

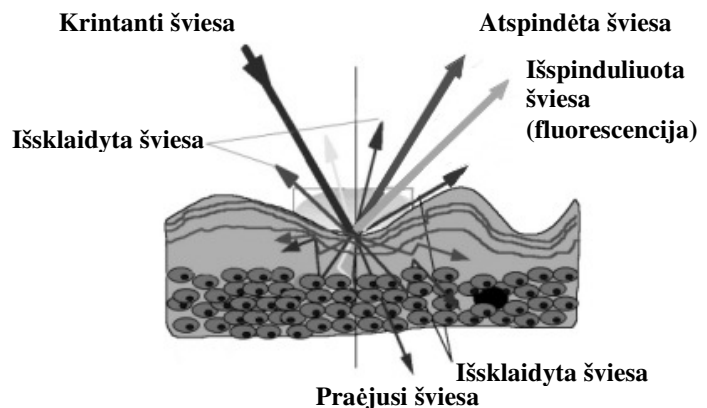
6. SAVITOJI FLUORESCENCIJA

Fluorescencinės diagnostikos metodai skirstomi į nesensibilizuotosios ir sensibilizuotosios fluorescencijos metodus. Nesensibilizuotoji fluorescencinė diagnostika pagrįsta audinių endogeninių fluoroforų optiniu sužadinimu ir jų fluorescencijos stebėjimu. Endogeninių audinio fluoroforų, esančių ląstelėse ir tarpląstelinėje terpėje, sklaidžiama fluorescencija vadinama savitąja fluorescencija.

Optiniai diagnostiniai metodai grįsti tuo, kad ligos pažeistų audinių spektrai skiriasi nuo sveikų audinių spektrų. Norint tinkamiau panaudoti savitąja fluorescencija grįstos diagnostikos galimybes ir geriau suprasti jos ribotumus, būtina žinoti patologijos sukeltų fluorescencijos pokyčių biochemines ir morfologines ištakas. Tam reikia nustatyti sveikų ir pažeistų audinių fluorescencijos signalų šaltinius.

Audinyje esančias su šviesa sąveikaujančias chemines grupes galima skirstyti į: endogeninius fluoroforus – chemines grupes, kurios sugertą šviesą išspinduliuoja fluorescencijos pavidalu, ir grupes, kurios šviesą tik sugeria, bet nespinduliuoja fluorescencijos, arba kurios tik sklaido šviesą.

Šviesa su biologiniu audiniu gali sąveikauti įvairiai (6.1 pav.). Krintanti šviesa gali atsispindėti nuo audinio paviršiaus; prasiskverbti pro audinį nesukeldama jame jokių vyksmų; būti sugerta audinio molekulių ir inicijuoti fotochemines reakcijas; būti išsklaidyta audinyje, nes jis yra nehomogeniškas; būti sugerta fluoroforų ir išspinduliuota fluorescencijos pavidalu. Fluorescencijos šviesa taip pat yra sklaidoma audinio komponentų, dalį jos gali sugerti kiti chromoforai, kita dalis



6.1 pav. Šviesos sąveika su audiniu

išspinduliuojama nuo audinio paviršiaus. Taigi audinio paviršiuje matuojamos fluorescencijos signalas nebus gryna fluoroforo fluorescencija, spektre atsispindės ir šviesą tik sugeriančių ar tik sklaidančių dalelių indėlis. Fluoroforai netolygiai pasiskirstę

audinio paviršiuje, taip pat ir nevienodame gylyje. Todėl fluorescencijos spektras, išmatuotas nuo audinio paviršiaus, gali būti kitoks negu iš gilesnių sluoksnių. Įvairių gylių sluoksnių fluorescencijos spektrai gali būti skirtingi.

Visiems chromoforams būdingos tam tikros nuo bangos ilgio priklausomos charakteristikos. Fluoroforai turi būdingus: sugerties koeficientus, kurie nurodo tikimybę sugerti šviesos fotoną šviesos kelio ilgio vienetu; sklaidos koeficientus, kurie nusako fotono sklaidos šviesos kelio ilgio vienetu tikimybę; fluorescencijos kvantinį našumą, kuris priklauso nuo žadinimo ir emisijos bangų ilgių ir nurodo fluoroforo išspinduliuotos fluorescencijos energijos ties emisijos bangos ilgiu santykį su fluoroforo sugerta žadinimo bangos ilgio šviesos energija.

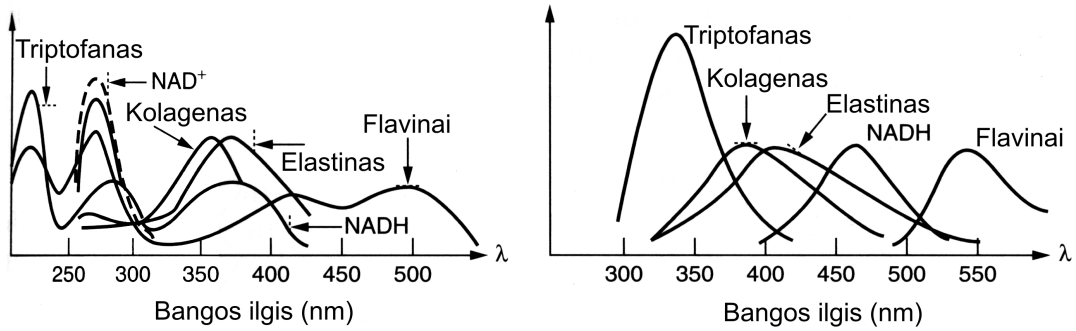
Taigi norint tinkamai interpretuoti ligos sukeltus audinių fluorescencijos spektrų pokyčius, būtina atsižvelgti į visų rūšių audinio fluoroforų pokyčius. Apžvelgsime biologiniuose audiniuose esančius fluoroforus, kurių optinės savybės jautriai reaguoja į ligos sukeltus aplinkos pokyčius.

6.1 Endogeniniai fluoroforai

Biologiniai audiniai silpnai fluorescuoja juos apšvietus tam tikro bangos ilgio šviesa. Įprastoje baltos šviesos aplinkoje plika akimi audinių savitoji fluorescencija praktiškai nematoma. Tačiau žadinant reikiamo bangos ilgio šviesa ir matuojant spektrus jautriais spektriniais prietaisais, galima užfiksuoti specifinį įvairių audinių švytėjimą. Audinius sudaro sudėtingas įvairiausių molekulių mišinys, tačiau už audinių fluorescenciją atsakingi keli fluoroforai (6.1 lentelė) (Richards-Kortum ir Sevick-Muraca, 1996), kurių fluorescencijos spektrų juostos yra plačios ir viena kitą dengiančios, tad tiksliai identifikuoti šiuos fluoroforus yra sunku. Tam dažnai padeda tinkamai parinktas fluorescencijos žadinimo bangos ilgis (Koenig ir kt., 1996; Anidjar ir kt., 1996).

Mokslininkai įdėjo daug pastangų identifikuodami audinių fluoroforus (Rava ir kt., 1991; Richards-Kortum ir kt., 1991; Mahadevan ir kt., 1993). Svarbiausi audiniuose pasitaikantys fluoroforai yra šie: triptofanas (Hubmann ir kt., 1990), kolagenas ir elastinas (Richards-Kortum ir kt., 1991; Andersson-Engels ir kt., 1991), redukuotas nikotinamidadeninukleotidas NADH ir jo fosfatas (NADPH) (Chance ir kt., 1962;

Andersson-Engels, 1990), flavinai ir flavoproteinai (Benson ir kt., 1979; Alfano ir kt., 1984), β -karotinas (Andersson-Engels ir kt., 1991) ir porfirinai (Rava ir kt., 1991; Yang ir kt., 1987). Kai kurių endogeninių fluoroforų sugerties ir fluorescencijos spektrai pavaizduoti 6.2 paveiksle (Katz ir Alfano, 2000).



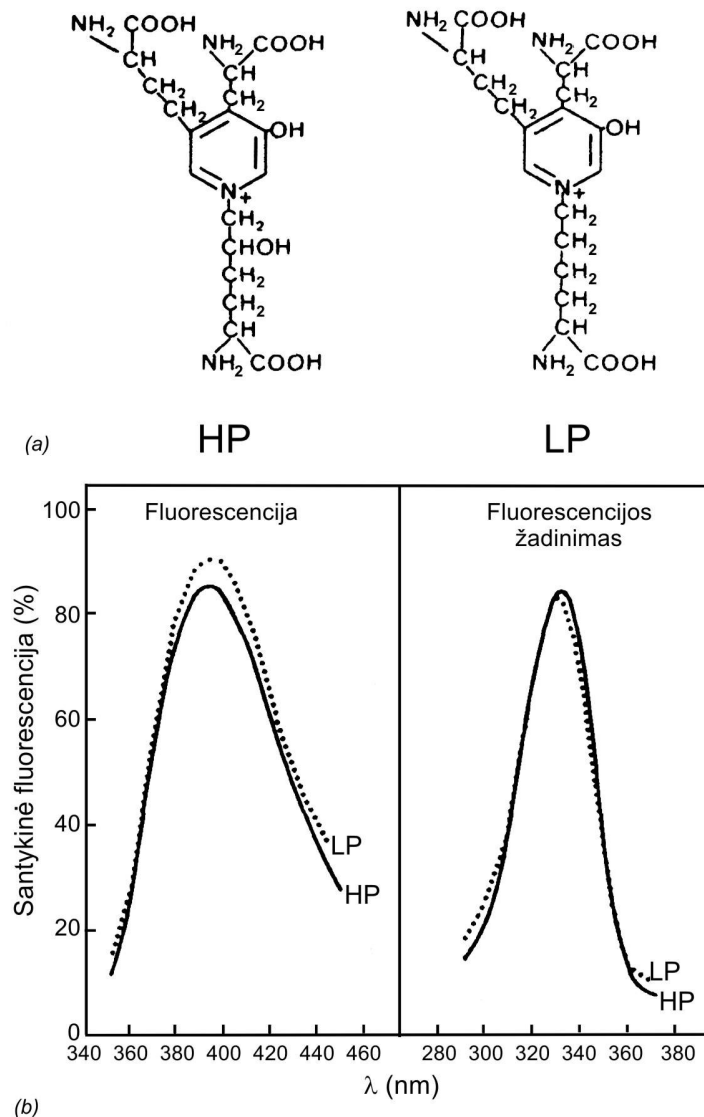
6.2 pav. Svarbiausių endogeninių fluoroforų sugerties (kairėje) ir fluorescencijos (dešinėje) spektrai

6.1 lentelė. Endogeninių fluoroforų spektrinės charakteristikos esant fiziologiniam pH

Fluoroforas	Sugerties maksimumas, nm	Fluorescencijos žadinimo maksimumas, nm	Fluorescencijos maksimumas, nm	Fluorescencijos kvantinis našumas
HP, kolagenas, elastinas	325	325	400	
LP, kolagenas, elastinas		325	400	
Kolageno milteliai		280; 265 330; 450	310; 385 390; 530	
Elastino milteliai		350; 410	420; 500	
Triptofanas	280	280	350	0,2
Tirozinas	275		300	0,1
Fenilalaninas	260		280	0,04
Piridoksolis (vit.B6) (PN)	324	332	400	
Piridoksalis (PL)		330	380	
Piridoksaminas (PM), piridoksal 5'-fosfatas (PLF)		330	400	
NADH	260; 340	290; 340	440; 450	
NAD ⁺	260			
FAD		450	515	
Ceroidai		340-395	430-460; 540-640	
Lipofuscinas		340-395	430-460; 540-640	

Aromatinės aminorūgštys. Iš baltymuose esančių aminorūgščių fluorescuoja trys aromatinės aminorūgštys: triptofanas, tirozinas ir fenilalaninas. Jei žadinimo bangos ilgis didesnis nei 295 nm, sužadinas tik triptofanas (Lakowicz, 1986). Kai žadinimo bangos ilgis tarp 280 nm ir 295 nm, sužadina ir triptofanas, ir tirozinas, tačiau paprastai audiniuose fluorescuoja tik triptofanas, nes tirozino sugerta šviesos energija yra perduodama triptofanui. Trumpesnėmis nei 280 nm bangomis galima sužadinti visas

tris baltymų aminorūgštis, tačiau fenilalanino fluorescencijos kvantinis našumas yra labai mažas, palyginti su triptofano ir tirozino (Lakowicz, 1986).



6.3 pav. Struktūrinių baltymų skersiniai ryšiai: (a) hidroksilizilpiridinolas (HP) ir lizilpiridinolas (LP); (b) jų fluorescencijos bei fluorescencijos žadinimo spektrai (Richards-Kortum ir Sevic-Muraca, 1996)

Fibriliniai (struktūriniai) baltymai. Kolagenas ir elastinas yra jungiamojo audinio fibriliniai baltymai. Kolagenas yra pagrindinis jungiamojo audinio baltymas ir sudaro apie 25–33% žinduolių baltymų (Praškevičius ir kt., 2003). Kolageno randama kauluose, kremzlėse, sausgyslėse, dantyse, odoje, akies ragenoje, plaučiuose, kepenyse,

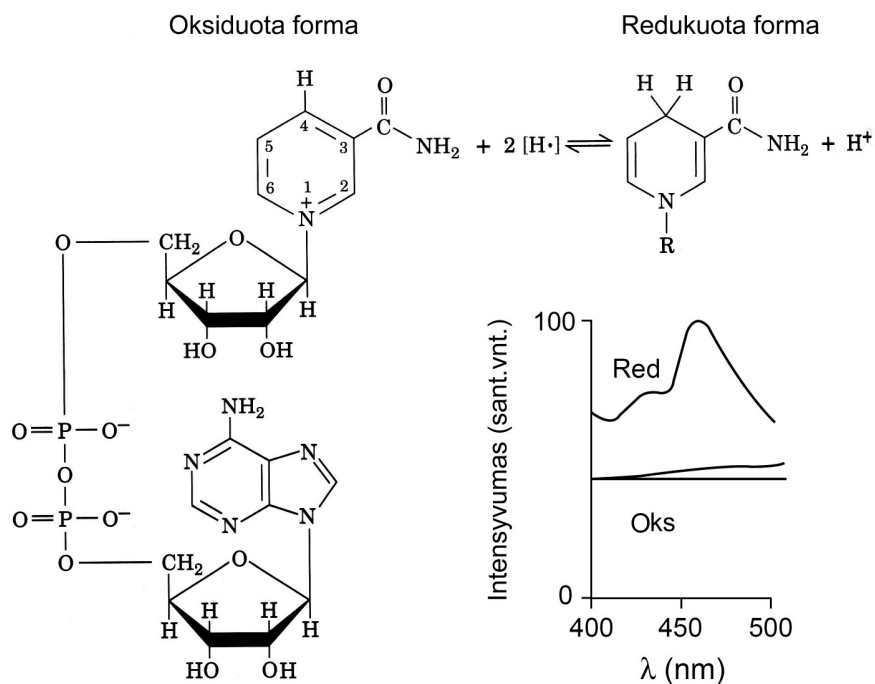
kraujagyslėse ir kituose organuose. Jis įeina į daugialąsčių organizmų neląstelinę matriksą praktiškai visuose organizmo audiniuose ir organuose, suteikdamas jiems formą ir tvirtumą. Elastinas nėra taip paplitęs kaip kolagenas, bet didelių jo kiekių randama plaučiuose, didelėse arterijose, tampriuose raiščiuose, mažesnių – odoje, ausų kremzlėse ir kituose organuose (Praškevičius ir kt., 2003).

Jungiamasis audinys pasižymi labai didele savitąja fluorescencija. Kolageno fluorescencijos smailė *in vivo* yra ties 330 nm, elastino – ties 350 nm (Haringsma ir Tygat, 1999). Fluorescencijos smailės padėtis gali kisti priklausomai nuo audinio tipo, todėl kolageno ir elastino fluorescencija gali padėti nustatyti audinio tipą (Schneckenburger, 1995).

Kolageno ir elastino fluorescencija susijusi su skersiniais ryšiais (Fujimori, 1989; Richards-Kortum ir Sevick-Muraca, 1996). Manoma, kad kolageno skersinių ryšių formavimasis vyksta dviem būdais: vienas yra fermentų reguliuojamas skersinių ryšių susidarymas augant ir bręstant; kitas – susijęs su amžiumi, vykstantis fermentiniu būdu dalyvaujant polisacharidams (Bailey ir kt., 1998). Struktūras palaikančiuose audiniuose aptinkami dviejų tipų skersiniai ryšiai: hidroksilzilpiridinolinas (HP) ir lizilpiridinolinas (LP). Molekulių struktūros ir fluorescencijos spektrai pateikiami 6.3 paveiksle. Abiejų medžiagų savitosios fluorescencijos smailės yra ties 400 nm žadinant 325 nm bangos ilgio šviesa (Richards-Kortum ir Sevick-Muraca, 1996). Skersinių ryšių daugėja žmogui senstant (Bailey ir kt., 1998).

Piridininiai ir flavininiai nukleotidai. Endogeninių fluoroforų fluorescencija gali suteikti informacijos apie audinių būklę. Navikų fluorescencinei diagnostikai ypač svarbūs yra ląstelės medžiagų apykaitoje dalyvaujantys junginiai – nikotinamidadenindinukleotidai (Lohmann ir kt., 1989) ir flavinai (Benson ir kt., 1979), kurie aptinkami mitochondrijose ir citoplazmoje. Nikotinamidadenindinukleotidas (NAD) yra elektronų akceptorius; jo redukuota forma (NADH) gerai fluorescuoja (2.4 pav.) (Richards-Kortum ir kt., 2003). Flavinadenindinukleotidas taip pat yra elektronų akceptorius. Jo oksiduota forma FAD gerai fluorescuoja, o redukuota $FADH_2$ – nefluorescuoja. NADH fluorescencijos smailė *in vivo* yra ties 500 nm, flavinų – ties 550 nm. Keli autoriai (Shomacker ir kt., 1992; Ramanujam ir kt., 1994) pastebėjo, kad, žadinant audinių savitąją fluorescenciją artimojo ultravioletinio ruožo šviesa, navikiniai

audiniai fluorescuoja silpniau negu sveiki. Manoma, kad skirtumus sukelia oksiduotų flavinų ir NADH kiekių pokyčiai. Kadangi navikiniuose audiniuose vyksta intensyvesnė medžiagų apykaita, tokių audinių NADH savitoji fluorescencija bus kitokia negu sveikų (Halangk ir kt., 1991). Be to, sveikų ir navikinių audinių pH yra skirtingas, dėl to taip pat gali keistis redukuotos (NADH) ir oksiduotos (NAD⁺) formų santykis. Kadangi oksiduota forma fluorescuoja gerokai silpniau, mėlyna navikinių ir ikinavikinių audinių savitoji fluorescencija yra silpnesnė (Lohmann ir kt., 1989; Lohmann ir Paul, 1988).



6.4 pav. Nikotinamidadenindinukleotido oksiduota ir redukuota formos ir jų fluorescencijos spektrai ($\lambda_{\text{zad}} = 366 \text{ nm}$)

Porfirinai. Raudona nekrozių naviko audinių fluorescencija buvo aptikta dar 1924 metais (Policard, 1924). Po trisdešimties metų pastebėta, kad išopėjusiai pokšcialąstelinei karcinomai būdinga raudona fluorescencija. Kadangi nepiktybiniai išopėję audiniai raudonai nefluorescavo, buvo pasiūlyta šį reiškinį panaudoti diagnozuojant piktybinius odos pokyčius (Ronchese, 1954). Būdingą raudoną navikinių audinių fluorescenciją 630–690 nm spektriniame ruože pastebėjo ir kiti autoriai ir priskyrė ją porfirinamas, būtent protoporfirinui (Ghadially ir Neish, 1960). Nekroziuose navikų audiniuose esantys mikroorganizmai iš 5-aminolevulino rūgšties gali sintetinti

raudonai fluorescuojančius porfirinus (Ghadially ir kt., 1963). Manoma, kad navikiniuose audiniuose dėl pakitusio metabolizmo (Moesta ir kt., 2001) ir navikų hipervaskuliarizacijos (Kusunoki ir kt., 2000) kaupiasi daugiau porfirinų (Yang ir kt., 1987; El-Sharabay ir kt., 1992).

Lipopigmentai. Tai grupė endogeninių fluoroforų, susijusių su senėjimu ir patologiniais organizmo pokyčiais. Pigmentai vadinami lipopigmentais, nes yra susijungę su lipidų oksidacijos produktais. Svarbiausi jų – ceroidai ir lipofuscinais (Harman, 1990). Žadinami UV ruožo šviesa jie skleidžia geltonai oranžinę fluorescenciją. Žadinant 340–395 nm ilgio bangomis jų fluorescencijos spektrai turi dvi smailes: vieną ruože nuo 340 nm iki 395 nm, kitą – nuo 540 nm iki 640 nm (Richards-Kortum ir Sevic-Muraca, 1996).

Interpretuojant diagnostiniais tikslais atliekamų fluorescencijos spektrų matavimų rezultatus būtina atsižvelgti į tokius veiksnius:

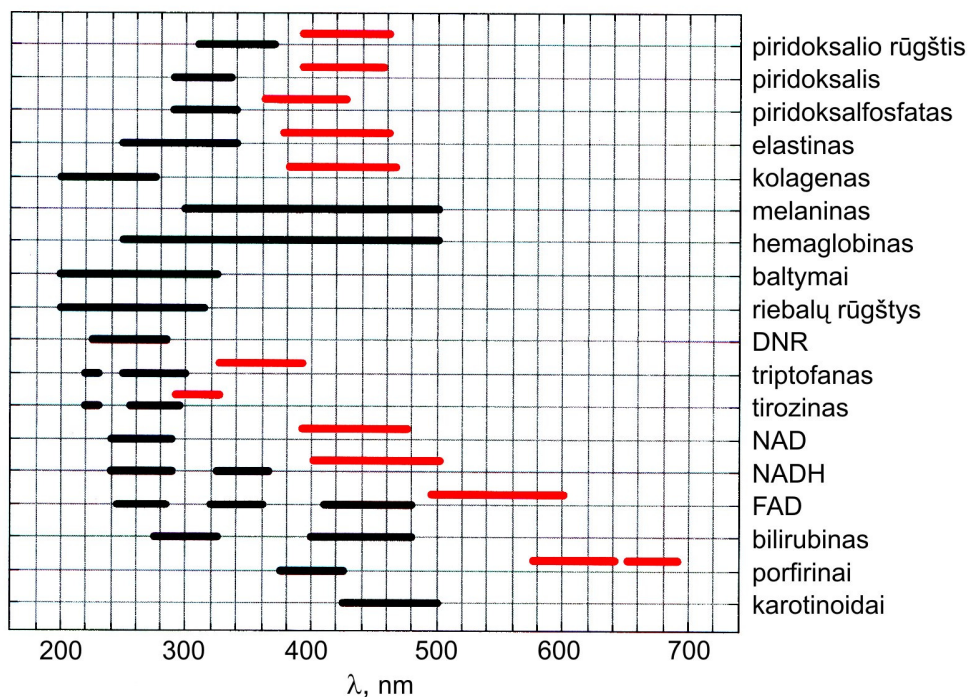
- kiekvienas fluoroforas turi individualų fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrą;
- audinyje yra skirtingų koncentracijų įvairių fluoroforų mišinys;
- fluoroforai audinyje pasiskirstę netolygiai, jų kiekis įvairiame audinio gylyje yra skirtingas.

Tuščiaviduriai organai, tokie kaip bronchai, virškinimo traktas ar šlapimo pūslė, sudaryti iš atskirų sluoksnių (gleivinės, pogleivio, raumenų), kurių kiekviename yra skirtingų fluoroforų. Tad audinio paviršiuje išmatuotame fluorescencijos spektre atsispindės įvairių sluoksnių fluoroforų įnašas.

Be to, audiniuose yra medžiagų tik sugeriančių šviesą, bet nefluorescuojančių. Jos gali sugerti ir žadinimo šviesą, ir fluoroforų skleidžiamą fluorescenciją, iškreipti endogeninių fluoroforų spektrų formą. Tokioms medžiagoms priklauso baltymai ir hemoglobinas. Baltymai gerai sugeria UV šviesą, jų sugerties spektrą sudaro gana plati juosta su smaile ties maždaug 200 nm; sugertis ženkliai silpnėja, kai $\lambda > 230$ nm. Hemoglobino, kurio visada yra vaskuliarizuotuose audiniuose, sugerties spektrui būdingos trys juostos matomosios šviesos ruože (4.13 pav.). Dėl to, kad hemoglobinas

gali sugerti audinių skleidžiamą fluorescenciją, fluorescencijos spektruose atsiranda įdubos (reabsorbcijos reiškinys).

Beveik visi endogeniniai chromoforai sugeria UV-A, UV-B, UV-C ir regimosios šviesos mėlynojo ir žalią riuožo šviesą (6.5 pav.) (Bednarkiewicz ir Stręk, 2004). Porfirinams būdinga gera sugertis UV srityje (Soret juosta) ir silpnesnė sugertis regimosios šviesos srityje (Q juostos). Audiniuose šviesą labiausiai sugeria hemoglobinas ir melaninas, kuris apsaugo odą nuo gilesnio šviesos įsiskverbimo. Nei hemoglobinas, nei melaninas ne fluorescuoja.

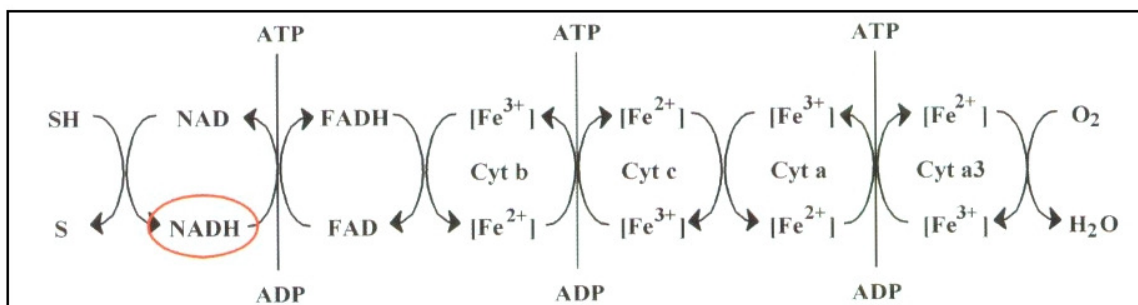


6.5 pav. Endogeninių chromoforų sugerties (juodi brūkšniai) ir fluorescencijos (raudoni brūkšniai) juostų padėtys spektre

6.2 Sveikų ir navikinių audinių savitosios fluorescencijos ypatumai

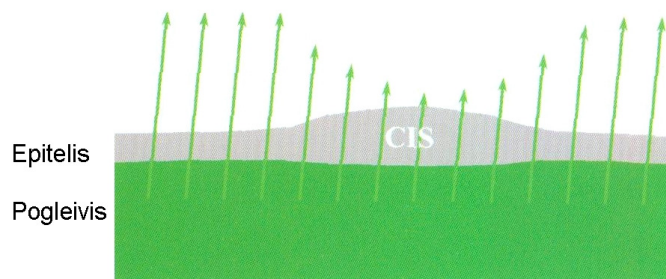
Savitą audinių fluorescenciją pagrįsta diagnostika remiasi tuo, kad navikinių darinių fluorescencija skiriasi nuo sveikų audinių (Alfano ir kt., 1984; Alfano ir kt., 1987; Bottiroli ir kt., 1995). Daugumos fluoroforų fluorescencijos charakteristikos yra

susijusios su tarpląstelinės medžiagos sandara ir medžiagų apykaita ląstelėje, todėl ir morfologiniai, ir citologiniai sveikų ir navikinių ląstelių pokyčiai gali būti nustatyti registruojant audinių savitosios fluorescencijos spektrus. Navikinių darinių diagnozavimas ir tikslus naviko ribų nustatymas susijęs su fluoroforų (triptofano, porfirino) koncentracijų, struktūriniais (kolageno, elastino) pokyčiais, kvėpavimo grandinės aktyvumu (NADH, flavinų) arba šių pokyčių deriniais (Van Dam ir Bjorkman, 1996).



6.6 pav. Energijos pernaša kvėpavimo grandinėje ir NADH/NAD oksidacinis-redukcinis balansas. Kvėpavimo grandinės sutrikimai gali pakeisti oksiduotos ir redukuotos formų kiekius

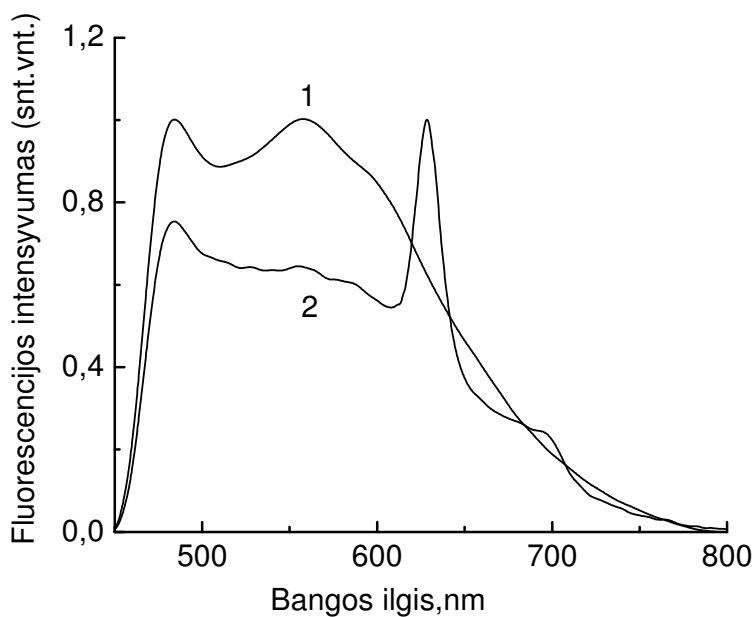
Kadangi fluorescuoja tik redukuota NADH forma, oksiduotos-redukuotos formų koncentracijų pokyčius, susijusius su ląstelių kvėpavimo grandinės veikla (6.6 pav.), galima stebėti registruojant NADH fluorescencijos intensyvumą (Schneckenburger ir kt., 1997). Sutrikus kvėpavimo grandinei pakinta NAD/NADH koncentracijų pusiausvyra ir redukuotos formos NADH fluorescencijos intensyvumas. Selektiviam NADH fluorescencijos žadinimui naudojamas azoto lazeris, kurio bangos ilgis 337 nm (Koenig ir kt., 1996).



6.7 pav. Žadinant mėlyna šviesa ($\lambda = 450 \text{ nm}$) karcinoma *in situ* ir kiti epitelio navikai dėl sustorėjusio epitelio sluoksnio silpnina žalią (matuojamą 500–600 nm ruože) jungiamojo audinio savitąją fluorescenciją

Intensyvesnė triptofano fluorescencija pakitusios histologijos audiniuose buvo pastebėta tiek atliekant *in vitro* eksperimentus (Pradhan ir kt., 1995), tiek *in vivo* diagnozuojant šlapimo pūslės vėžį (Anidjar ir kt., 1996). Žadinant helio-kadmio lazerio ($\lambda = 442 \text{ nm}$) spinduliuote flavinų ir jungiamojo audinio savitąją fluorescenciją, buvo aptikta bronchų karcinoma (Lam ir kt., 1998).

Naviką diagnozuoti kartais padeda ir morfologinės priežastys (6.7 pav.). Jungiamąjį audinį sužadinti turinčią šviesą silpnina epitelio sluoksnis. Šis silpninimas ryškiau pasireiškia ten, kur epitelio sluoksnis sustorėjęs. Epitelinės kilmės navikams, net ir ankstyvų stadijų, būdingas gleivinės sluoksnio sustorėjimas, dėl kurio susilpnėja tiek žadinimo šviesa, tiek jungiamojo audinio fluorescencija.



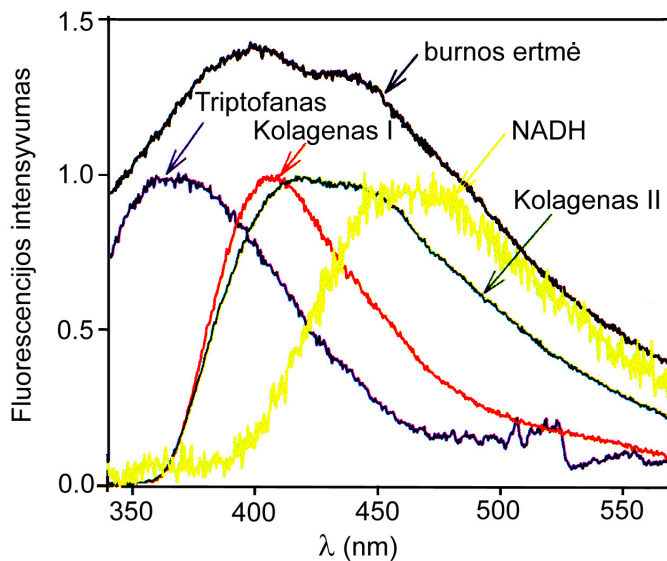
6.8 pav. Sveiko ir navikinio (hepatoma A22) audinio savitosios fluorescencijos spektrai *ex vivo*: 1 – sveiko raumens audinio; 2 – navikinio audinio (Tamošiūnas ir kt., 2004)

Savaiminę raudoną eksperimentinių navikų fluorescenciją pirmasis pastebėjo ir teisingai priskyrė ją navike susikaupusiam porfirinui prancūzas A. Polikardas (Policard, 1924). Buvo manoma, kad raudonai fluorescuoja išopėję navikai (Ronchese, 1954) ir fluorescencija buvo priskirta endogeniniams porfirinams (Ghadially ir Neish, 1960). Nekrozinėse navikų zonose aptinkami endogeniniai porfirinai priskiriami bakterijų

veiklai (Ghadially, 1960; Harris ir Werkhaven, 1987). Mūsų tyrimų rezultatai rodo, kad navikinio audinio nekrozinėse srityse nėra endogeninio porfirino (Tamošiūnas ir kt., 2004). Tačiau greitai proliferuojančiose navikinio audinio ląstelėse kaupiasi endogeniniai porfirinai, kurie pasižymi fluorescencija raudonojoje spektro srityje. Navikinių audinių savitosios fluorescencijos spektruose (6.8 pav.) gerai matyti endogeninių porfirinų juosta 600–700 nm srityje.

Endogeninių fluoroforų spektrinės savybės priklauso nuo jų lokalizacijos audinių struktūroje ir dalyvavimo ląstelių metabolizme. Taikant savitąją audinių fluorescenciją diagnostikai, reikia atsižvelgti į tokius parametrus:

1. Fluoroforų koncentraciją.
2. Kiekvieno fluoroforo fluorescencijos spektrą (6.2 pav.).
3. Fluoroforų pasiskirstymą audinyje. Audinio sluoksniai (epitelis, gleivinė, pogleivis, raumuo) turi skirtingą fluoroforų sudėtį ir koncentraciją. Paprastai žadinant mėlyna šviesa pogleivio sluoksnio savitoji fluorescencija yra maždaug 10 kartų intensyvesnė negu epitelio (Qu ir kt., 1995; Gardner ir kt., 1996.). Taigi nuo audinio paviršiaus matuojama fluorescencija bus atskirų audinio sluoksnių emisijų suma. Burnos ertmės epitelinio sluoksnio fluorescencijos spektras, išmatuotas žadinant 308 nm ilgio šviesa, ir grynų endogeninių fluoroforų spektrai parodyti 6.9 paveiksle.
4. Fluoroforų oksidacinę-redukcinę būklę. Pavyzdžiui, fluorescuoja tik redukuota NADH forma. Kai kurių flavinų fluorescencija taip pat priklauso nuo oksidacinės-redukcinės būklės.
5. Biocheminę-biofizikinę aplinką audinyje: pH vertę ir deguonies koncentraciją. Nuo šių parametrų priklauso fluorescencijos kvantinis našumas ir spektro forma.
6. Audinių morfologiją, nes, pavyzdžiui, navikui augant storėjantis epitelio sluoksnis dėl fluorescencijos reabsorbcijos silpnina emisiją (6.7 pav.).
7. Tiriamo audinio vaskuliarizaciją: šviesos susilpnėjimas susijęs su nefluorescuojančių, bet sugeriančių šviesą chromoforų, pirmiausia hemoglobino, koncentracija. Yra žinoma, kad navikinių audinių kraujotakos indų tankis padidėja.

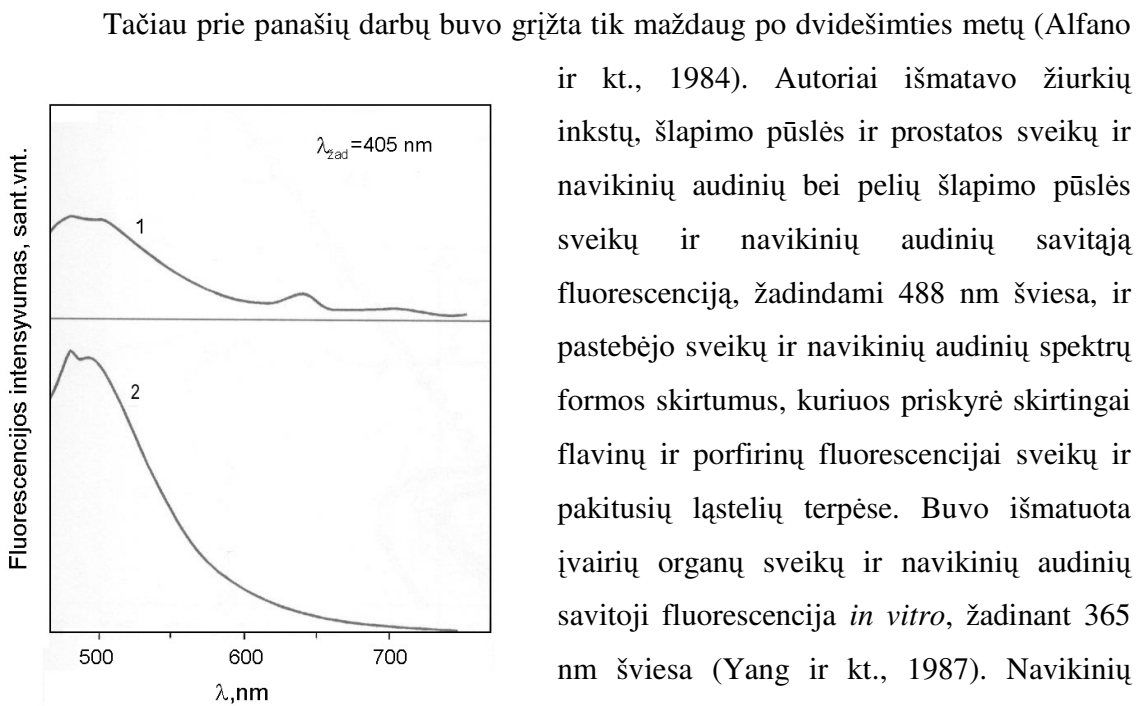


6.9 pav. Burnos ertmės epitelio ir grynų endogeninių fluoroforų fluorescencijos spektrai ($\lambda_{\text{žad}} = 308\text{nm}$)

Kiek matuojamą fluorescencijos signalą veikia minėti veiksniai labai priklauso nuo to, ar tinkamai parinkti fluorescencijos žadinimo ir registravimo bangų ilgiai. Pavyzdžiui, į audinių baltymų sudėtį įeinančioms aromatinėms aminorūgštims žadinti tinka tik UV diapazono šviesa, kitus fluoroforus galima žadinti regimojo diapazono šviesa. Paprastai optimalūs fluorescencijos žadinimo ir registravimo bangų ilgiai iš anksto nėra žinomi, jie nustatomi *ex vivo* mėginiams, modeliams (fantomams) (Qu ir kt., 1995; Qu ir kt., 1994; Wagnieres ir kt., 1997) arba *in vivo* (Hung ir kt., 1991; Zellweger ir kt., 2001). Matavimų *ex vivo* pranašumas tas, kad jie gali suteikti daug spektroskopinės ir mikroskopinės informacijos, tačiau visada yra pavojus, kad spektrai gali pakisti pasikeitus metabolizmo būklei ir netekus kraujo. Todėl patikimiausi ir vertingiausi yra *in vivo* matavimai, kurie, deja, ne visada įmanomi.

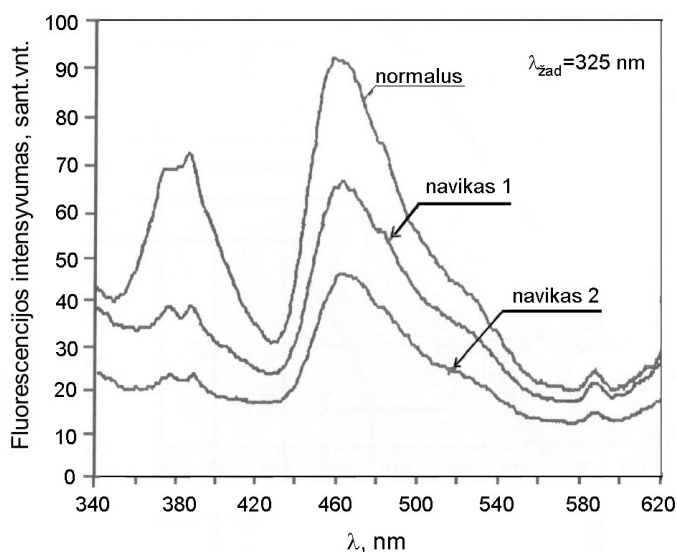
6.3. Savitosios fluorescencijos taikymas navikų diagnostikai

Pirmasis darbas, kurį atliekant buvo pastebėti sveikų ir navikinių audinių savitosios fluorescencijos spektrų kiekybiniai skirtumai, paskelbtas 1965 metais (Lycette ir Leslie, 1965). Buvo matuoti stemplės, skrandžio, krūties ir skydliaukės sveikų ir navikinių audinių mėginių savitosios fluorescencijos spektrai žadinant 330 nm šviesa. Visi audiniai fluorescavo 360–600 nm srityje; spektrų forma buvo panaši į triptofano. To paties ligonio navikinių audinių fluorescencijos intensyvumas buvo mažesnis negu sveikų. Autoriai (Lycette ir Leslie, 1965) konstatavo, kad audinių savitosios fluorescencijos spektrų skirtumai gali būti susiję su navikų nekroze, ir pasiūlė fluorescencinę spektroskopiją taikyti diagnostikos tikslais.



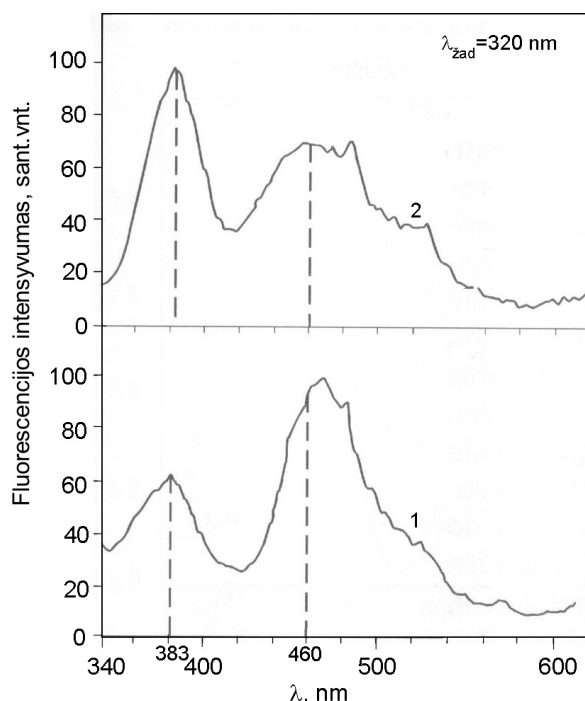
6.10 pav. Liežuvio sveikų (2) ir navikinių (1) audinių savitosios fluorescencijos spektrai

tirtų audinių pavyzdžių 44 (89%), pasižymėję intensyvia endogeninių porfirinų fluorescencija, atitiko histologinių tyrimų duomenis ir buvo identifikuoti kaip navikiniai (Yang ir kt., 1987).



6.11 pav. Gaubiamosios žarnos sveikų ir navikinių audinių savitosios fluorescencijos spektrai

1989), burnos gleivinėje (Andersson-Engels ir kt., 1990), gimdos kaklelyje (Lohmann ir kt., 1989; Glassman ir kt., 1992), virškinimo trakto gleivinėje (Kapadia ir kt., 1990;



6.12 pav. Kiaušidžių sveikų (1) ir navikinių (2) audinių savitosios fluorescencijos spektrai

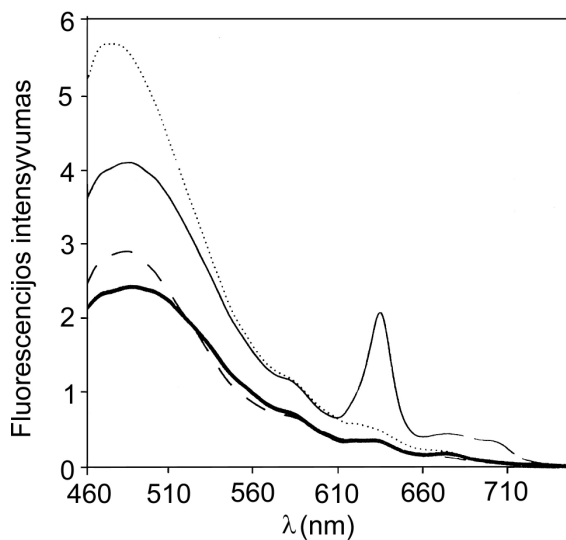
Daugelio tyrimų autoriai nustatė, kad navikinių audinių savitosios fluorescencijos intensyvumas visada yra mažesnis negu sveikų audinių, nepriklausomai nuo to, kokie tai audiniai. Šis reiškinys pastebėtas raumenyse (Ankerst ir kt., 1984; Svanberg ir kt., 1986), smegenų parenchimoje (Andersson-Engels ir kt., 1989), bronhuose (Hung ir kt., 1991). Išmatuoti sveikų ir navikinių liežuvio (6.10 pav.) (Andersson-Engels ir kt., 1990), gaubtinės žarnos (6.11 pav.) (Yang ir kt., 1989), kiaušidžių (6.12 pav.) (Glassman ir kt., 1992) ir plaučių (6.13 pav.) (Hung ir kt., 1991) audinių savitosios fluorescencijos spektrai patvirtino, kad navikinių audinių fluorescencijos intensyvumas mažesnis nei sveikų. Navikinių audinių

savitosios fluorescencijos spektrams taip pat būdingi nespecifiniai formos pokyčiai, bet naujų juostų neišryškėja. Spektrų formos pokyčiai siejami su rūgščių-bazių ir fluoroforų oksiduotų-reduktuotų formų pusiausvyros pokyčiais.

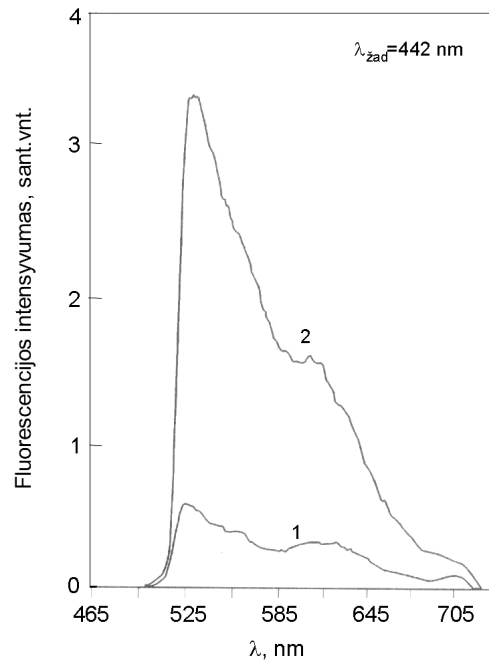
Pirmieji moksliniai tyrinėjimai teikė vilčių galimai navikų diagnostikai ir paskatino tolesnius navikinių audinių savitosios fluorescencijos tyrimus *in vitro* ir *in vivo*.

Fluorescencinė diagnostika buvo taikoma beveik visų organų navikmas aptikti.

Virškinimo traktas. Virškinimo



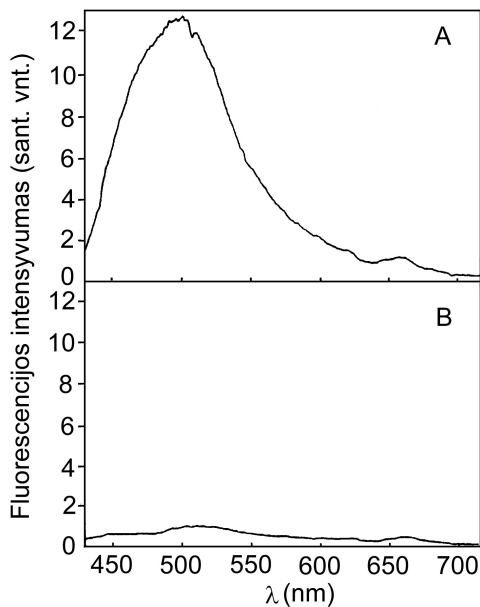
6.14 pav. Žarnų audinių mėginių fluorescencijos spektrų vidurkiai: sveikos žarnų gleivinės (.....), adenomos (—), karcinomos (—) ir šeiminės adenomatozinės polipozės (- - -)



6.13 pav. Plaučių sveikų (2) ir navikinių (1) audinių savitosios fluorescencijos spektrai

trakto fluorescencinė spektroskopija ir vaizdinimas yra sudėtingas uždavinys, nes jį dažnai sunkina: lėtinės nepiktybinės ligos (pavyzdžiui, Bareto stemplės displazija), kurios taip pat sukelia audinių savitosios fluorescencijos pokyčius; užteršimas maisto liekanomis ar gleivėmis; didelis ir judantis paviršius. Atlikta nemažai darbų matuojant savitąją fluorescenciją ir vaizdinant virškinimo trakto audinių mėginius *ex vivo* (Wang ir kt., 1996). Nustatyta, kad žadinant 330 nm, 370 nm ir 410 nm šviesa pasiekiamas didžiausias sveikų ir adenomos pažeistų

žarnyno audinių fluorescencijos spektrų skirtumas (Richards-Kortum ir kt., 1991). Įvairūs algoritmai buvo taikyti analizuojant žarnyno audinių savitosios fluorescencijos spektrus (Kapadia ir kt., 1990; Schomacker ir kt., 1992; Cothren ir kt., 1996; Vo-Dinh ir kt., 1995; Schomacker ir kt., 1992), taip pat mėginta modeliuoti savitosios fluorescencijos spektrus remiantis fluoroforų sudėtimi ir audinių sluoksnių sukeltu šviesos silpninimu (Schomacker ir kt., 1992; Zonios ir kt., 1996; Romer ir kt., 1995; Fiarman ir kt., 1995). Kaip minėta, ankstyvų stadijų navikiniams būdingas gleivinės sustorėjimas, dėl kurio silpnėja žalia pogleivio sluoksnio savitoji fluorescencija; be to, tokiuose audiniuose dėl padidėjusios mikrovaskuliarizacijos oksihemoglobinas sugeria gilesnių sluoksnių skleidžiamą savitąją fluorescenciją. Vėlesnių stadijų navikuose aptinkama

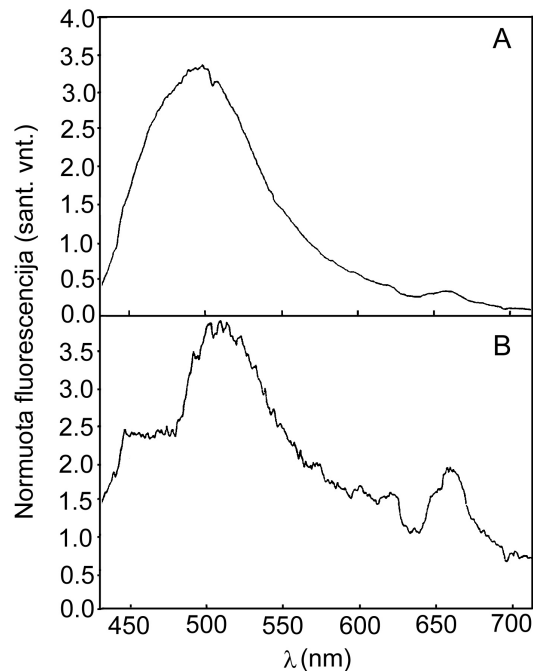


6.15 pav. Stemplės audinių fluorescencijos spektrai ($\lambda_{\text{žad}} = 410 \text{ nm}$): sveiko audinio (A) ir naviko pažeisto audinio (B)

raudona porfirinų fluorescencija, kurios priežastis gali būti didesnė porfirinų koncentracija navikiniuose audiniuose arba jų sankaupa ant audinio paviršiaus dėl bakterijų veiklos (Bottiroli ir kt., 1995). Sveikų ir adenomos bei karcinomos pažeistų žarnyno audinių mėginių savitosios fluorescencijos spektrų vidurkiai pateikiami 6.14 paveiksle. (Marchesini ir kt., 1992). Sveikų audinių fluorescencijos juosta ties 460–530 nm yra intensyviausia, karcinomos ir adenomos pažeistų audinių šios juostos intensyvumas mažesnis, o juostos smailė šiek tiek pasistūmusi į ilgesnių bangų pusę, palyginti su sveikų audinių juostos smaile. Tačiau svarbiausia, kad karcinomos audinių spektre atsiranda endogeniniams porfirinams būdinga juosta ties 635 nm.

Taikant fluorescencinę stemplės vėžio diagnostiką 48 pacientams endoskopinės apžiūros metu buvo atlikta 200 savitosios fluorescencijos matavimų (Vo-Dinh ir kt., 1995). Fluorescencija buvo žadinama 410 nm ilgio dažų lazerio spinduliuote. Sveikų ir

adenokarcinomos pažeistų stemplės audinių savitosios fluorescencijos intensyvumai labai skirtingi ir paklūsta būdingam dėsningumui – navikinių audinių fluorescencija yra daug silnesnė negu sveikų (6.15 pav.) (Vo-Dinh ir kt., 1995). Šis intensyvumų skirtumas gali būti aiškinamas įvairiais veiksniais, pavyzdžiui, kad navikiniuose audiniuose nėra kai kurių biologinių komponentų, kad pakitusi šių audinių kraujotaka, hemoglobino sugertis, audinių struktūra ir morfologija. Autoriai mano, kad savitosios fluorescencijos intensyvumų skirtumas gali būti geras parametras pirminiam audinių apibūdinimui. Norėdami geriau išryškinti navikinių audinių savitosios fluorescencijos spektrų formą ir padidinti diagnozavimo tikslumą, autoriai



6.16 pav. Normuoti stemplės sveiko (A) ir naviko pažeisto (B) audinio fluorescencijos spektrai

duomenims apdoroti pritaikė skirtuminės normuotos fluorescencijos metodiką: intensyvumas ties kiekvienu bangos ilgiu buvo normuojamas į integruotą spektro plotą. Toks normavimas gerai išryškina net ir labai menkus spektro formos pokyčius (6.16 pav.). Didelis tikslumas atskiriant sveikus ir navikinius stemplės audinius *in vivo* buvo pasiektas žadinant ties 410 nm ir matuojant savitąją fluorescenciją daugelyje stemplės vietų (Vo-Dinh ir kt., 1997). Taikant algoritmą, grįstą audinių fluorescencijos intensyvumo ties 480 nm ir fluorescencijos spektro integruotos vertės santykiu, 90% tikslumu atskirti sveiki audiniai, ankstyvosios ir vėlyvosios stadijų displazija.

Kolonoskopijos metu matuojant fluorescenciją 67 žarnyno vietose, 97% tikslumu buvo atskirti sveiki audiniai, hiperplaziniai polipai ir adenomos (Cothren ir kt., 1990). Atskyrimas buvo grįstas mažėjančiu fluorescencijos intensyvumu ties 460 nm ir didėjančiu fluorescencijos intensyvumu ties 680 nm, sveikam audiniui keičiantis į hiperplaziją ir adenomą.

Fluorescencinės endoskopijos būdu tiriant stemplę dviem pacientams iš 21 tirtą buvo diagnozuotas vėlyvos stadijos Bareto vėžys ir dviem – ankstyvosios stadijos Bareto karcinomos (Haringsma ir Tytgat, 1999). Vėlesni tyrimai taip pat patvirtino, kad fluorescenciniai endoskopiniai matavimai pagerina navikinių darinių atskyrimą nuo Bareto metaplazijos (Bourg-Heckly ir kt., 2000). Žadinant fluorescenciją 330 nm šviesa Bareto metaplazijos pažeista stemplės gleivinė fluorescuoja silpniau nei sveika, tačiau jos spektro forma išlieka nepakitusi. Savitosios fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas ir spektro formos pokyčiai būdingi vėlyvosios stadijos displazijai ir gleivinės karcinomai. Tolesnei duomenų analizei buvo taikomi savitosios fluorescencijos intensyvumų ties 390 nm ir 450 nm (kolageno ir NADH), 550 nm ir 450 nm (flavinų ir NADH) bei 390 nm ir 550 nm (kolagenų ir flavinų) santykiai. Pažaidų tipo nustatymo jautrumas buvo 86%, o specifiškumas – 95%.

Su endoskopu sujungtos fluorescencijos vaizdinimo sistemos padeda apžiūrėti didelius vidaus organų gleivinės plotus. Fluorescencijos vaizdai gali būti gaunami kartu su endoskopiniais vaizdais, o tai labai nustatyti palengvina biopsijos vietas įtarimą keliančiame audinyje. Virškinimo trakto tyrimams gali būti naudojama šviesolaidinio endoskopo pagrindu sukurta vaizdinimo sistema. Audinys žadinamas mėlyna šviesa, o fluorescencijos vaizdas registruojamas CCD kamera. Naudojant tokią sistemą buvo sėkmingai identifikuotos Bareto displazijos, kurių nebuvo galima aptikti klasikinės endoskopijos būdu (DuVall ir kt., 1997). Žadinant 325 nm bangos ilgio šviesa ir vaizdinant skrandžio audinių mėginius *ex vivo* piktybinių navikų pažeisti audiniai buvo nustatyti 96%, o nepiktybinių – 80% tikslumu (Chwirot ir kt., 1997).

Apibendrinant galima teigti, kad ankstyvųjų stadijų piktybiniai žarnyno pokyčiai prasideda žarnos gleivinės sustorėjimu, o tai sumažina žarnos pogleivyje esančio kolageno fluorescencijos intensyvumą. Sutankėjęs mikrokraujagyslių tinklas lemia iš gilesnių sluoksnių emituotos fluorescencijos spektro iškraipymus 500–600 nm srityje dėl padidėjusios hemoglobino sugerties. Be to, gleivinės savitoji fluorescencija gali padidėti raudonojoje spektro srityje: vėlesnių stadijų navikiniam audiniui būdinga endogeninių porfirinų fluorescencija. Patikimesniems diagnostikos rezultatams gauti naudojami algoritmai, kuriais siekiama palyginti sveiko ir tiriamojo audinio raudonos ir žalios savitųjų fluorescencijų santykį.

Plaučiai ir kvėpavimo takai. Naudojant klasikinę baltos šviesos bronchoskopiją pavyksta diagnozuoti tik 50% kvėpavimo takų navikų, todėl būtini alternatyvūs bronchų ir plaučių navikų diagnostikos metodai. Optiniai diagnostikos metodai ypač tinkami plaučių navikams aptikti, nes dėl plaučių audinių specifiškumo šviesos sugertis ir sklaida plaučiuose yra daug mažesnė negu kituose organuose. Ankstyvi ikinavikiniai pokyčiai (displazijos) ar ankstyvosios vėžio stadijos (pavyzdžiui, karcinoma *in situ*) sunkiai aptinkami tradiciniais bronchoskopiniais metodais, nes ligos pažeistos vietos skersmuo esti tik keli milimetrai (Hayata ir kt., 1993). Fluorescenciniais diagnostikos metodais ankstyvų navikinių pokyčių aptikimo tikimybė daug didesnė.

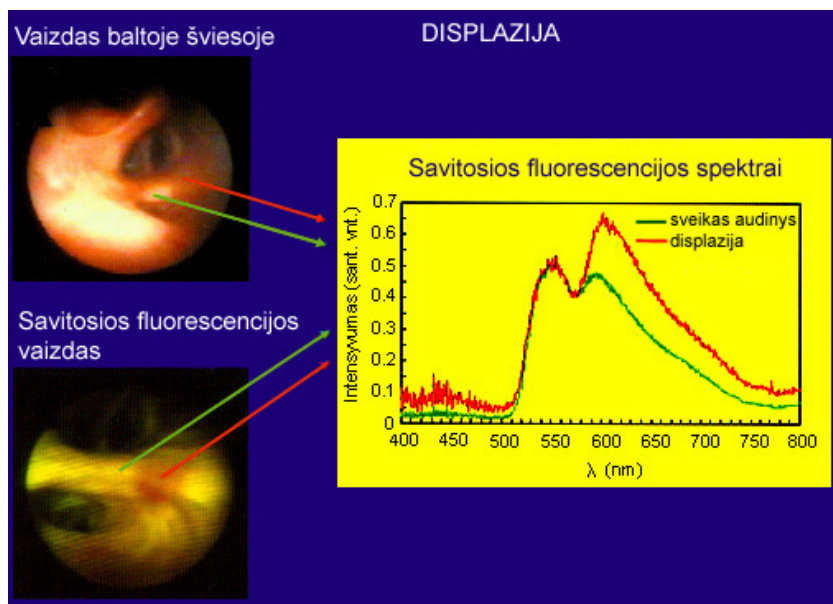
Bronchų ir bronchų navikų (vėlyvosios stadijos displazijos, karcinomos *in situ*, invazinio naviko) savitoji fluorescencija *in vivo* buvo tirta žadinimui naudojant 405 nm, 442 nm bei 488 nm šviesą (Hung ir kt., 1991). Spektrams būdingos dvi smailės ties 520 nm ir 595 nm, o fluorescencijos intensyvumas nuosekliai mažėja pereinant nuo displazijos į karcinomą *in situ* bei į invazinio naviko stadiją.

Naudojant klasikinį šviesolaidinį bronchoskopą buvo atliktas sveikų ir navikinių audinių vaizdinimas (Lam ir kt., 1993). Savitosios fluorescencijos vaizdai buvo modifikuojami išryškinant santykį tarp audinių endogeninių fluoroforų raudonos ir žalios fluorescencijos. Naudojant šią metodiką vidutinės ir vėlyvosios stadijos displazijos nustatymo jautrumas buvo 73%, specifiškumas – 94%. Diagnozuojant intraepitelinius navikus plaučių savitosios fluorescencijos vaizdinimui sukurta sistema kartu su įprasta baltos šviesos bronchoskopija, pasiektas šešis kartus didesnis jautrumas negu viena baltos šviesos bronchoskopija (Lam ir kt., 1998).

Šveicarijoje tirti 48 ligoniai, kuriems jau buvo nustatytas arba įtariamas plaučių vėžys (Zellweger ir kt., 2001a; Zellweger ir kt., 2001b). Bronchoskopijos metu matuoti sveikų ir metaplazijos ar displazijos pažeistų audinių savitosios fluorescencijos spektrai, žadinimui naudojant 350–480 nm ruožo šviesą. Iš įtartinų vietų paimtos biopsinės medžiagos ir histologinių tyrimų duomenys lyginti su fluorescencijos matavimų rezultatais. Apibendrinus tyrimo rezultatus konstatuota, kad ikinavikinių ir navikinių audinių fluorescencijos intensyvumas yra ženkliai mažesnis negu sveikų audinių, ypač žaliojoje spektro srityje, o žadinimui geriausiai tinka 405 nm ilgio šviesa (Zellweger ir kt., 2001a). Žadinant tokio bangos ilgio šviesa pasiekiamas didžiausias spalvų kontrastas

tarp sveikų bronchų audinių bei metaplazijos ir displazijos (Goujon ir kt., 2000). Esant bronchų uždegimui arba metaplazijai, savitosios fluorescencijos spektrų pokyčiai, lyginant su sveikų bronchų audinių spektrais, yra nedideli. Sunormavus spektrus ties 500 nm, 600–680 nm srityje išryškėja skirtumai tarp bronchų sveikų ir navikinių audinių savitosios fluorescencijos (6.17 pav.) (adaptuota iš Goujon ir kt., 2000).

Daugelis autorių, tyrę plaučių ir kvėpavimo takų vėžio fluorescencinę diagnostiką, pastebėjo ženkliai mažesnę naviko pažeistų audinių savitąją fluorescenciją ir



6.17 pav. Bronchų savitosios fluorescencijos spektrai ir vaizdinimas

aiškina ją anksčiau aptartais su liga susijusiais biocheminiais ir struktūriniais pokyčiais: NADH ir flavinų oksidacine-redukcinė būsena, struktūrinių baltymų kiekybiniais pasikeitimais, epitelio sluoksnio sustorėjimu ar kraujagyslių tankio padidėjimu (Qu ir kt., 1994; Keith ir kt., 2000; Pitts ir kt., 2001; Zellweger ir kt., 2001 a).

Šlapimo pūslė. Mažus papildinius šlapimo pūslės navikus, o ypač karcinomą *in situ*, sunku diagnozuoti klasikinės cistoskopijos būdu. Taikant savitąją fluorescenciją šlapimo pūslės vėžiui diagnozuoti pastebėta, kad naviko (karcinoma *in situ*) ir sveikos šlapimo pūslės sienos spektro forma yra skirtinga (Anidjar ir kt., 1996). Žadinant šlapimo pūslės audinių savitąją fluorescenciją 337 nm šviesa ir matuojant fluorescencijos

intensyvumų santykį ties 385 nm ir 455 nm, navikinių ir sveikų audinių identifikavimo jautrumas ir specifiškumas buvo 95% (Koenig ir kt., 1996).

Cistoskopijos metu matuojamai šlapimo pūslės audinių fluorescencijai žadinti tinkamiausia buvo 400 nm ilgio šviesa (Arendt ir kt., 1997). Audinių savitosios fluorescencijos maksimumas buvo ties 460 nm; karcinomos *in situ* fluorescencijos intensyvumas, lyginant su sveiko šlapimo pūslės sienos audinio fluorescencijos intensyvumu, sumažėjo 1,6 karto, o invazinio naviko – 3,2 karto. Karcinomos *in situ* ir invazinio naviko savitosios fluorescencijos spektruose išryškėjo endogeninių porfirinų juostos ties 635 nm. Manoma, kad svarbiausi fluoroforai šlapimo pūslėje yra kolagenas ir porfirinai.

Krūties vėžys. Fluorescencinę spektroskopiją bei vaizdinimą įmanoma taikyti krūties invazinės endoskopijos metu (Love ir Barsky, 1996), taip pat matuojant savitosios fluorescencijos spektrus *ex vivo* (Alfano ir kt., 1987; Lohmann ir kt., 1990).

Tiek sveiko, tiek navikinio krūties audinio, žadinto 488 nm ir 457,9 nm šviesa, savitosios fluorescencijos spektruose *in vitro* buvo matomas fluorescencijos intensyvumo padidėjimas ties 515 nm. Sveikų audinių spektruose buvo papildomos fluorescencijos smailės ties 556 nm ir 592 nm (Alfano ir kt., 1987).

Nagrinėjant navikinių ir sveikų krūties audinių savitosios fluorescencijos spektrus *ex vivo* buvo nustatyta, kad, žadinamą 340–380 nm ruožo šviesa, krūties audinių savitąją fluorescenciją lemia jungiamojo audinio skaidulos, esančios tarp pieno liaukų ir skiltelinių kompleksų (Lohmann ir kt., 1990). Paaiškėjo, kad greta krūties naviko esančio sveiko jungiamojo audinio savitoji fluorescencija yra intensyvesnė negu to paties sveikos krūties audinio fluorescencija.

Žadinant iš 63 pacienčių paimtų sveikų krūties audinių, nepiktybinių navikų (fibroadenomos) ir piktybinių navikų (karcinomos) mėginių savitąją fluorescenciją azoto lazerio šviesa (337 nm), nustatyta, kad visų trijų grupių audinių savitosios fluorescencijos spektrų forma panaši, tačiau labai skirtingas audinių integruotos savitosios fluorescencijos intensyvumas: piktybinio naviko didžiausias, nepiktybinio – mažiausias. Taikant multivariacinę duomenų analizę tirtųjų audinių grupių atskyrimo specifiškumas ir jautrumas buvo labai didelis (~98–99%) (Gupta ir kt., 1997).

Galvos ir kaklo vėžys. Kelios mokslininkų grupės paskelbė daug vilčių teikiančius rezultatus, gautus taikant savitosios fluorescencijos spektroskopiją viršutinių kvėpavimo takų navikų diagnostikai. Visų pastebėtas bendras bruožas, kad sveikos gleivinės savitosios fluorescencijos intensyvumas ties 500 nm yra didžiausias ir ima mažėti sveikam audiniui peraugant į navikinį (Ingrams ir kt., 1997; Harries ir kt., 1995).

Burnos gleivinės navikų mėginių savitosios fluorescencijos spektre *ex vivo* matomos juostos ties 635 nm ir 700 nm. Parenkant įvairius fluorescencijos žadinimo bangos ilgius nustatyta, kad didžiausi skirtumai tarp burnos gleivinės sveikų ir navikinių audinių savitosios fluorescencijos spektrų išryškėja žadinant 410 nm šviesa (Roy ir kt., 1995; Ingrams ir kt., 1997). Raudonojoje spektro srityje padidėjusi savitoji fluorescencija buvo priskirta endogeniniams porfirinams.

Smegenų vėžys. Didelį mirtingumą nuo smegenų navikų lemia dažni jų recidyvai. Daugeliu atveju yra labai sunku nustatyti naviko išplitimą į šalia esančius smegenų audinius, o operacijos metu vykstantys audinių poslinkiai iškraipo pradinis naviko diagnostikos rezultatus. Nepaisant sunkumų, fluorescenciniai diagnostikos metodai ir navikinių audinių vaizdinimas gali būti sėkmingai taikomi operuojant smegenų navikus.

Smegenų naviko meningiomas savitoji fluorescencija, matuota žadinant 337 nm šviesa, skiriasi nuo baltosios bei pilkosios smegenų dalies fluorescencijos, tačiau astrocitomas naviko atveju jokių skirtumų tarp navikinio ir sveiko audinio fluorescencijos nepastebėta (Montan ir kt., 1987).

Sveikų ir neoplazijos pažeistų smegenų audinių mėginių savitoji fluorescencija matuota *in vitro* žadinant 308 nm šviesa (Richards-Kortum ir Sevick-Muraca, 1996). Tiek sveikų, tiek pakitusių smegenų audinių spektrus sudarė triptofano fluorescencijos juostos ties 352 nm ir 363 nm, kolageno bei elastino fluorescencijos juostos ties 383 nm ir NADH juosta ties 460 nm. Pilkosios smegenų medžiagos savitoji fluorescencija ties 453 nm buvo 25% intensyvesnė nei baltosios; pilkojoje smegenų medžiagoje yra daugiau mitochondrijų ir dėl to NADH fluorescencija intensyvesnė. Iš savitosios fluorescencijos juostų intensyvumų santykių spektre buvo galima gerai atskirti sveikus audinius nuo navikinių.

Gimdos kaklelio vėžys. Anksti diagnozuoti gimdos kaklelio vėžį yra viena svarbiausių klinikinės ginekologijos problemų, kurią sprendžiant galima pasitelkti

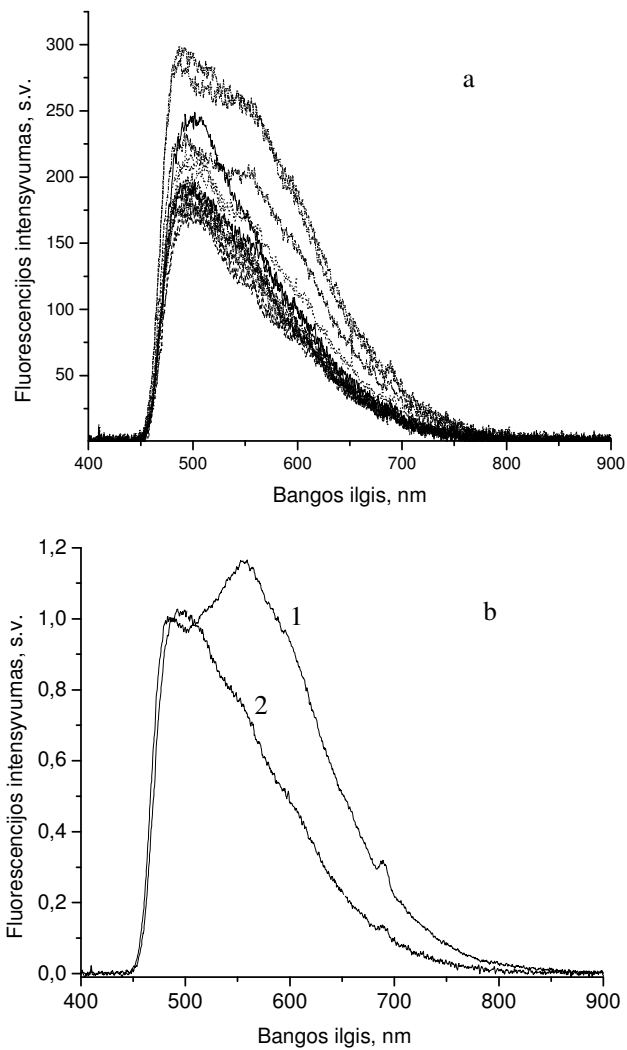
fluorescencinę spektroskopiją. Yra paskelbta gana daug duomenų, gautų matuojant gimdos kaklelio audinių savitąją fluorescenciją *ex vivo* (Lohmann ir kt., 1989; Glassman ir kt., 1992; Glassman ir kt., 1994) ir *in vivo* (Ramanujam ir kt., 1996; Ramanujam ir kt., 1996). Ypač daug ankstyvos gimdos kaklelio vėžio fluorescencinės diagnostikos srityje yra pasiekę amerikiečių mokslininkai (Richards-Kortum ir kt., 2003b). Spektriniai matavimai buvo atliekami žadinant kelių bangų šviesa, o rezultatams įvertinti sukurti atitinkami algoritmai.

Oda. Žmogaus odoje yra daug endogeninių chromoforų, kurių sugerties ir fluorescencijos spektrų smailių padėtys gali kisti, nelygu aplinkos sąlygos. Kaip matyti iš 6.2 paveikslo, endogeninių chromoforų sugerties ir fluorescencijos juostos viena kitą dengia, todėl odos fluorescencijos spektrą sudaro plačios juostos, susidedančios iš viena kitą dengiančių įvairių fluoroforų juostų.

Pirmasis bandymas fluorescenciniu metodu aptikti melanomas buvo atliktas 1988 metais (Lohmann, 1988). Autoriai nustatė, kad žadinant 365 nm šviesa ir matuojant fluorescenciją ties 470 nm, galima atskirti melanomą nuo ikivėžinių odos pakitimų. Pastebėta, kad melanomos srityje fluorescencijos intensyvumas buvo labai mažas, o pereinant į sritį tarp melanomos ir sveikos odos fluorescencijos intensyvumas didėjo. Savo hipotezę autoriai patikrino išsamiu didelio skaičiaus pacientų tyrimu (Lohmann ir kt., 1991). Kitos grupės atlikti tyrimai nepatvirtino duomenų apie būdingą savitosios fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymą žmogaus odos melanomos atveju (Chwirot ir kt., 1998). Šių tyrimų metu buvo atliktas 408 pacientų odos savitosios fluorescencijos vaizdinimas (įtariant melanomą), žadinimui naudojant 366 nm šviesą ir registruojant signalą ties 475 nm. Odos melanoma formuojasi stipriai pigmentuotų audinių vietose, dažniausiai apgamuose, kuriuose yra dideli kiekiai pigmento melanino. Pigmentuota oda – apgamai pasižymi skirtingu nei normali oda savitosios fluorescencijos spektru, kurio forma kinta priklausomai nuo apgamo atspalvių. Dėl to iš savitosios odos fluorescencijos spektrų sunku tiksliai identifikuoti melanomines odos ligas. Tiksliam melanominių ligų identifikavimui fluorescenciniai duomenys buvo lyginami su histologinių tyrimų rezultatais. Buvo sukurtas melanomos nustatymo algoritmas, pagrįstas santykio tarp maksimalios savitosios fluorescencijos melanomos išorėje (iki 40 mm nuo melanomos krašto) bei minimalios fluorescencijos melanomos viduje apskaičiavimu. Naudojant šį

algoritmą, melanomos atskyrimo nuo nemelanominių odos darinių jautrumas buvo 82%, o specifiškumas – 78%.

6.4. Odos savitosios fluorescencijos spektrai



6.18 pav. Skirtingų asmenų įvairių rankos vietų odos savitosios fluorescencijos *in vivo* spektrai (a). Normalios ir pigmentuotos odos savitosios fluorescencijos *in vivo* spektrų vidurkiai (b): (1) apgamų spektrų vidurkis, (2) nepigmentuotos odos spektrų vidurkis (visi spektrai sunormuoti į vienetinį intensyvumą, ties 488 nm)

Fluorescencijos žadinimui naudotas diodinis mėlynos šviesos šaltinis, spinduliuojantis 406 nm bangos ilgio šviesą. Visi spektrai matuoti vienodomis sąlygomis

Optinės odos savybės atspindi odos struktūrą ir cheminę sudėtį. Šviesai sąveikaujant su oda, fotonai sugeriami arba išsklaidomi. Dalis šviesos atspindima nuo odos paviršiaus, o į odą patekusios šviesos viena dalis sugerinama, kita, daug kartų atspindėta, išeina per odos paviršių (6.1 pav.). Kuo stipresnė odos sugertis, tuo mažiau šviesos bus atspindėta arba išsklaidyta. Odoje yra fluoroforų, kurie fluorescuoja sužadinti UV arba trumposiomis regimosios spektro srities bangomis. Net mažiausi odos pakitimai atsispindi fluorescencijos spektruose. Taigi fluorescencijos spektrų matavimai leidžia pastebėti netgi nedidelius odos pažeidimus ir iš jų diagnozuoti odos ligas.

Sveikos odos savitosios fluorescencijos matavimai 450–800 nm spektriniame ruože, atlikti *in vivo* šviesolaidiniu spektrofluorimetru S2000-FI (Ocean Optics), žadinimui naudojant 10 mW galios mėlynos šviesos diodą, spinduliuojantį ties 407 nm, parodė, kad odos fluorescencijos spektrų intensyvumas ir forma priklauso nuo žmogaus odos tipo ir jautriai reaguoja į bet kokius odos pažeidimus arba pakitimus.

Tiriant sveikos odos savitąją fluorescenciją nustatyta, kad įvairių žmonių odos spektrai skiriasi. To paties žmogaus skirtingų kūno vietų odos fluorescencijos spektrai taip pat turi nedidelių skirtumų. Įvairių rankos vietų nenormuoti odos fluorescencijos spektrai pateikiami 6.18 pav.a. Sunormavus ir suvidurkinus spektrus, išryškėja spektrų formų skirtumai. Didžiausi skirtumai matomi tarp skirtingų žmonių odos fluorescencijos spektrų, o to paties žmogaus skirtingų vietų odos fluorescencijos spektrai gana panašūs. Apgamo savitosios fluorescencijos spektrai matuoti keliose vietose iš esmės savo forma nesiskiria. Ties 488 nm sunormuoti apgamo fluorescencijos spektrai pateikiami drauge su bendru dviejų žmonių odos fluorescencijos spektro vidurkiu (6.18 pav.b). Skirtumai tarp šių spektrų yra gerokai didesni nei tarp atskirų asmenų sveikos odos savitosios fluorescencijos spektrų, todėl galima teigti, jog apgamas turi specifinę savitąją fluorescenciją ir dėl to sunku tiksliai diagnozuoti melanomines odos ligas.

Apibendrinant gautus rezultatus galima pažymėti, kad žmonių odos savitosios fluorescencijos spektrai yra skirtingi, todėl, taikant optinę biopsiją navikiniam odos pažeidimams aptikti, reikėtų remtis ne apibendrintu žmonių odos fluorescencijos spektru, o atlikti lyginamuosius matavimus registruojant to paties žmogaus sveikos odos ir įtartinų odos vietų fluorescencijos spektrus. Tokiu atveju specifiniai fluorescencijos spektrų

pokyčiai įtartinose vietose gali būti naudojami tam tikroms odos ligoms arba vėžiniams odos pokyčiams diagnozuoti ir jiems diferencijuoti.

6.5. Eksperimentinio naviko hepatomos A22 savitosios fluorescencijos matavimai *ex vivo*

Dėl pakitusių apykaitos procesų navikiniuose audiniuose jų savitosios fluorescencijos spektrai turi specifinių skirtumų, palyginti su sveikų audinių spektrais. Vieni esminių skirtumų, lemiančių sėkmingą navikinių darinių diagnostiką fluorescencinės spektroskopijos metodu, yra daug mažesnis navikinių audinių savitosios fluorescencijos intensyvumas žaliojoje spektro srityje (490–580 nm) ir intensyvesnė endogeninių porfirino tipo pigmentų fluorescencija 600–700 nm srityje (6.8 pav. 2 kreivė). Sveikų audinių spektrams būdinga juosta su smaile ties 560 nm ir jų savitoji fluorescencija yra daug intensyvesnė negu navikinių audinių (6.8 pav. 1 kreivė). Mūsų matavimai patvirtino kitų autorių (Andersson-Engels ir kt., 1991; Marchesini ir kt., 1992) duomenis apie tai, kad navikinių audinių savitoji fluorescencija 490–600 nm ruože yra silpnesnė negu sveikų, taip pat išryškino atskirų naviko sričių fluorescencijos specifiškumą.

Navikinių darinių savitosios fluorescencijos tyrimams naudotos C₅₇B1 linijos pelės (patelės, 21–25 g svorio, 8–10 savaičių), kurioms buvo įskiepyta hepatoma A22. Matavimai pradėti praėjus septynioms dienoms po įskiepijimo, kai naviko dydis 0,07 cm³; kiti matavimai atlikti praėjus 9, 12, 14, 16 ir 19 dienų po įskiepijimo (kol naviko dydis pasiekė 1 cm³). Kontroliniams matavimams paimti tų pačių pelių sveikų audinių (raumens) bandiniai.

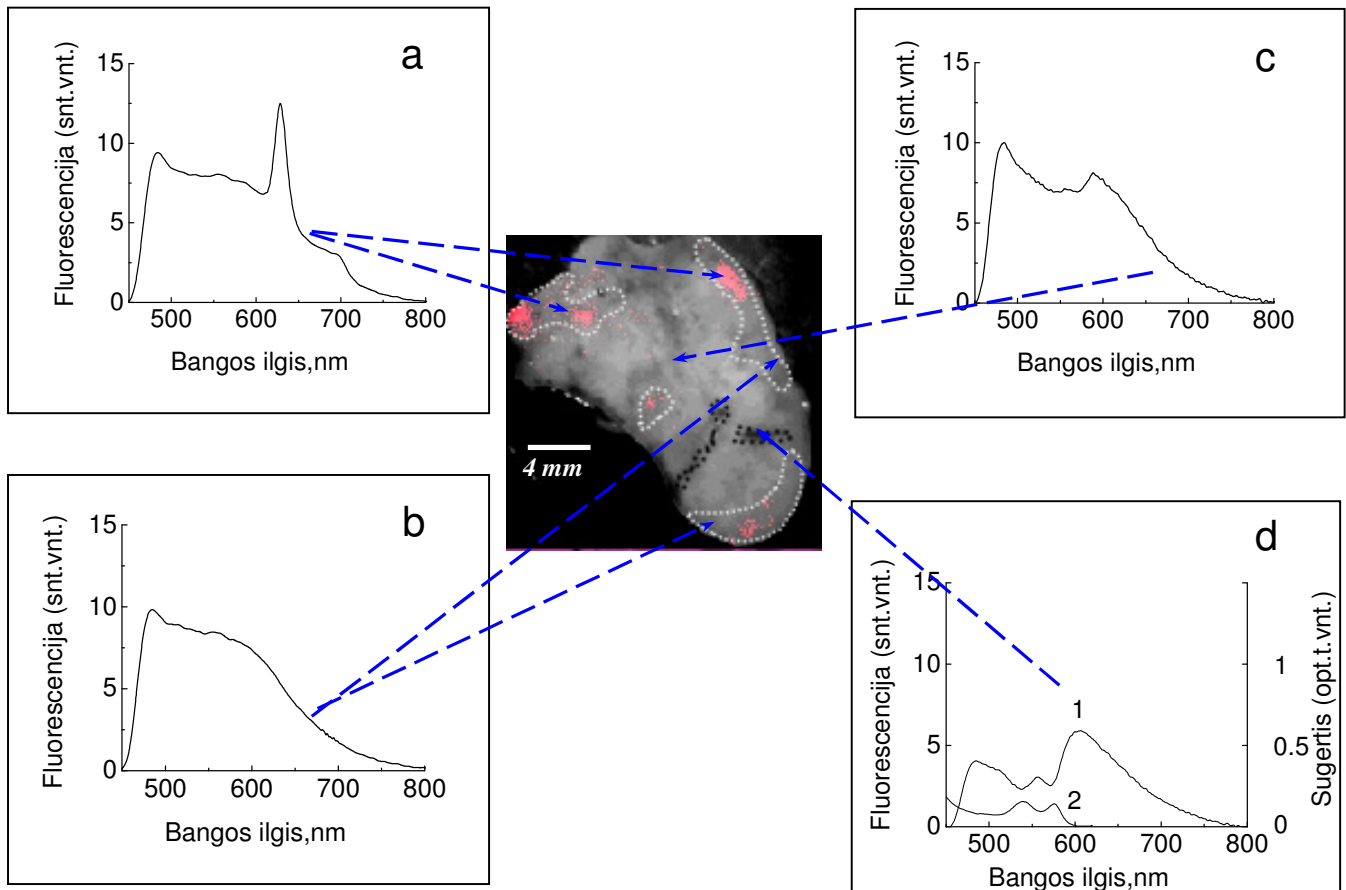
Fluorescencijos matavimams maždaug 3 mm storio mėginiai buvo įdėti tarp dviejų stiklo plokštelių. Naviko zonos – nekrozinė, nepažeista nekrozės ir hemoraginė – nustatytos mikroskopiškai.

Mėginių savitoji fluorescencija buvo matuota 450–800 nm spektriniame ruože šviesolaidiniu spektrofluorimetru S2000-Fl (Ocean Optics). Fluorescencijos žadinimui naudotas mėlynos šviesos šaltinis LED ($\lambda_{\text{žad}} = 405 \text{ nm}$).

Morfologinė navikinių darinių analizė parodė, kad didelio tūrio navikams būdingos nekrozinės ir nekrozės nepažeistos sritys (6.19 pav.). Taip pat nustatyta, kad

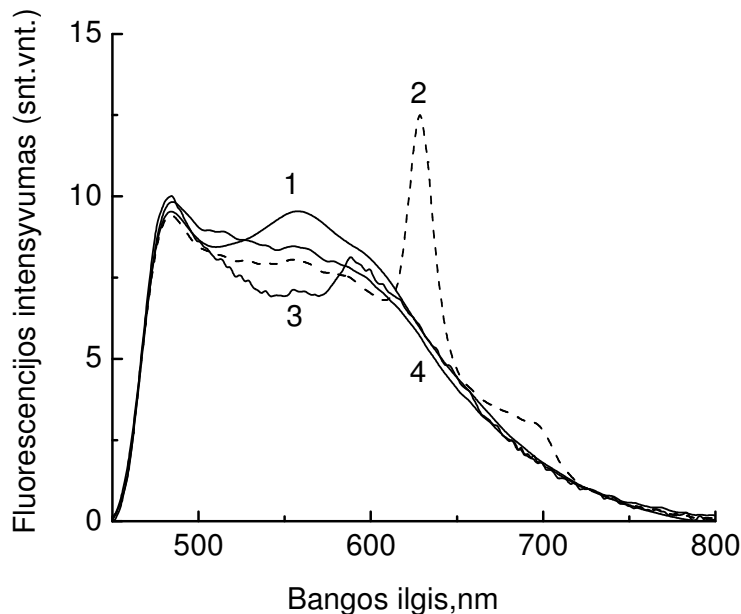
savitosios fluorescencijos spektrai gali būti iškreipti kraujo ekranavimo efekto, atsirandančio dėl kraujavimo pjūvio vietoje (6.19 pav.). Šis ekranavimo efektas gali paslėpti specifinius sveiko ir navikinio audinio savitosios fluorescencijos skirtumus, užtikrinančius tikslų navikinių audinių atpažinimą. Tiek sveikų, tiek ir navikinių audinių savitosios fluorescencijos spektrai pasižymi heterogeniškumu. Todėl buvo išmatuoti 90 nekrozės nepažeistų sričių, 60 nekrozių naviko sričių, 33 hemoraginių naviko sričių ir 25 sveikų audinių mėginių savitosios fluorescencijos spektrai, kuriuos išanalizavę galėjome pateikti apibendrinančias išvadas, rodančias įvairių morfologiškai atpažintų atskirų navikinio audinio sričių savitosios fluorescencijos spektrų specifiškumą (Tamošiūnas ir kt., 2004).

Lyginamoji savitosios fluorescencijos spektrų formos skirtumų analizė atlikta sunormavus spektrų vidurkius (6.20 pav.). Skirtingų navikų savitosios fluorescencijos spektrų vidurkiuose išryškėja du nekrozės nepažeistų navikinių audinių spektrų tipai (6.20 pav. 1 ir 2 kreivės). Esminiai skirtumai matomi 610–700 nm ruože. Spektrai,



6.19 pav. Išoperuoto naviko pjūvio vaizdas. Pažymėtos skirtingos morfologijos navikinio audinio sritys ir tarpuose pavaizduoti atitinkamų sričių savitosios fluorescencijos ir kraujo sugerties spektrai: **a** – nekrozės nepažeistos navikinio audinio sritys, pasižyminčios intensyvia endogeninių porfirinų fluorescencija 600–700 nm ruože; **b** – nekrozės nepažeistos navikinio audinio sritys, neturinčios endogeninių porfirinų; **c** – nekrozinės navikinio audinio sritys; **d** – kraujosruvų audinyje sritys (1 – audinio fluorescencijos spektras; 2 – kraujo sugerties spektras).

turintys siaurą juostą ties 633 nm ir plačią juostą ties 700 nm (6.20 pav. 2 kreivė), būdingi ribotoms nekrozės nepažeistoms sritims didelio tūrio navikuose (praėjus 14 ir daugiau dienų po įskiepijimo). Kitas spektrų tipas (6.20 pav. 2 kreivė) neturi šių juostų ir forma yra panašus į nekrozinų naviko audinių (3 kreivė) ir sveikų audinių (4 kreivė) spektrus



6.20 pav. Sunormuoti sveiko ir navikinio (hepatoma A22) audinių savitosios fluorescencijos spektrai ir jų vidurkiai, išmatuoti *ex vivo*: 1 – sveiko audinio (odos virš raumens); 2, 4 – nekrozės nepažeisto navikinio audinio; 3 – nekrozinio navikinio audinio

610–710 nm ruože. Pirmojo tipo spektrams būdingos fluorescencijos juostos ties 633 nm ir 700 nm priskiriamos endogeniniam protoporfirinui IX (Rotomskis ir kt., 2002). Taigi didelio tūrio navikams būdingas netolygus endogeninių porfirinų pasiskirstymas atskirose nekrozės nepažeistose srityse. Antrojo tipo savitosios fluorescencijos spektrai (neturintys endogeniniams porfirinams būdingų juostų) būdingi mažo tūrio navikams ir kai kurioms didelio tūrio navikų nekrozės nepažeistoms sritims. Remiantis šiais duomenimis darytina išvada, kad endogeninių porfirinų kaupimasis navikiniame (hepatomos A22) audinyje priklauso nuo naviko augimo stadijos: kol navikas mažas, jame endogeninių porfirinų neaptinkama; dideliuose navikuose endogeniniai porfirinai aptinkami tik atskirose nekrozės nepažeistose naviko srityse. Šie eksperimentinių tyrimų duomenys rodo, kad, norint atskirti sveiką ir navikinį audinį, nepakanka išanalizuoti savitosios fluorescencijos pokyčius vien raudonojoje spektro srityje (600–700 nm), būtina atlikti platesnio spektrinio ruožo (495–750 nm) savitosios fluorescencijos spektrų analizę.

Nekrozinų navikinių audinių sričių savitosios fluorescencijos spektrų forma (6.20 pav.) gerokai skiriasi nuo nekrozės nepažeistų naviko sričių ir sveikų audinių spektrų

490-600 nm srityje. Nekrozinių sričių spektrams būdingas mažesnis fluorescencijos intensyvumas ir įdubos ties 536 nm ir 577 nm. Tokios pat įdubos būdingos ir navikinių audinių hemoraginėms sritims (6.20 pav.). Kraujo sugerties juostų smailių padėtis sutampa su navikinių audinių hemoraginėms sritims būdingomis įdubomis ties 536 nm ir 577 nm. Taigi šios įdubos gali būti kraujo hemoglobino reabsorbcijos padarinys. Pirma, toks spektrų formos pokytis hemoraginėse navikų srityse apsunkina tikslų navikinių ir sveikų audinių ribų atskyrimą, antra, tokie savitosios fluorescencijos spektrų pokyčiai gali padėti spektroskopiškai atpažinti kraujosruvas audiniuose arba kraujo indų pažaidas.

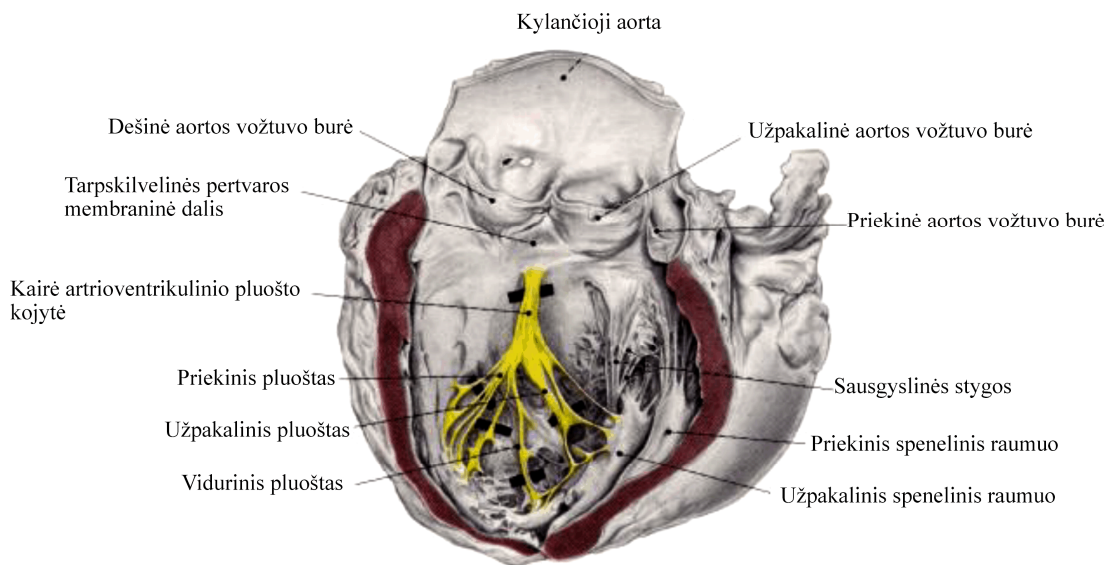
Apibendrinant galima teigti, kad santykinai mažesnis fluorescencijos intensyvumas 495–600 nm spektriniame ruože ir endogeninių porfirinų fluorescencijos juostų 600–700 nm spektriniame ruože formavimasis navikinių audinių spektruose galėtų padėti aptikti navikinius audinius. Tačiau tokie audiniai tiksliai atpažįstami tik juos apžiūrėjus, t. y. nustatius, ar nėra kraujosruvų, suirusio audinio. Taigi savitosios fluorescencijos spektrų analizė suteikia daug papildomos informacijos, padedančios atpažinti sveiką ir navikinį audinį, tačiau galutinė išvada turi būti daroma atsižvelgus ir į kitus apžiūros veiksnius.

6.6. Žmogaus širdies laidžiosios sistemos fluorescencinis vaizdinimas

Spektroskopinis audinių savybių vertinimas nusipelno išskirtinio dėmesio. Ieškoma būdų, kaip plika akimi nematomi skirtumai tarp skirtingas funkcijas atliekančių audinių galėtų būti išryškunami analizuojant jų fluorescencijos spektrus, ir tiriama, kaip audinių optiniai parametrai susiję su organizmo fiziologiniais pokyčiais ar ligomis. Vienas iš tokių sėkmingų pavyzdžių –baltoje šviesoje sunkiai atskiriamų skirtingas funkcijas organizme atliekančių audinių – širdies laidžiosios sistemos ir miokardo vaizdinimas, parenkant fluorescencijos žadinimo bangos ilgus ir registruojant audinių savitosios fluorescencijos vaizdą tam tikroje spektro srityje.

Širdies laidžioji sistema yra specializuotas raumeninės kilmės audinys, generuojantis ir perduodantis bioelektrinį impulsą, sukeltantį miokardo susitraukimą. Impulsai yra generuojami sinusiniame mazge ir prieširdžio raumens specifinėmis

skaidulomis 0,5 m/s greičiu sklinda į atrioventrikulinį (AV) mazgą, kuriame impulso sklidimo greitis sumažėja iki 0,05 m/s. Sutrikus sinusinio mazgo veiklai, AV mazgas taip pat gali generuoti bioimpulsus, tik gerokai retesnius. AV mazgo apatinis galas pereina į prieširdinį skilvelio pluoštą, o šis sujungia skilvelius su prieširdžiais ir vadinamas Hiso pluoštu. Jame bioimpulsas sklinda didžiausiu – 5 m/s greičiu. Šis pluoštas pačiame tarpiskilvelinės pertvaros viršuje suskyla į dvi šakas, kurios skilvelių miokarde išsišakoja. Kairioji Hiso pluošto šaka yra gana plati (6.21 pav.), o dešinioji – siūlo formos.



6.21 pav. Kairysis prieširdis ir skilvelis su Hiso pluošto kairiaja šaka

Širdies laidžioji sistema yra sudėtingas ląstelių tinklas, koordinuojantis širdies veiklą. Šį laidų tinklą sudarančių ląstelių veiklą reguliuojantis molekulinis mechanizmas nėra aiškus. Nedaug žinoma ir apie žinduolių širdies laidžiosios sistemos vystymąsi, o histologinė laidžiosios sistemos identifikacija taip pat tebėra problemiška. Morfologiniai tyrimai, išryškinantys širdies raumens ir laidžiosios sistemos audinių ląstelinės architektūros skirtumus, atliekami histologiniuose preparatuose dažant ne raumenį ir laidžiąją sistemą, o retikulines ir kolageno skaidulas (Morita ir Shimada, 1992). Jau yra aiškių įrodymų, kad miocitai nesudaro ištisinės visumos, kaip manyta anksčiau. Mikroskopiniai skilvelių miokardo tyrimai rodo, kad miocitai sudaro atskirus sluoksnius su plačiais tarpais tarp jų. Tokia sluoksninė struktūra yra sujungta spinduliškos

orientacijos raumenų sluoksniais ar pluoštais. Kaip tokia struktūra veikia širdies elektrines savybes, nėra aišku (Hooks ir kt., 2002). Atrioventrikulinio mazgo fiziologines savybes lemiančios anatomicinės ir funkcinės priežastys taip pat yra ginčytinos (Billete, 2002).

Sergamumas širdies ritmo ir laidumo sistemos sutrikimais yra aktuali nūdienos problema. Širdies ritmo sutrikimai sudaro apie 12% staigių mirties atvejų, kurių priežasčių nepaaiškina nei anatomiciniai, nei mikroskopiniai, nei biocheminiai kraujo tyrimai (Cohle ir kt., 2002). Plėtojantis kardiologijai susiduriama su problema, kaip atliekant įvairias širdies operacijas išvengti laidžiosios sistemos pažeidimų. Širdies laidžiosios sistemos anatomija daugelio sudėtingų įgimtų širdies ydų atvejais nėra tiksliai žinoma ir tai komplikuoja chirurginę šių ydų korekciją, nes operacijoms naudojant modelines širdies laidžiosios sistemos schemas galima tik apytikriai nustatyti Hiso pluošto ir jo šakų padėtį. Todėl operuojant širdį kartais pažeidžiama širdies laidžioji sistema. Tai labai komplikuoja pooperacinį gydymą, o kartais ir negrįžtamai pažeidžia širdies darbą. Pasisekus rasti būdų ir metodų širdies laidžiajai sistemai vaizdinti, būtų galima nustatyti jos anatomines ypatybes sergant įvairiomis širdies ydomis ir taikyti tausojančias širdies ydų operacinių korekcijų metodikas. Taip pat būtų galima lengviau ir tiksliau įvertinti širdies laidžiosios sistemos būklę atliekant morfologinį širdies tyrimą. Šiuo metu taikoma histologinio tyrimo metodika reikalauja daug laiko ir lėšų, todėl nėra labai paplitusi. Tai, kad kliniškai pasireiškiantys širdies ritmo sutrikimai dažnai yra sunkiai paaiškinami širdies laidžiosios sistemos morfologiniais pokyčiais, rodo šios histologinės metodikos nevisavertiškumą. Diagnostikos metodas, kuris operuojant padėtų atskirti širdies laidžiąją sistemą nuo miokardo, labai palengvintų širdies chirurgų darbą ir sumažintų pooperacinių komplikacijų riziką. Kadangi savitoji fluorescencija atspindi audinių sudėtį ir struktūrą, ji puikiai turėtų tikti plika akimi neatskiriamų audinių diferenciacijai.

Iki šiol fluorescencinės spektroskopijos metodu atliktų širdies laidžiosios sistemos tyrimų yra labai nedaug. Laidžiosios sistemos AV mazgo lokalizacijos ieškota šuns širdyje (Aziz ir kt., 1992). Fluorescencija žadinta 308 nm ir 364 nm bangos ilgio spinduliuote, tačiau didesnių AV mazgo ir miokardo fluorescencijos skirtumų nerasta.

Ieškant audinių aterosklerozinių pokyčių buvo tirta kiaulės širdies miokardo, aortos bei pluoštinio audinio fluorescencija, žadinama azoto lazerio 337 nm bangos ilgio spinduliuote (Nilsson ir kt., 1997). Visuose spektruose išryškėjo fluorescencijos juosta 390–410 nm srityje, kuri priskiriama kolagenui (smailė ties 390 nm) ir elastinui (smailė ties 410 nm). Elastino fluorescencija dominuoja ir tai leidžia daryti prielaidą, kad aortoje elastino koncentracija yra didesnė nei miokarde. Miokardo savitosios fluorescencijos spektre taip pat matyti plati fluorescencijos juosta, kurios intensyvumo smailė yra ties 463 ± 3 nm. Gauti spektrai buvo analizuojami principinių komponentų analizės metodu ir atskleidė keletą būdingų bruožų, pagal kuriuos galima klasifikuoti audinius.

Buvo tirta jaunų avių miokardo bandinių, paimtų iš prieširdžių ir skilvelių, savitoji fluorescencija (Kochiadakis ir kt., 2001), žadinama argono jonų lazerio spinduliuote ties 457,9 nm. Fluorescencija registruota spektriniame ruože nuo 500 nm iki 700 nm. Nustatyta, kad prieširdžių fluorescencija intensyvesnė negu skilvelių. Laidžiosios sistemos neieškota.

Perk su bendraautoriais tyrė žmogaus širdies laidžiosios sistemos sinusinio ir AV mazgų fluorescenciją (Perk ir kt., 1993). Paaiškėjo, kad šių mazgų savitoji fluorescencija, žadinama eksimeriniu XeCl lazeriu (308 nm), aiškiai skiriasi nuo miokardo fluorescencijos. Širdies laidžiosios sistemos mazgų fluorescencijos intensyvumas spektro ruože nuo 440 nm iki 500 nm mažesnis už prieširdžių fluorescencijos intensyvumą ir didesnis už skilvelio fluorescenciją. Taigi lazerio spinduliuote sužadinta fluorescencija padeda atskirti sinusinio ir AV mazgų audinius nuo prieširdžių endokardo. Tai teikia vilčių sukurti diagnostikos metodiką, padedančią atpažinti širdies laidžiąją sistemą ir kitus širdies audinius.

Literatūros duomenys apie širdies laidžiosios sistemos ir darbinio miokardo struktūrinius skirtumus gana prieštaringi. Rusų mokslininkas V. Jelisejevas 1963 m. nustatė, kad širdies laidžiojoje sistemoje yra daug sukcinatdehidrogenazės ir specifinės cholinesterazės. Kiti autoriai manė, kad širdies laidžiojoje sistemoje esanti specifinė cholinesterazė yra analogiška periferinių nervų cholinesterazei, ir ją siejo su impulso sklaidimo mechanizmu. Buvo ir tokių darbų, kai tiriant periferinių nervų ir širdies laidžiosios sistemos cholinesterazės aktyvumą širdies laidžiojoje sistemoje neaptikta jokių jos pėdsakų. Tokių duomenų nesutapimą galima paaiškinti tuo, kad buvo tiriamos

skirtingos širdies laidžiosios sistemos dalys – AV mazge gausu nervinių rezginių, todėl tikėtina didesnė cholinesterazės koncentracija nei kitose srityse.

Daugelio publikacijų autoriai nevienareikšmiškai vertina vienus ar kitus pastebėtus skirtumus, tačiau duomenų analizė rodo, kad skirtumai tarp šių dviejų skirtingas funkcijas atliekančių širdies audinių vis dėlto yra. Todėl mūsų tyrimais buvo tikimasi pasitelkiant spektroskopinius metodus užfiksuoti skirtumus tarp širdies laidžiosios sistemos ir miokardo ir sukurti fluorescencinio širdies laidžiosios sistemos vaizdinimo pagrindus (Žurauskienė ir kt., 2001; Žurauskas ir kt., 2004).

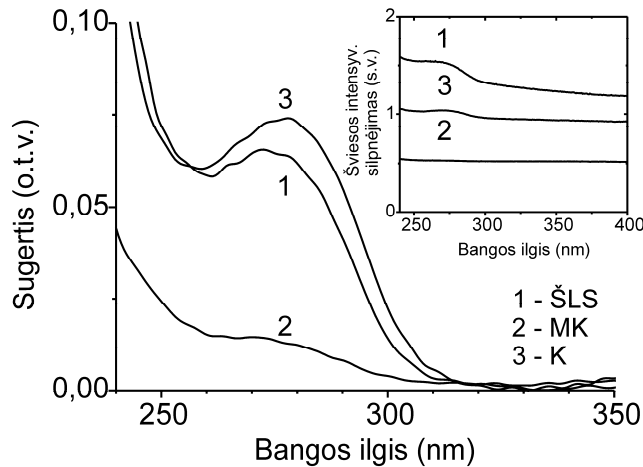
Širdies audinių sugerties spektrai. Struktūrinių širdies laidžiosios sistemos ir miokardo skirtumų, galinčių lemti skirtingas jų savybes ir funkcijas, buvo ieškoma UV sugerties spektroskopijos metodais. Biologiniuose audiniuose šios srities šviesą intensyviausiai sugeria į baltymų sudėtį įeinančios aromatinės aminorūgštys, ypač triptofanas (Trp) ir tirozinas (Tyr). Širdies audinių bandiniai buvo paimti iš atsitiktinai pasirinktų širdžių preparatų, neatsižvelgiant į amžių ir patologiją. Širdies laidžiosios sistemos ir miokardo audinių mėginiai buvo fiksuojami 10% neutraliame formalino tirpale, apliejami parafinu, supjaustomi 15 μm storio sluoksniais ir dedami tarp kvarco plokštelių. Audinių UV sugerties spektrai buvo matuojami šviesolaidiniu spektrometru PC 1000 (Ocean Optics Inc., FL, USA).

Širdies laidžiosios sistemos ir miokardo sugerties spektrai pateikiami 6.22 paveiksle. Širdies audinių spektrai buvo lyginami su kasos audinio, turinčio daug Tyr ir Trp, spektrais. Visais atvejais buvo matuojami nuo 8 iki 12 mėginių spektrai, paskui jie sudedami ir suvidurkinami. Šviesos sklaidos įnašas į sugerties spektrus buvo eliminuojamas (Žurauskienė ir kt., 2001).

Širdies laidžiosios sistemos ir kasos mėginių sugerties spektrai yra panašūs, jiems būdinga juosta ties 270–280 nm (6.22 pav. 1 ir 3 kreivės). Miokardo mėginių sugerties intensyvumas yra daug mažesnis ir spektre ši juosta labai silpna (6.22 pav. 2 kreivė).

UV spektrinio ruožo šviesą audinių mėginiuose sugeria endogeniniai chromoforai – aromatinės aminorūgštys, elastinas ir kolagenas (Katz ir Alfano, 2000). Baltymus sudaro dvidešimt aminorūgščių, bet tik trys iš jų – Trp, Tyr ir fenilalaninas (Phe) – turi konjuguotas π elektronų sistemas ir gali sugerti UV srities šviesą. Didžiausią

ekstinkcijos koeficientą šioje spektro srityje turi Trp; Phe sugertis yra silpna ir jos įnašas į spektrą labai menkas. Taigi širdies laidžiosios sistemos ir miokardo mėginių sugerties spektrų skirtumus lemia nevienodos Trp ir Tyr koncentracijos juose.



6.22 pav. Pašalinius sklaidą suvidurkinti širdies laidžiosios sistemos (ŠLS), miokardo (MK) ir kasos (K) audinių sugerties spektrai. Intarpas: šviesos intensyvumo silpnėjimas sklindant ŠLS, MK ir K audiniais

Sugerties spektroskopijos metodas dažnai taikomas įvairių biologinių objektų kiekybinei analizei. Taikymas grindžiamas tuo faktu, kad mišinio optinis tankis yra lygus jo komponentų optinių tankių sumai. Sudarius atitinkamas lygčių sistemas (Žurauskienė ir kt., 2001) buvo apskaičiuotos aminorūgščių Tyr ir Trp koncentracijos tirtuose audiniuose (6.2 lentelė).

6.2 lentelė. Aminorūgščių kiekiai kasos, širdies laidžiosios sistemos ir miokardo audiniuose

Audinys	$C_{Tyr}, \mu M$	$C_{Trp}, \mu M$
Širdies laidžioji sistema	21,0	1,5
Miokardas	5,2	0,6
Kasa	15,0	4,0

Širdies laidžiosios sistemos ir kasos audiniuose yra gerokai daugiau aromatinių aminorūgščių negu miokarde. Kadangi tiriamų audinių spektrinės savybės susijusios su aromatinių aminorūgščių koncentracijomis juose, šios rūgštys galėtų būti fluorescenciniais žymenimis vaizdinant širdies audinius. Širdies laidžioji sistema, turinti didesnę kiekį aromatinių aminorūgščių, fluorescencinės spektroskopijos metodais galėtų būti atskiriama nuo aplinkinių audinių žadinant audinių fluorescenciją 260–295 nm srityje, kurioje širdies laidžiosios sistemos sugertis yra daug intensyvesnė negu miokardo.

Širdies audinių fluorescencijos spektrai. Baltymų fluorescencija iš kitų biocheminių junginių fluorescencijos išsiskiria unikalėmis savybėmis ir dėl to yra labai plačiai taikoma biologiniams objektams tirti. Lipidinės membranos ir polisacharidai nefluorescuoja, o DNR fluorescencija yra per silpna, kad ją būtų galima naudoti. Baltymuose fluorescuoja trys aminorūgštys: Trp, Tyr ir Phe. Jos čia santykinai retos: vyraujantis fluoroforas Trp sudaro ne daugiau kaip 1% aminorūgščių kiekio. Daugumos baltymų fluorescencija priklauso nuo Trp liekanų, į kurių sudėtį įeinantis indolas yra labai jautrus artimos aplinkos pokyčiams. Baltymų fluorescencijos spektrus taip pat veikia asociacijos, denatūracijos ir kitokios reakcijos. Todėl galima tikėtis, kad ne tik skirtingas aromatinių aminorūgščių kiekis miokardo ir laidžiosios sistemos audiniuose, bet ir jų aplinka bei išsidėstymas baltyminėje globulėje gali lemti skirtingą audinių fluorescenciją, o kartu ir galimybę atskirti širdies laidžiosios sistemos fluorescenciją miokardo fluorescencijos fone.

Detalią baltymų fluorescencijos analizę sunkina tai, kad ją veikia daugybė aplinkos veiksnių ir kad daugelyje baltymų yra ne viena, o kelios Trp liekanos. Jei kiekviena jų yra skirtingoje aplinkoje, jų spektrinės savybės gali skirtis. Kai Trp liekanų spektrai vienas kitą dengia, sunku išskirti kiekvienos iš jų indėlį į baltymo spektrą. Sudėtinga indolo heterociklo fotofizika reikalauja išsamių baltymų fluorescencijos tyrimų ir sunkina rezultatų interpretaciją. Tačiau, nepaisant tokio baltymų fluorescencijos sudėtingumo, pastaraisiais metais gauta daug įdomių spektroskopinių rezultatų. Tik vieną Trp liekaną turinčių baltymų ištyrimas leidžia sukurti jo spektrinių savybių bazę, naudingą interpretuojant sudėtingus fluorescencijos atvejus. Baltymų fluorescencija vis plačiau taikoma tiriant baltymų funkcijas, jų struktūrą, dinamiką ir juose vykstančius procesus (Chen ir Barkley, 1998; Gutierrez ir kt., 2001).

Intensyviausiai iš visų aminorūgščių fluorescuoja Trp (Lakowicz, 1986). Jis sugeria didžiausio bangos ilgio spinduliuotę. Tyr ir Phe sugeria trumpesnių bangų šviesą ir sugertą energiją dažniausiai perduoda to paties baltymo Trp liekanoms. Phe sugeria ir fluorescuoja trumpiausių bangų ilgių šviesą. Jo fluorescencijos juostos smailė yra ties 282 nm. Tyr vandeninio tirpalo fluorescencijos juosta yra ties 303 nm, ir jos padėtis mažai priklauso nuo tirpiklio poliškumo. Trp vandeninių tirpalų fluorescencijos juostos smailė yra ties 350 nm, o jos padėtis labai priklauso nuo tirpiklio poliškumo ir aplinkos. Baltymų fluorescencija paprastai žadinama ties 280 nm (sugerties juostos smailė) arba didesnių bangų ilgių spinduliuote. Taigi Phe dažniausiai yra nesužadinamas. Trp fluorescencija gali būti selektyviai žadinama 295 nm–305 nm bangos ilgio spinduliuote.

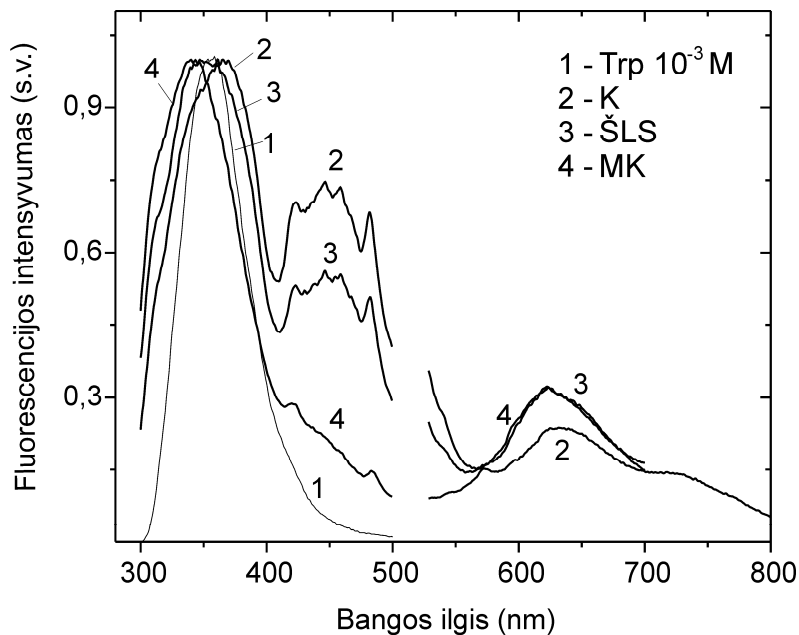
Trp fluorescencija sėkmingai taikoma tiriant struktūrinius biomolekulių pokyčius tirpaluose, išskirtose biologinėse membranose ir ląstelėse (Kronman ir Holmer, 1971; Vekshin, 1999; Strambini ir Connell, 1990). Tyr fluorescencijos paprastai nepaisoma, tačiau tam tikromis sąlygomis Tyr pasižymi sudėtingomis spektrinėmis savybėmis. Sužadintosios būsenos Tyr liekana gali netekti aromatinio žiedo hidroksilo grupės protono. Šio hidroksilo pagrindinės būsenos pK yra apie 10; sužadintosios būsenos – sumažėja iki 4. Neutraliame tirpale per sužadintosios būsenos gyvavimo trukmę hidroksilo grupė gali disocijuoti. Tai sukelia Tyr fluorescencijos juostos ties 303 nm gesinimą, bet atsiranda silpna tirozinato fluorescencija ties 345 nm, ir ji klaidingai gali būti priskirta Trp fluorescencijai.

Širdies laidžiosios sistemos bandiniai buvo imami iš Hiso pluošto. Jame yra didžiausias bioimpulso sklidimo greitis, todėl tikėtasi, kad jo spektrai labiausiai skirsis nuo miokardo bandinių spektrų. Miokardo bandiniai buvo imami iš širdies skilvelių audinių. Kadangi operuojantis chirurgas turi žinoti Hiso pluošto kairiosios ir dešinėsios šakų lokalizaciją širdies paviršiuje, buvo tiriami ir bandiniai, paimti iš širdies skilvelio paviršiaus. Hiso pluošto šakos yra gana plonos. Jų matmenys siekia vos 1–2 mm, todėl jos nebuvo atskiriamos nuo miokardo. Tyrimams buvo naudojami 2–3 cm dydžio miokardo gabaliukai su Hiso pluošto šakomis, kurių padėtis nustatyta mikroskopu.

Gauti spektrai buvo lyginami su kasos bandinių ir Tyr bei Trp 10^{-3} M koncentracijos vandeninių tirpalų spektrais. Fluorescencijos ir jos žadinimo spektrai buvo registruojami liuminescenciniu spektrofotometru “Perkin Elmer LS-50B”.

Monochromatorių plyšių spektriniai pločiai matavimo metu buvo pastovūs: žadinimo monochromatoriaus – 5 nm, fluorescencijos monochromatoriaus – 7 nm. Bandiniai buvo suspaudžiami tarp dviejų kvarcinių langelių. Taip įtvirtinti jie neišdžiūdavo ir matavimo metu jų spektrinės savybės nekisdavo.

Audinių fluorescencijos spektrai pateikiami 6.23 paveiksle. Ties 255 nm sužadinamos visos baltymus sudarančios aminorūgštys ir fluorescencijos spektruose turėtų išryškėti skirtingos audinių histologijos nulemti skirtumai. Visų audinių spektruose matoma plati ir intensyvi fluorescencijos juosta 300–400 nm srityje. Palyginus su Trp vandeninio tirpalo fluorescencijos juosta (smailė ties 353 nm) galima teigti, kad visų tirtųjų audinių spektruose šios juostos priklauso Trp, nors jų padėtys ir nevysiškai sutampa – kasos audinio spektre juostos smailė 10 nm pasislinkusi į ilgesniųjų bangų pusę, o miokardo – 15 nm į trumpesniųjų bangų pusę. Širdies laidžiosios sistemos fluorescencijos juosta platesnė ir jos smailė beveik sutampa su Trp tirpalo smaile.



6.23 pav. Trp vandeninio tirpalo ($c=10^{-3}$ M), širdies laidžiosios sistemos (ŠLS), miokardo (MK) ir kasos (K) audinių fluorescencijos spektrai, normuoti į didžiausią smailės vertę ($\lambda_{\text{žad.}}=255$ nm)

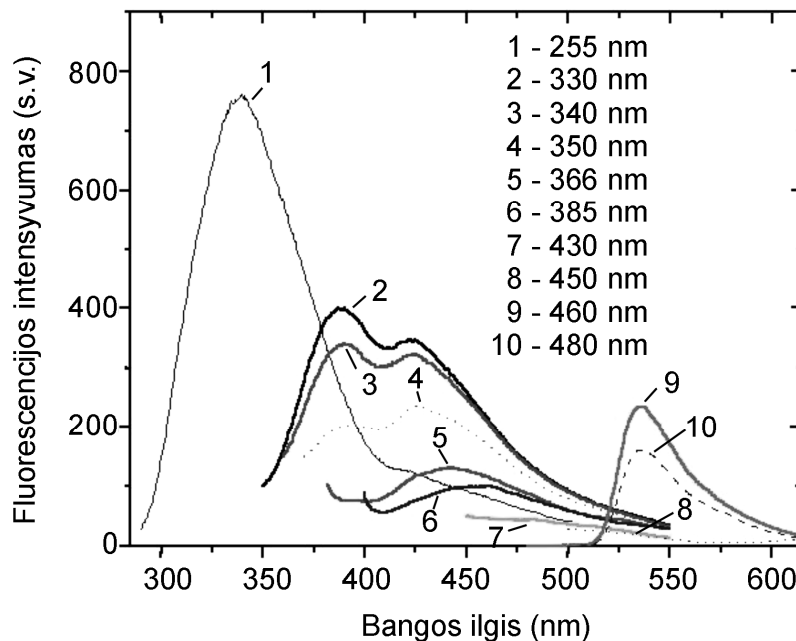
Yra žinoma, kad žmogaus kraujo serumo albumino fluorescencijos spektras yra trumpesnėje bangų ilgių srityje negu Trp vandeninio tirpalo spektras (Vekshin ir kt., 1992). Poslinkis į trumpųjų bangų pusę atsiranda dėl to, kad baltyminė matrica ekranuoja Trp liekanas nuo hidratinio vandens ir tirpiklio. Baltymų fluorescencijos juostų padėtis kinta dėl skirtingos Trp liekanų lokalizacijos natyvuose baltymuose. Ilgabangis spektro poslinkis pasireiškia Trp liekanoms kontaktuojant su hidratiniu vandeniu. Fluorescencijos juostų poslinkio mechanizmas aiškinamas Trp sąveika su vandens molekulės hidroksilo grupės virpesiais (Vekshin ir kt., 1992). Manoma, kad batochrominis poslinkis priklauso nuo Trp liekanos solvacinio apvalkalo tarp molekulinų virpesių, perimančių sužadintų Trp molekulių energiją. Ši energijos perdavimą lemia stipri sąveika tarp Trp sužadintosios būsenos ir aplinkinių vandens molekulių.

Miokardo fluorescencijos juostos poslinkis į trumpųjų bangų pusę Trp vandeninio tirpalo spektro atžvilgiu (6.23 pav.) rodo, kad Trp liekanos miokarde yra izoliuotos nuo vandens molekulių. Kadangi Trp vandeninio tirpalo ir Trp liekanų širdies laidžiosios sistemos fluorescencijos juostų padėtys sutampa, galima daryti išvadą, kad Trp liekanos juose yra hidratuotos. Juosta išplinta dėl skirtingose aplinkose esančių Trp liekanų vienas kitą dengiančių spektrų.

Ilgesnių bangų srityje ($\lambda > 410$ nm) tirtų audinių spektruose matomos kelios daug siauresnės juostos (6.23 pav.). Jų intensyvumas didžiausias kasos audinių spektre, mažiausias – miokardo. Smalių padėtys kasos ir širdies laidžiosios sistemos spektruose sutampa ir yra ties 423 nm, 445 nm, 458 nm ir 481 nm. Miokardo fluorescencija šioje srityje yra daug silpnesnė ir atskiros juostos neišsiskiria. Ši mėlynosios spektro srities fluorescencija nepriklauso Trp. Čia fluorescuoja įvairūs Trp apykaitos produktai, kurie gali būti gaunami švitinant UV ir net regimosios šviesos spinduliuote Trp vandeninius tirpalus esant CaCl_2 ir kitų druskų priemaišų (Creed, 1984; Vorobei ir kt., 1992; Truong, 1980; Borkman ir kt., 1977).

Trp fotodestrukcijos produktai nėra vieninteliai mėlynojoje spektro srityje fluorescuojantys fluoroforai. Biologiniuose audiniuose ties 440 nm fluorescuoja kolagenas, elastinas ir NADH. Žadinant 337 nm lazerio spinduliuote spektro srityje nuo 370 iki 510 nm fluorescuoja sveiki ir aterosklerozės pažeisti žmogaus aortos bandiniai (Baumgartner ir kt., 1996). Autorių nuomone, kraujagyslių sienelių fluorescencijos

spektruose labiausiai pasireiškia elastino juosta (jos smailė yra ties 410 nm), kuri beveik sutampa su kolageno, tarpląstelinės medžiagos baltymų ir pirminių glikozaminoglikanų fluorescencijos juostomis.



6.24 pav. Hiso pluošto fluorescencijos spektrai esant skirtingiems λ_{zad} . (fluorescencijos intensyvumai, kai $\lambda_{\text{zad}} = 460$ nm ir 480 nm, pateikti 10 kartų didesniu masteliu)

Bandant rasti optimalų vaizdinimui žadinančios šviesos bangos ilgį ir identifikuoti fluoroforus, mažais intervalais buvo keičiamas žadinančios spinduliuotės bangos ilgis. Apibendrinti Hiso pluošto fluorescencijos spektrai pateikiami 6.24 pav. Keičiant λ_{zad} kinta ir fluorescencijos spektras, taigi bandinyje yra ne viena fluorescuojanti medžiaga. Didinant λ_{zad} nuo 255 nm iki 480 nm išskiriamos vis naujos viena kitą dengiančios mažesnio intensyvumo fluorescencijos juostos. Žadinant 255 nm yra išskiriama intensyvi 100 nm pločio juosta su smaile ties 340 nm (I juosta) (6.3 lentelė), priskiriama Trp (Wagnieres ir Star, 1998). Taip pat sužadinama ir palyginti mažo intensyvumo fluorescencija mėlynojoje spektro srityje. Pakeitus žadinančios spinduliuotės ilgį į 330 nm, Trp fluorescencija nebesužadinama, o juostų, kurių smailės yra ties 390 nm (II juosta) ir 425 nm (III juosta) (6.3 lentelė), intensyvumai padidėja. Įdubos tarp juostų padėtis – 410 nm. Juostą ties 390 nm būtų galima priskirti baltymams – piridoksinui, kolagenui (Menter ir kt., 1995), argpirimidinui ir pentozidinui (Kessel ir kt., 2002), o ties 425 nm – elastinui (Maarek ir

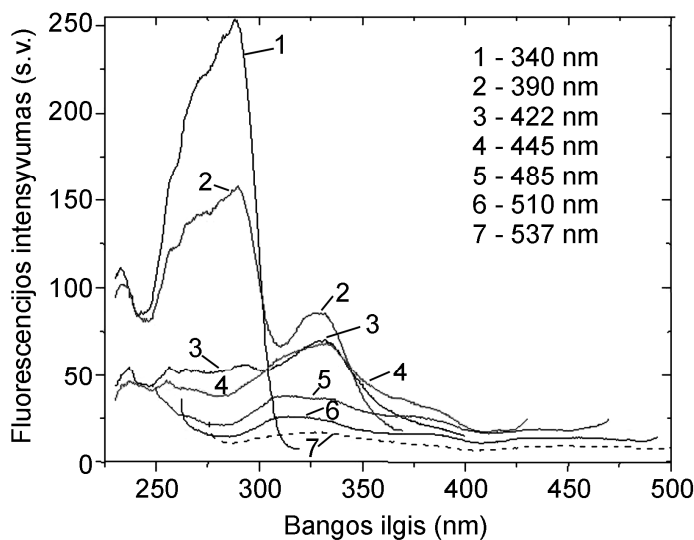
kt., 2000). Trp fluorescencijos juostos petys ilgesniųjų bangų pusėje gali atsirasti dėl piridoksino fluorescencijos. Juosta ties 390 nm yra intensyvesnė už juostą ties 425 nm. Tačiau kai $\lambda_{\text{žad}} = 350$ nm, šių juostų intensyvumai persiskirsto, ir juostos ties 390 nm intensyvumas sumažėja, o ties 425 nm – išauga. Be to, išryškėja petys ilgesniųjų bangų pusėje. Kai $\lambda_{\text{žad}} = 366$ nm, atsiranda nauja juosta su smaile ties 445 nm (IV juosta) (6.3 lentelė). Toliau didinant žadinančios spinduliuotės ilgį iki 385 nm, šios juostos intensyvumas dar labiau sumažėja, o smailės padėtis pasislenka iki 465 nm. III ir IV juostos gali būti suma dviejų fluoroforų fluorescencijos juostų, prie kurių prisideda elastino ir lipopigmentų fluorescencija. Šioje spektro srityje fluorescuoja ir nikotinamidadenindinukleotido redukuota forma (NADH). Esant dar didesniai žadinančios spinduliuotės bangos ilgiui atskiros fluorescencijos juostos nebeišskiriamos (V fluorescencijos sritis) (6.3 lentelė), nors fluorescencija dar sužadinama ir 480 nm bangos ilgio šviesa. Šioje srityje fluorescuoja lipopigmentai (nuo 450 nm iki 650 nm) ir flavinai (nuo 500 nm iki 600 nm); flavinadenindinukleotido (FAD) fluorescencijos smailė yra ties 520 nm (Croce ir kt., 2003).

Širdies audiniuose esančių endogeninių fluoroforų sugerties spektrams išskirti ir jų prigimčiai tiksliau išaiškinti buvo matuojami šių audinių fluorescencijos žadinimo spektrai registruojant fluorescenciją ties skirtingais bangų ilgiais (6.25 pav.). Gauti rezultatai patvirtina, kad fluorescuoja keli skirtingi fluoroforai. Kaip ir matuojant fluorescenciją, spektrai susideda iš kelių viena kitą dengiančių juostų, kurių intensyvumas mažėja registruojant fluorescenciją ties ilgesnėmis bangomis. Registruojant fluorescenciją ties 340 nm (I fluorescencijos juostoje) fluorescencijos žadinimo spektre matoma tik viena juosta, kurios smailė yra ties 285 nm. Smailės padėtis sutampa su Trp sugerties juostos smaile, tačiau spektrų forma skirtinga. Registruojant spektrą ties 390 nm (II juosta) išryškėja juostos ties 285 nm ir 330 nm. Ši sritis gali būti priskiriama piridoksinui, kurio fluorescencijos žadinimo juosta yra nuo 280 nm iki 350 nm, o smailė – ties 300 nm ir kolagenui, kurio sugerties smailė yra ties 330 nm. Registruojant fluorescenciją ties 422 nm (III juosta), juostos ties 285 nm nebeįmanoma išskirti, o juosta ties 330 nm beveik sutampa su juosta, matoma registruojant fluorescenciją ties 390 nm, tik ilgesniųjų bangų pusėje išryškėja petys. Registruojant fluorescenciją ties 445 nm šis petys dar labiau matomas – galima identifikuoti naują fluorescencijos žadinimo juostą ties 383 nm. Taip

pat ties šiuo bangos ilgiu ryškėja ir petys trumpesnių bangų pusėje. Fluorescencijos žadinimo spektro juostinė struktūra matoma registruojant fluorescenciją ties 485 nm. Išskirtų juostų padėtys tokios: 312 nm, 334 nm, 383 nm ir 430 nm. Registruojant spektrus ties didesniais bangų ilgiais – 510 nm, 537 nm – spektrų forma nebekinta, tik mažėja fluorescencijos žadinimo intensyvumas ir juostų struktūra tampa nebeišskiriama. Lyginant fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrus, buvo nustatyti galimi Hiso pluošto fluoroforai (6.3 lentelė).

6.3. lentelė. Hiso pluošto endogeninių fluoroforų fluorescencijos ir jos žadinimo spektrų juostų bangų ilgiai

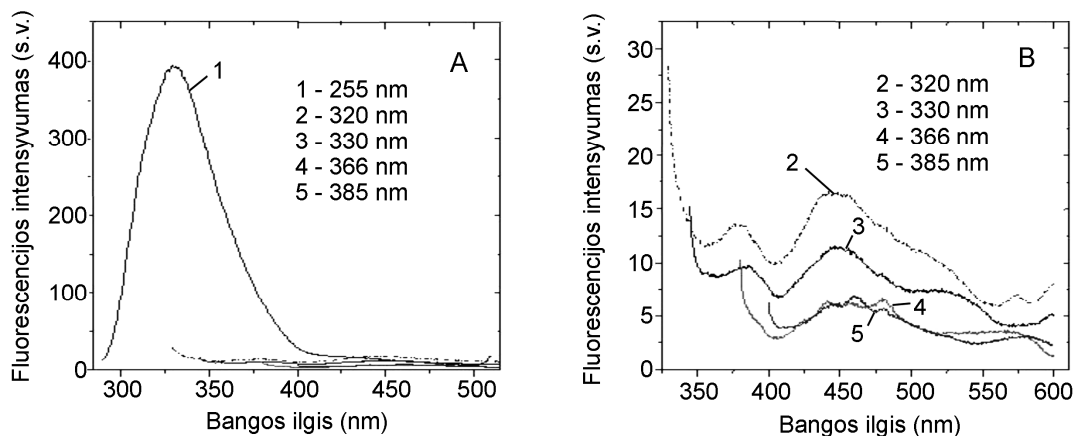
Fluorescencijos juosta	Fluorescencijos žadinimo spektro smailės, nm	Fluorescencijos spektro smailės, nm	Galimas fluoroforas
I	285	340	Triptofanas
II	285, 330	390	Kolagenas, piridoksinas
III	330	425	Piridoksinas, elastinas, N-formilkinureninas
IV	330, 383	445	Ceroidai, kinureninas
V	312, 334, 383, 430	nuo 450	Lipopigmentai, flavinai



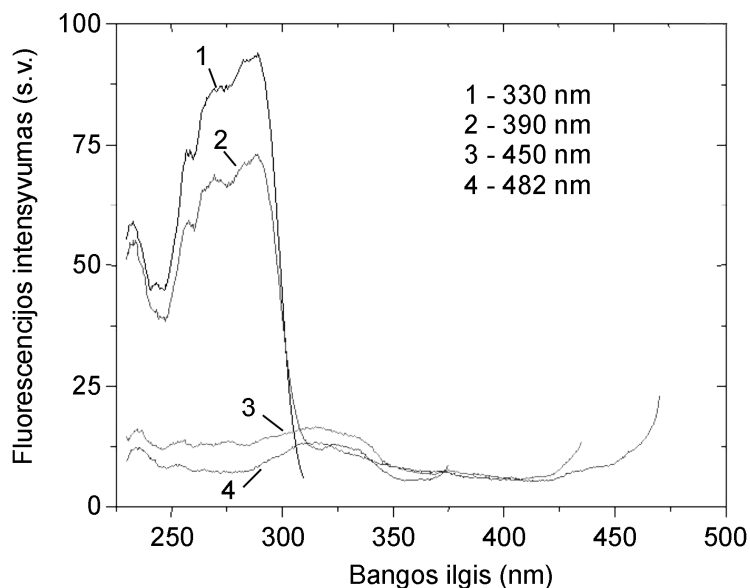
6.25 pav. Hiso pluošto fluorescencijos žadinimo spektrai registruojant fluorescenciją ties skirtingais bangų ilgiais (registruojant ties 340 nm fluorescencijos intensyvumas sumažintas 4 kartus)

Tokiu pat būdu buvo išmatuoti ir miokardo audinio fluorescencijos (6.26 pav.) bei fluorescencijos žadinimo spektrai (6.27 pav.). Miokardo audinių fluorescencijos

intensyvumas mėlynojoje spektro srityje yra daug mažesnis negu Hiso pluošto. Iš to galima daryti išvadą, kad ir fluoroforų koncentracija miokarde yra mažesnė. Buvo pabandyta identifikuoti miokardo audinio endogeninius fluoroforus. Miokardo mėlynosios srities fluorescencijos spektrai padidinus mastelį pateikiami 6.26 pav., B. Žadinant 320 nm ir 330 nm bangos ilgio šviesa yra sužadinamos trys juostos ties 380 nm (II), 445 nm (III) ir 530 nm (IV) (6.4 lentelė). Žadinant didesnių bangų ilgių spinduliuote spektrų forma ir išskirtų juostų padėtys išlieka tos pačios, tik išnyksta juosta ties 380 nm. Fluorescencijos žadinimo spektrai (6.27 pav.) patvirtina, kad ir miokardo audiniuose fluorescuoja keletas endogeninių fluoroforų, tik jų fluorescencija yra gerokai silpnesnė. Registruojant fluorescenciją ties 330 nm matoma juosta 280 nm srityje. Registruojant fluorescenciją ties 390 nm žadinimo spektre išsiskiria nauja juosta ties 330 nm. Registruojant ties didesniais bangų ilgiais (450 nm ir 482 nm) pasikeičia juostos smailės padėtis, ji pasislenka iki 312 nm, be to, išryškėja mažo intensyvumo juosta ties 380 nm. Gauti rezultatai apibendrinti 6.4 lentelėje.



6.26 pav. Miokardo audinių fluorescencijos spektrai esant skirtingiems $\lambda_{\text{žad}}$



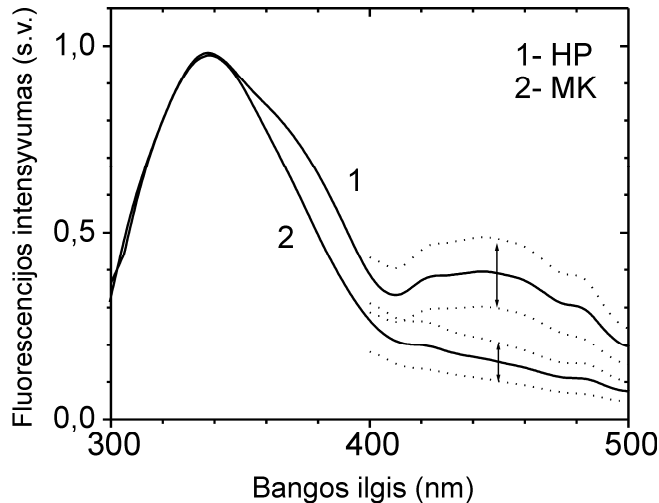
6.27 pav. Miokardo audinių fluorescencijos žadinimo spektrai registruojant fluorescenciją ties skirtingais bangų ilgiais (registruojant ties 330 nm fluorescencijos intensyvumas sumažintas 4 kartus)

6.4 lentelė. Miokardo endogeninių fluoroforų fluorescencijos ir jos žadinimo spektrų juostų bangų ilgiai

Fluorescencijos juosta	Fluorescencijos žadinimo spektro smailės, nm	Fluorescencijos spektro smailės, nm	Galimas fluoroforas
I	285	330	Triptofanas
II	285, 330	380	Kolagenas, piridoksinas
III	312, 380	445	Kinureninas
IV	–	530	Lipopigmentai, flavinai

Išmatavus širdies laidžiosios sistemos ir miokardo fiksuotų audinių fluorescencijos spektrus matyti, kad fluorescencijos juostų padėtys nuo žadinančios šviesos bangos ilgio nepriklauso, tačiau jai kintant keičiasi fluorescencijos juostų intensyvumų santykiai. Apibendrinant galima pasakyti, kad žadinant fluorescenciją Trp ir Tyr sugerties juostų ruožo šviesa (255 nm ir 280 nm), tiek širdies laidžiosios sistemos, tiek miokardo audinių fluorescencijos spektruose matoma intensyvi Trp fluorescencijos juosta su smaile ties 340 nm. Nors Trp fluorescencijos juostų padėtis ir plotis šiek tiek skiriasi, ji būdinga abiem audiniams ir negali padėti jų atskirti. Daug didesni spektriniai širdies audinių skirtumai

matomi 400–500 nm ruože. Čia laidžiosios sistemos fluorescencija yra akivaizdžiai intensyvesnė negu miokardo (6.28 pav.).



6.28 pav. Suvidurkinti (šešių mėginių) ir į smalių maksimumus sunormuoti Hiso pluošto ir miokardo fluorescencijos spektrai (žadavimo bangos ilgis 255 nm). Trūkios linijos nurodo paklaidas

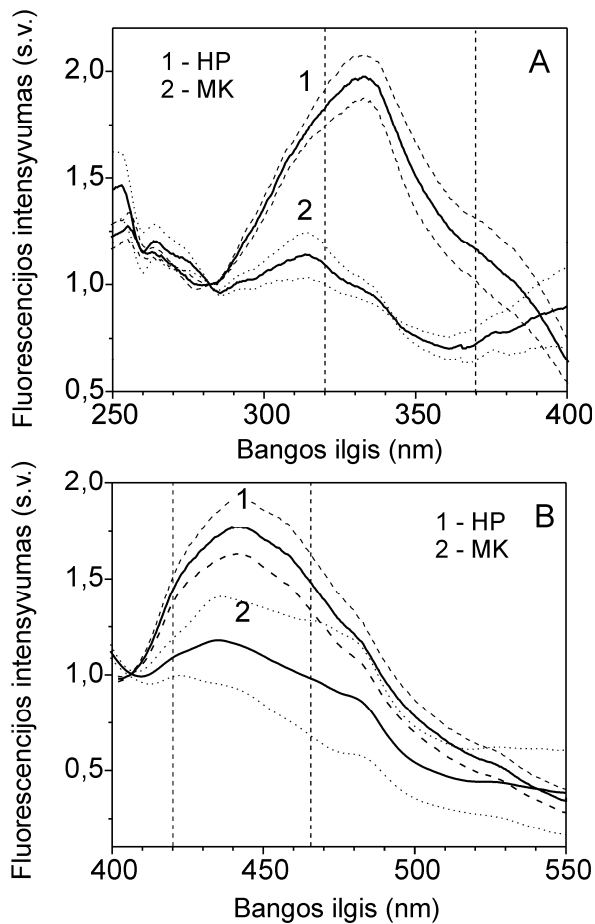
Ieškant būdų, kaip pagal spektrinius duomenis atskirti širdies laidžiąją sistemą nuo miokardo, išmatavus iš trijų skirtingų donorų organų paimtų mėginių fluorescencijos spektrus, buvo apskaičiuoti abiejų audinių fluorescencijos intensyvumų ties 340 nm ir 450 nm santykiai, žadinant skirtingų bangų ilgių šviesa (6.5 lentelė). Skirtingų audinių fluorescencijos juostų intensyvumų santykiai nevienodi ir priklauso nuo $\lambda_{\text{žad}}$. Širdies laidžiosios sistemos šis santykis kinta nuo 1,8 iki 2,8, o miokardo – nuo 3,3 iki 8,6. Žadinant fluorescenciją 280 nm ir 295 nm bangų ilgių šviesa, širdies laidžiosios sistemos ir miokardo audinių fluorescencijos intensyvumų santykiai skiriasi daugiau nei du kartus. Taigi pagal šiuos santykius galima gana patikimai atskirti širdies laidžiosios sistemos audinį nuo miokardo. Deja, dėl žalingo žadinančios UV šviesos poveikio toks metodas nėra tinkamas taikyti *in vivo*.

6.5 lentelė. Skirtingų audinių Trp fluorescencijos juostos ir fluorescencijos juostos ties 450 nm intensyvumų santykiai

Žadinimo bangos ilgis, nm	Kasos audinys	Širdies laidžioji sistema	Miokardas
255	1,37	1,82	4,55
	2,23	1,85	3,27
	3,11	1,79	4,81
280	1,89	2,86	7,69
	2,45	2,78	7,55
	3,53	2,72	8,58
295	2,03	2,73	8,33
	5,19	2,68	8,31
	2,36	2,81	7,14

Kadangi širdies audinių savitosios fluorescencijos spektrų juostos yra plačios ir siekia 500 nm ir ilgesnes bangas (6.28 pav.), audinių mėginių fluorescencija buvo žadinama ilgesnių bangų spinduliuote, kurios nesugeria aromatinės aminorūgštys, ieškant tokių žadinimo bangos ilgių, kurie būtų tinkami selektyviam audinių fluorescencijos žadinimui.

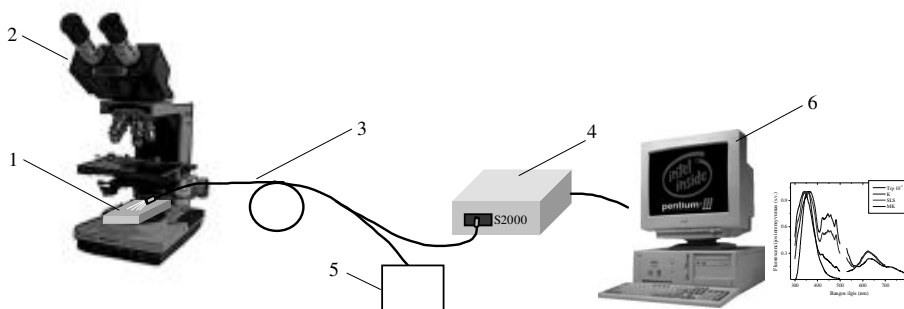
Lyginant suvidurkintus šešių mėginių laidžiosios sistemos ir miokardo audinių fluorescencijos žadinimo spektrus matyti, kad didžiausias laidžiosios sistemos ir miokardo audinių fluorescencijos intensyvumų skirtumas yra spektro ruože nuo 320 nm iki 370 nm, kai spektrai matuojami ties 450 nm (6.29 pav., A). Žadinant fluorescenciją ties 360 nm, didžiausias širdies laidžiosios sistemos ir miokardo savitosios fluorescencijos intensyvumų skirtumas matomas nuo 420 nm iki 465 nm (6.29 pav., B).



6.29 pav. Suvidurkinti (šešių mėginių) Hiso pluošto ir miokardo fluorescencijos žadinimo ($\lambda_{em}=450$ nm) (A) spektrai, sunormuoti į 282 nm, ir fluorescencijos spektrai ($\lambda_{ex}=360$ nm) (B), sunormuoti į 406 nm. Trūkios linijos nurodo paklaidas

Širdies audinių fluorescencinis vaizdinimas. Kadangi fluorescencinės spektroskopijos matavimai buvo gana vaisingi, tolesni širdies audinių tyrimai buvo atliekami naudojant fluorescencinę mikroskopišką diagnostikos sistemą. Ji padėjo vaizdinti širdies laidžiąją sistemą miokardo audinio fone. Ši sistema galėtų būti fluorescencinės diagnostinės sistemos, kuria kardiochirurgas galėtų širdies paviršiuje arba pjūvyje nustatyti širdies laidžiosios sistemos padėtį, prototipu.

Audinių mikrofluorescenciniai tyrimai *ex vivo* buvo atlikti 6.30 paveiksle pavaizduotu matavimo stendu. Bandiniai buvo 2–3 cm dydžio iš širdies skilvelio paviršiaus paimti miokardo audinio gabaliukai su Hiso pluošto šakomis. Bandinys buvo tvirtinamas ant mikroskopo mikromanipulatoriaus, kuriuo *x* ir *y* plokštumoje galima keisti jo padėtį bifurkacinio šviesolaidžio, per kurį ateina bandinį žadinanti šviesa ir surenkama fluorescencija nuo riboto bandinio paviršiaus, atžvilgiu. Bandinys skenuojamas ir kiekviename skenavimo taške išmatuojamas bandinio fluorescencijos spektras, kurį išanalizavus galima nustatyti, ar šiame taške yra širdies laidžioji sistema ar miokardas. Gauti fluorescencijos rezultatai tapatinami su mikroskopu matomu (2) bandinio vaizdu. Hiso pluošto šakų padėtis nustatoma mikroskopu. Žadinimo šaltinio (5) spinduliuotė viena bifurkacinio šviesolaidžio (3) šaka nukreipiama į bandinį (1). Antrąją šviesolaidžio šaką surinkta bandinio savitosios fluorescencijos spinduliuotė perduodama į spektrometrą (4). Keičiant mikroskopo stalielį su bandiniu padėti žadinamos įvairios to bandinio paviršiaus vietos ir registruojama jų fluorescencija. Bifurkaciniu šviesolaidžiu



6.30 pav. Mikrofluorescencinių tyrimų stendo schema

galima lokaliai žadinti ir surinkti fluorescencijos spinduliuotę. Kai šviesolaidžio skersmuo 100 μm , gali būti identifikuojami maži bandinio paviršiaus ploteliai ir tai leidžia išskirti Hiso pluošto šakas, kurių matmenys 1–2 mm. Išsklaidyta žadinanti šviesa atskiriama filtru. Matavimo rezultatai apdorojami personaliniu kompiuteriu (6), naudojant “Ocean Optics” programą OOIBase32™.

Spektrai, matuoti pastumiant mikroskopo stalių 100 μm intervalais statmena Hiso pluošto šakai kryptimi, pateikiami 6.31 B paveiksle. Matyti, kad Hiso pluošto šakos fluorescencijos intensyvumas yra daugiau kaip du kartus didesnis negu miokardo (6.31 pav., C). Šie rezultatai rodo, kad tokio eksperimento sąlygomis galima gana kontrastingai vaizdinti širdies laidžiąją sistemą naudojantis tik audinių savitąja fluorescencija (6.31 pav., A).

Apibendrinus anksčiau gautus širdies laidžiosios sistemos ir miokardo fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrų matavimo rezultatus, buvo atlikti pirmieji laidžiosios sistemos vaizdinimo mikroskopiniuose bandiniuose eksperimentai. Tyrimams buvo paruošti bandiniai, kuriuose morfologiškai nustatyta tiksli Hiso pluošto šakų padėtis (6.31 pav.). Su fluorescenciniu mikroskopu sujungta CCD kamera buvo fiksuojami vaizdai regimosios šviesos ruože, apšviečiant bandinį UV spinduliuote. Iš spektrinių fluorescencijos matavimų matyti, kad širdies skilvelio paviršiuje esančių Hiso pluošto šakų ir miokardo fluorescencijos spektrai yra skirtingi ir regimosios šviesos ruože, tad buvo galima mėginti vaizdinti Hiso pluošto šakas bandiniuose.

Ultravioletinė spinduliuotė (360 nm) sužadina širdies raumens fibrozės (kolageno sancaupų) ir koaguliacinės nekrozės (dėl deguonies stokos suirusio raumens) židinių savitąją fluorescenciją (6.32 A ir B pav.). Paveiksle (6.32 A) matomas jungiamojo audinio (kolageno) pluoštas miokarde. Kolagenas yra siūlinis baltymas, svarbiausias jungiamojo audinio komponentas, sudarantis kolageno skaidulas. Paveiksle (6.32 B) išryškėja miokardo infarktas (raumens nekrozė). Širdies raumens infarkto židinių savitosios fluorescencijos savybės naudojamos ankstyvo miokardo infarkto diagnostikai, nes tai vienas iš jautriausių metodų, padedantis aptikti širdies raumens ūminės koaguliacinės nekrozės židinius anksčiau, nei išsivysto histologiniai pokyčiai.

Skirtinga savitąja fluorescencija pasižymi ir širdies struktūros, kuriose gausu kolageno ir elastino skaidulų, pavyzdžiui, endokardas, išklojantis širdies ertmių vidinius paviršius (6.32 pav., C). Širdies raumenyje matomos glikogeno sancaupos parodytos 6.32 D paveiksle. Glikogenas yra svarbiausias atsarginis polisacharidas, sudarytas iš gliukozės

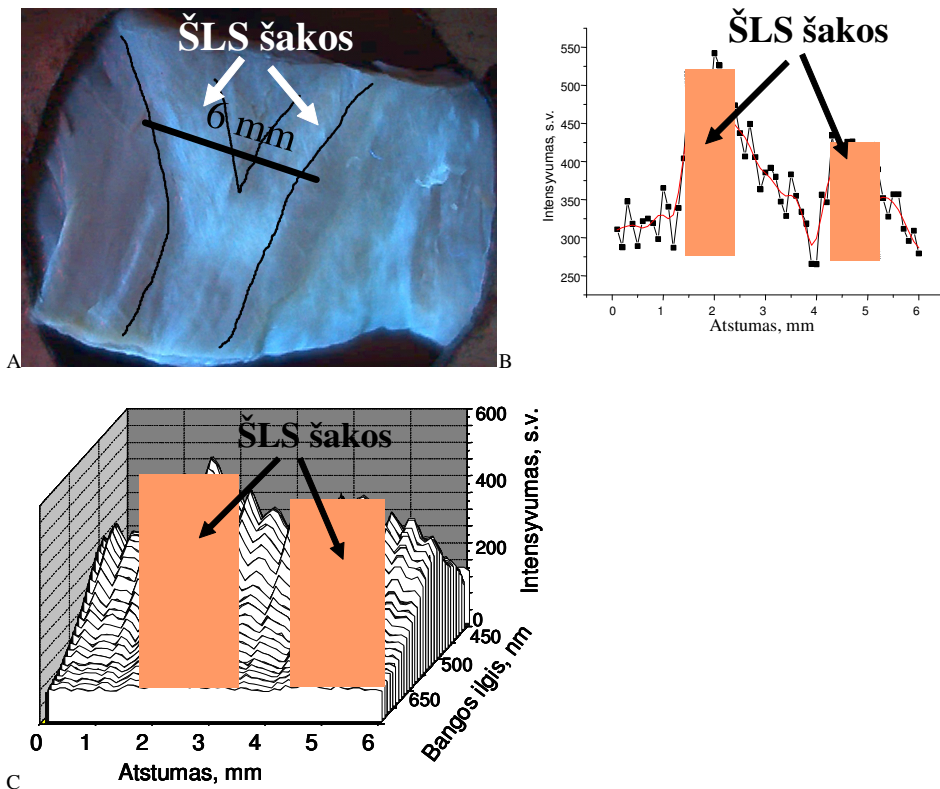
molekulių, susijungusių į šakotas grandines. Skylant glikogenui atsipalaiduoja energija ir ji naudojama širdies raumens darbui.

Iš kairiojo širdies skilvelio paviršiaus paimtuose bandiniuose po endokardu išryškėja širdies laidžiosios sistemos Hiso pluošto kairė šaka (6.32 pav., E ir F). Pirmieji vaizdinimo rezultatai parodė, kad fluorescencinių spektrų skirtumai gali būti naudojami širdies laidžiajai sistemai vaizdinti. Bendrame miokardo audinio švytėjime matoma skirtinga širdies laidžiosios sistemos Hiso pluošto šakų fluorescencija, lemianti kitą vaizdo atspalvį.

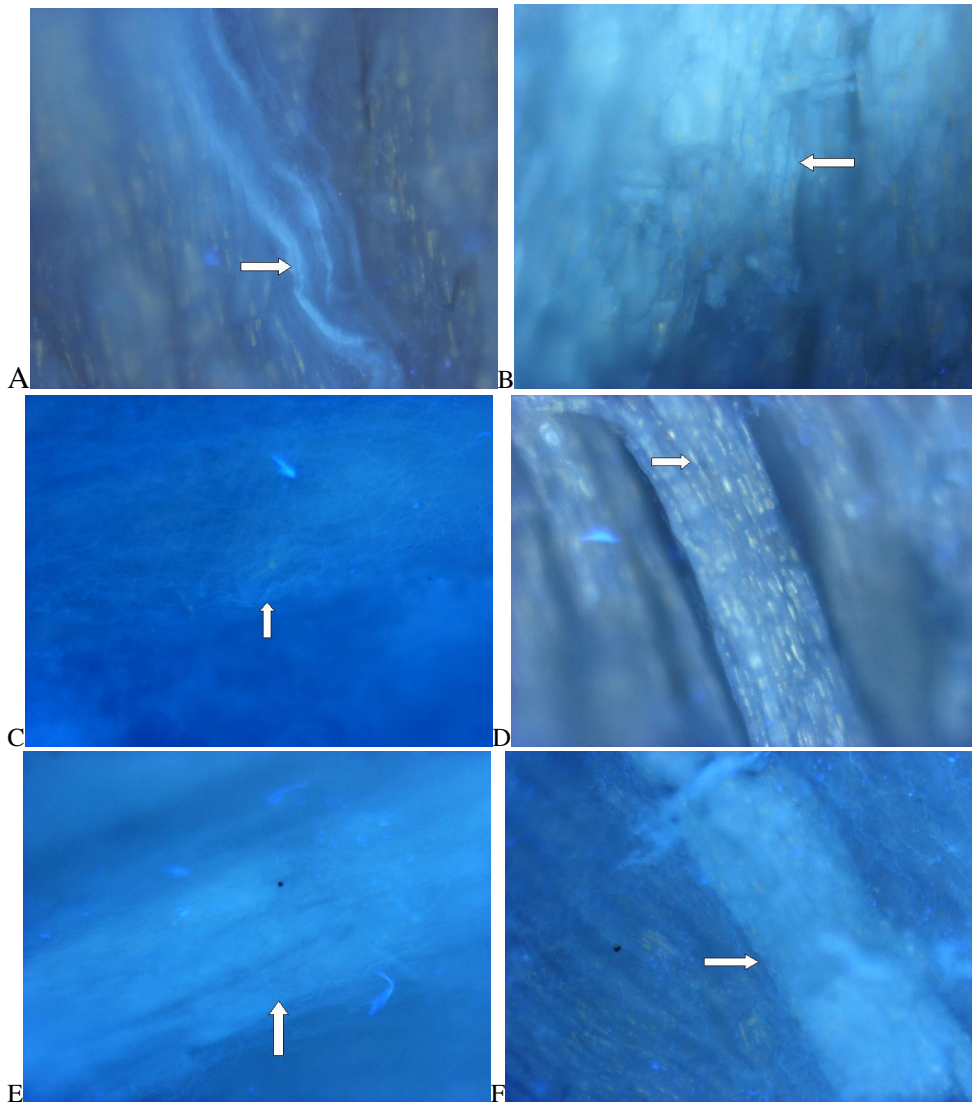
Buvo mėginama atskirti Hiso pluošto šakų ir aplinkinio endokardo audinius. Pirmiausia nufotografuoti iš tarpkilvelinės pertvaros paimti mėginiai, apšviesti 366 nm bangos ilgio šviesa. Spektroskopiniams tyrimams buvo parinkti tie mėginiai, kurių fluorescencinėse nuotraukose Hiso pluošto šakos išryškėjo geriausiai.

Išmatavus Hiso pluošto šakų ir endokardo audinio spektrus matyti, kad, žadinant 366 nm šviesa, Hiso pluošto šakos švyti gerokai intensyviau. Atliekant tolesnius tyrimus buvo matuojamas įvairių mėginio paviršiaus taškų fluorescencijos intensyvumas. Paveiksle (6.33) pateikta bandinio, kuriame gana aiškiai matoma Hiso pluošto šakos gija, nuotrauka ir jo fluorescencijos spektrai. Kadangi Hiso pluoštas nėra vienalytis, buvo tirtos išsišakojusios pluoštų dalys. Paveiksle (6.34) pateikta kitų Hiso pluošto šakų fragmentų nuotrauka. Joje nematyti tokios aiškios ribos tarp Hiso pluošto ir aplinkinio endokardo, tačiau intensyviau švytinčios šakos vis dėlto išsiskiria.

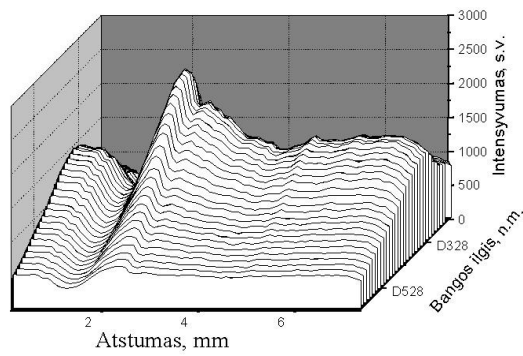
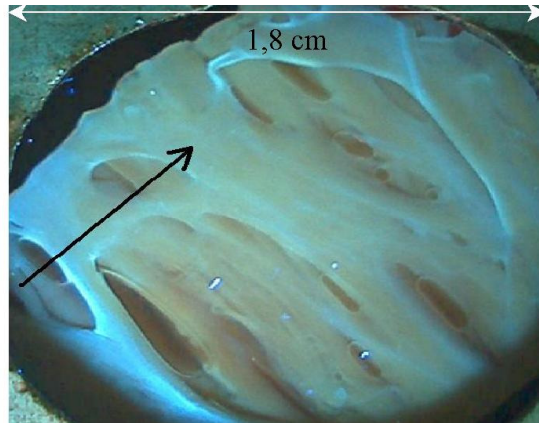
Naudojantis gautų spektrinių matavimų rezultatais, buvo padarytos širdies preparatų nuotraukos dienos šviesoje ir apšvietus 365 nm bangos ilgio šviesa (6.35 pav.). Jose matyti, kad naudojant tinkamo bangos ilgio apšvietimą, galima išryškinti širdies laidžiosios sistemos atskirų šakų padėtį širdies audinyje. Tai galėtų padėti chirurgams operuojant apsaugoti širdies laidžiąją sistemą nuo pažeidimų.



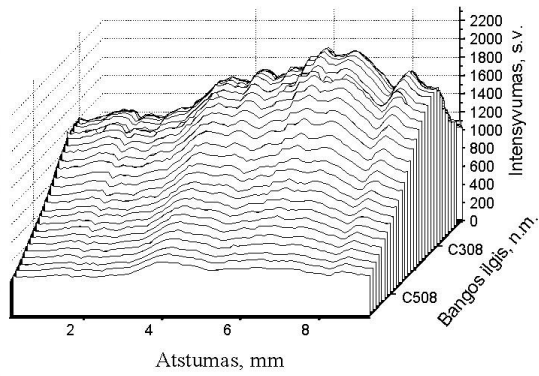
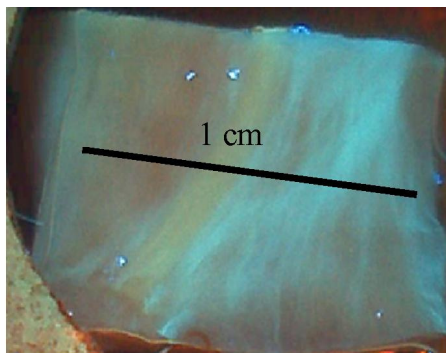
6.31 pav. Širdies laidžiosios sistemos fluorescencinių tyrimų rezultatai: A. Hiso pluošto šakų fragmentai; B. Hiso pluošto šakų fluorescencijos spektrai; C. Fluorescencijos intensyvumų pasiskirstymas audinio apviršiuje



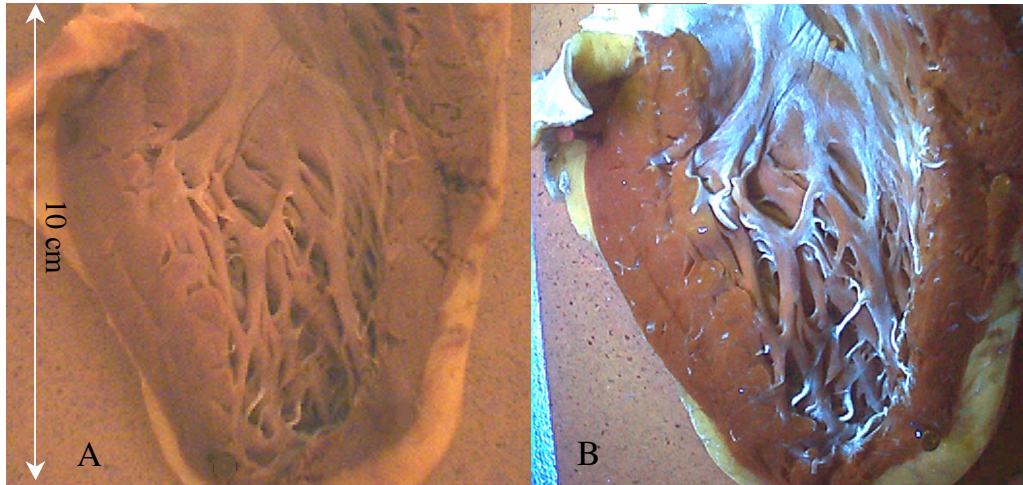
6.32 pav. Širdies audinių vaizdinimas: A. Fibrozės židynys širdies raumenyje; B. Širdies raumens nekrozės plotas (infarktas); C. Endokarde švytinčios kolageno skaidulos; D. Miokarde fluorescuojančios glikogeno sankaupos; E. Fluorescuojantis širdies laidžiosios sistemos pluoštas; F. Fluorescuojantis Hiso pluošto kairės šakos fragmentas



6.33 pav. Kairiosios Hiso pluošto šakos fragmentas, apšvietus 366 nm bangos ilgio spinduliuote, ir jo fluorescencijos spektrai



6.34 pav. Hiso pluošto šakos fragmentas ir jo fluorescencijos spektrai



6.35 pav. Širdies skilvelinė pertvara ir joje matoma kairė laidžiosios sistemos pluošto kojytė. Vaizdas dienos šviesoje (A) ir apšvietus 365 nm bangos ilgio šviesa (B)