sužadintojo lygmens gali prasidėti tokie vyksmai: nespindulinė

relaksacija, fluorescencija arba interkombinacinė konversija. Sužadintoms molekulėms grįžtant į pagrindinę būseną (S_0) nespinduliniu būdu vyksta šilumos išskyrimas, kuris panaudojamas terminiai lazerių terapijai ir chirurgijai. Kai molekulė iš žemiausiojo sužadintojo lygmens (S_1^*) grįžta energijos perteklių išspinduliuodama į aplinką, vyksta fluorescencijos reiškinys, kuriuo pagrįstos įvairios medicininės diagnostikos metodikos.

Fotosensibilizuotos terapijos atveju į organizmą įterpiami egzogeniniai chromoforai – fotosensibilizatoriai. Fotosensibilizatoriai paprastai yra heterociklinių žiedų struktūros medžiagos, kurių tripletinės būsenos gyvavimo laikas ilgas. Iš trumpai gyvuojančio sužadintojo singuletinio lygmens (S_1^*) sensibilizatoriaus molekulės interkombinacinės konversijos būdu gali peršokti į tripletinį lygmenį (T^*), kurio gyvavimo trukmė yra ilgesnė (5.3 pav.). Šios būsenos sensibilizatorius gali inicijuoti ląstelių žūtimi pasibaigiančias fotochemines reakcijas. Taip sukeliama fotosensibilizuoti vyksmai, kurie naudojami gydant vėžį (Rotomskis ir kt., 2002).

5.3 Fluorescencinė spektroskopija

Kaip matyti Jablonskio diagramoje (5.2 pav.) išspinduliuotos fluorescencijos energija yra mažesnė už sugertos šviesos energiją. Taigi šviesa sužadintas fluoroforas fluorescuoja mažesnės energijos, t. y. ilgesnių bangų, šviesą. Pirmasis šį reiškinį 1852 metais Kembridže pastebėjo anglų mokslininkas G.G. Stoksas (Stokes, 1852). Žadinimo šviesos šaltiniu jam buvo Saulės šviesa, iš kurios mėlyno stiklo filtru išskirtas trumpesnių bangų pluoštas buvo nukreiptas į chinono tirpalą. Per kitą – geltono stiklo – filtrą, kuris praleido tik ilgesnes šviesos bangas, mokslininkas stebėjo chinono fluorescenciją, kurios bangų ilgis 450 nm. Taigi išspinduliuota šviesa (fluorescencija) žadinančios (sugertos) šviesos atžvilgiu yra pastumta į ilgesnių bangų pusę. Šis reiškinys pavadintas Stokso poslinkiu (5.4 pav.). Jis yra susijęs su vidinės konversijos metu prarasta energija. Fluorescuojančių molekulių tirpaluose tarp sužadinimo ir spinduliavimo susidaro neišvengiami energijos nuostoliai. Pagrindinė priežastis yra ta, kad sužadinta molekulė greitai grįžta į žemiausią S_1 lygmens virpesinį polygmenį, iš kurio ir vyksta fluorescencija. Taigi yra išspinduliuojama tik dalis sugertos energijos, o kita dalis sukaupiama molekulėse perteklinės šiluminės energijos forma, kuri atiduodama aplinkai.

Fluorescencijos reiškinio atradimas nesulaukė didesnio dėmesio iki dvidešimtojo amžiaus pradžios, kai buvo pradėtos tirti potencialios fluorescencijos galimybės ir jų panaudojimas medicininės diagnostikos tikslais. Kadangi sužadinta molekulė sugerto šviesos kvanto energiją išspinduliuoja šviesos, kurios savybės yra specifinės kiekvienai molekulei ir priklauso nuo ją supančios aplinkos, pavidalu, fluorescencija dažnai vadinama molekulių arba iš jų sudarytos medžiagos “pirštų atspaudu”. Fluorescencinių matavimų rezultatai suteikia daug vertingos informacijos apie biologinių objektų sudėtį, struktūrą ir tarpusavio sąveikas.

Fluorescencinės spektroskopijos metodas apima fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrų matavimą. Įvairiems klinikinės diagnostikos tikslams sukurtos specifiskai pritaikytos sistemos, kurios leidžia įvertinti įvairius fluorescencijos parametrus: fluorescencijos intensyvumą, spektrų formą ir fluorescencijos gyvavimo trukmę.

Fluorescencijos spektras gaunamas žadinant molekules reikiamos šviesos šaltinio spinduliuote. Žadinimui parenkama tokio bangos ilgio šviesa, kurią sugeria žadinamos medžiagos molekulės. Fluorescencijos spektras matuojamas per visą emisijos intervalą, žadinant vieno bangos ilgio šviesa. Taip išmatuotas fluorescencijos spektras parodo fluorescencijos intensyvumo priklausomybę nuo matavimo bangos ilgio (5.4 pav.). Matuojant biologinio audinio fluorescencijos spektrą gaunama visų sužadintų audinio fluoroforų superpozicija.

Kartais diagnostikos tikslais patogiau matuoti fluorescencijos žadinimo spektrą. Šiuo atveju yra keičiamas žadinimo bangos ilgis, o spektras matuojamas esant fiksuotam bangos ilgiui. Sveikų ir navikinių audinių fluorescencijos žadinimo spektrų skirtumai gali padėti diagnozuoti vėžį.

Informacijos gali suteikti ir du svarbūs fluoroforų parametrai: fluorescencijos gyvavimo trukmė ir fluorescencijos kvantinis našumas.

Vidutinis laikas, kurį gyvuoja sužadintosios būsenos molekulė, vadinamas fluorescencijos gyvavimo trukme τ ; ji priklauso nuo fluorescencijos gesimo būdo.

Paprastas fluorescencijos gesimas yra eksponentinis vyksmas, kurio greičio konstanta k ir kuris nusako fluorescencijos intensyvumo I silpnėjimą $I = I_0 e^{-kt}$, kai I_0 yra pradinis fluorescencijos intensyvumas ($t = 0$). Greičio konstanta yra dviejų konstantų suma: k_{sp} – spindulinio gesimo konstantos (gesimo trukmė τ_{sp}) ir k_{nosp} – nespindulinio gesimo konstantos (gesimo trukmė τ_{nosp}). Taigi

$$k = k_{sp} + k_{nosp} = 1/\tau_{sp} + 1/\tau_{nosp} = 1/\tau \quad (5.2)$$

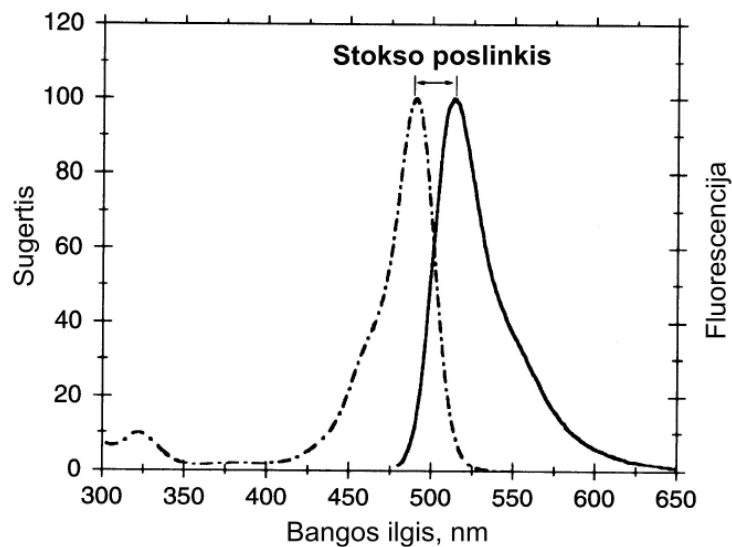
$$I = I_0 e^{-t/\tau}$$

Fluorescencijos gesimas aprašomas eksponentine funkcija, kurios rodiklis ir nurodo fluorescencijos gyvavimo trukmę. Daugelio molekulių fluorescencijos gyvavimo trukmė yra nanosekundžių eilės.

Fluorescencijos kvantinis našumas yra per tą patį laiką išspinduliuotų N_{fl} ir sugertų N_s fotonų santykis:

$$\varphi_{kv} = N_{fl}/N_s \quad (5.3)$$

Kai nevyksta jokie kiti nespindulinės relaksacijos vyksmai, fluorescencijos kvantinis našumas lygus 1. Tai reiškia, kad sužadinimo energija išspinduliuojama tik fluorescencijos pavidalu. Toks yra idealios fluorescencijos atvejis. Taigi fluoroforai, kurie galėtų būti naudojami kaip fluorescenciniai žymekliai, turėtų turėti vienetai artimą



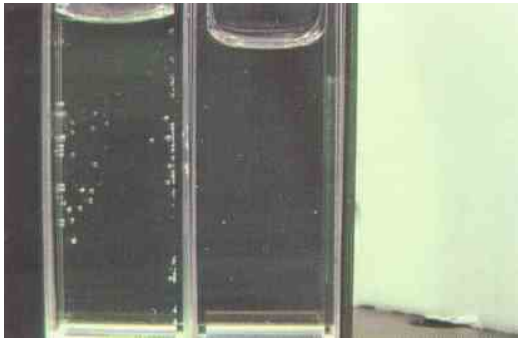
5.4 pav. Fluoresceino sugerties ir fluorescencijos spektras (pH 9)

fluorescencijos kvantinį našumą. Nors daugelio endogeninių fluoroforų kvantinis našumas nėra didelis, fluorescencinė spektroskopija yra labai jautrus matavimo metodas. Naudojant gerą fluorescencinės spektroskopijos aparatūrą, pagal būdingus fluorescencijos spektrus įvairiose terpėse galima aptikti net ir labai mažos koncentracijos fluoroforus. Fluorescencijos kvantinis našumas yra geras parametras, padedantis įvertinti biologinės aplinkos įtaką fluoroforui.

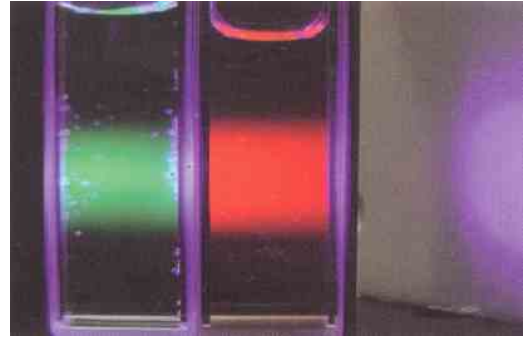
5.4 Biologinių audinių fluorescencija

Optiškai biologinis audinys yra “tamsi aplinka”, kadangi joje vyrauja šviesos sugertis ir sklaida. Fluorescencijos kvantinis našumas yra labai mažas, todėl plika akimi biologinis audinys atrodo nefluorescuojantis, nes fluorescenciją užgožia šviesos sklaida ir sugertis.

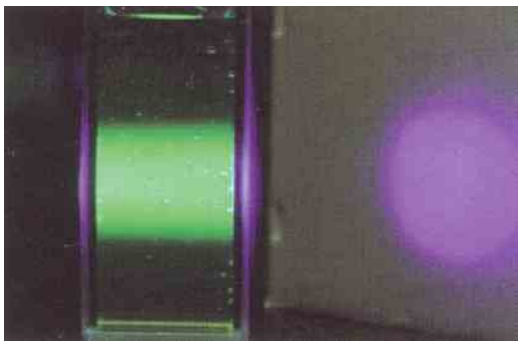
Dėl šių priežasčių audinių fluorescencijos matavimai labai skiriasi nuo gryną dažiųjų tirpalų fluorescencijos matavimų. Šiuos skirtumus gerai iliustruoja 5.5–5.9 paveikslai. Jeigu kiuvetės pripildytos žadinančios šviesos nesugeriančio tirpiklio, tai fluorescencijos nematyti ir kiuvetės atrodo skaidrios (5.5 pav.). Įdėjus į vieną kiuvetę žaliai fluorescuojančio fluoresceino, į kitą – raudonai fluorescuojančio hematoporfirino ir apšvietus kiuvetes mėlyna šviesa, kurią sugeria tiek vienas, tiek kitas dažiklis, toje kiuvetės vietoje, kur eina šviesos srautas, bus matoma žalios spalvos fluoresceino ir raudonos spalvos hematoporfirino fluorescencija, išspinduliuojama visomis kryptimis (5.6 pav.). Pagal fluorescencijos spalvą galima lengvai nustatyti, kurioje kiuvetėje kuri medžiaga yra ištirpusi.



5.5 pav. Skaidrūs mažos koncentracijos fluoresceino ir hematoporfirino tirpalai



5.6 pav. Mėlynos žadinimo šviesos pluoštas sužadina tirpalų fluorescenciją



5.7 pav. Fluoresceino tirpalas prieš įdedant šviesą sklaidančios medžiagos



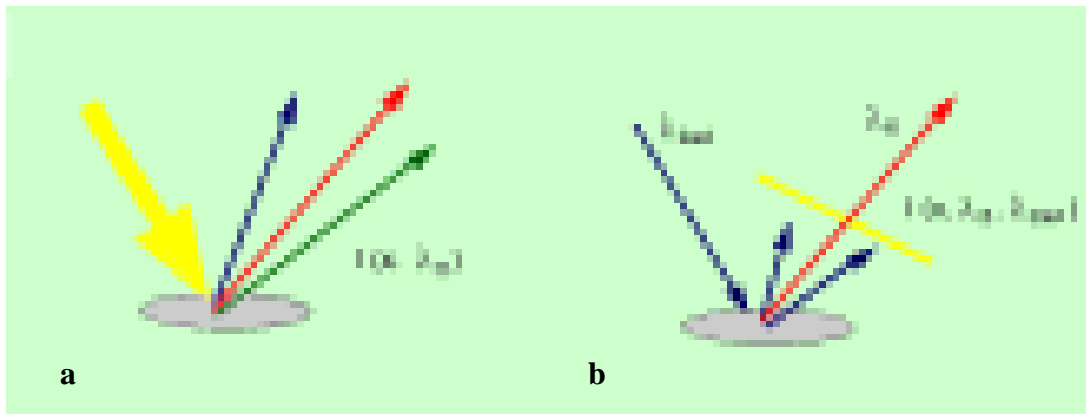
5.8 pav. Išsklaidyta žadinimo šviesa slopina fluorescenciją



5.9 pav. Pastatius išsklaidytos žadinimo šviesos nepraleidžiantį filtrą, vėl matoma žalia tirpalo fluorescencija

Už kiuvečių pastatytas ekranas nusidažys mėlynai toje vietoje, į kurią krinta kiuvetes perėjęs šviesos srautas. Tai nuo ekrano atsispindi likusi dalis mėlynos žadinimo šviesos, kurios nesugėrė tirpalai.

Biologinio audinio sklaidos imitacijai į kiuvetę su fluoresceinu įpilti keli lašai pieno. Pienas nesugeria matomos šviesos, o pats jis yra baltas todėl, kad gerai išsklaido visų bangos ilgių (kitais tariant, visų spalvų) regimąją šviesą. Įlašinus pieno žalia fluoresceino fluorescencija, gerai matoma 5.7 paveiksle, dinga (5.8 pav.). Dingo ir ekrane matyta bandinį perėjusios mėlynos šviesos dėmė, o visas ekranas nusidažė išsklaidyta mėlyna šviesa. Ryški išsklaidyta žadinimo šviesa paslėpė fluoresceino fluorescenciją; kartu dingo galimybė iš žalios fluoresceino fluorescencijos aptikti jo buvimą kiuvetėje. Žaliai fluoresceino fluorescencijai vėl pamatyti panaudotas tik žalią šviesą praleidžiantis filtras (5.9 pav.) Pastaciaus prieš kiuvetę tokį filtrą, nepraleidžiantį išsklaidytos mėlynos fluoresceiną žadinančios šviesos, vėl išryškėja žalia fluoresceino fluorescencija, kuri patvirtina, kad kiuvetėje yra fluoresceino tirpalas.



5.10 pav. Audinių fluorescencija žadinant balta (a) ir monochromatine šviesa (b)

Taigi diagnostiniais tikslais atliekamiems fluorescencijos matavimams *in vivo* reikia tinkamai parinktos matavimo aparatūros ir filtrų sistemos. Apšvietus tiriamą audinio paviršių balta šviesa (5.10 pav., a), nuo kiekvieno audinio paviršiaus taško (x) įvairių bangos ilgių (λ_{fl}) šviesa sklaidoma skirtingai. Stebėtojas mato audinio struktūros ir spalvos pokyčius ir gali susieti juos su audinio būkle. Jei audinyje esančio fluoroforo pasiskirstymas koreliuoja su atitinkamais audinio pokyčiais, fluorescencijos stebėjimas

gali suteikti ir kokybiškai naujos, ir papildomos informacijos. Audinys apšviečiamas monochromatine fluoroforą žadinančia šviesa ($\lambda_{\text{žad}}$) (5.10 pav., b). Į sistemą įstatytas stebėjimo filtras (geltonas brūkšnys) sulaiko išsklaidytą žadinimo šviesą ir atskiria ją nuo raudonos fluorescencijos šviesos. Stebėtojas aiškiai mato fluorescuojančias audinio sritis.