

1. ŠVIESA IR BIOLOGINIS OBJEKTAS

1.1. Biomedicininė fotonika

Šviesos vaidmuo medicinoje buvo labai svarbus per visą žmonijos istoriją. Dar tais laikais, kai žmonės mažai žinojo apie šviesos prigimtį ir garbino ją kaip mitologinę esybę ar laikė antgamtiniu reiškiniu, šviesai būdavo priskiriamos ir gydomosios savybės. Herodotas kalbėjo apie stiprinantį saulės spindulių poveikį kaulams. Jis laikomas helioterapijos tėvu. Teigiamą saulės spinduliuotės įtaką gydant įvairias ligas skelbė ir Hipokratas.

Šviesos indėlis į mediciną neatsiejamas nuo mokslo ir technologijų vystymosi. XVII a. danų mokslininkų sukurtas mikroskopas du šimtus metų buvo vienas iš svarbiausių biologijos ir biomedicinos tyrimų vystymo prietaisų. Ląstelių teorija sukurta 1830 m., kai vokiečių mokslininkai M. J. Schleidenas ir T. Schwannas per mikroskopą pastebėjo ląstelių egzistavimą, identifیکavo jas ir padarė išvadą, kad jos yra esminis augalų ir gyvūnų struktūros vienetas ir jose vyksta organizmų metabolizmo procesai. Mikroskopas tapo pagrindiniu stebėjimo prietaisu, tad jo atradimas pradėjo naują mokslinių tyrimų erą. Pasinaudodami mikroskopu, R. Kochas ir L. Pasteuras XIX a. aštuntajame dešimtmetyje sukūrė naujas ligų atsiradimo teorijas ir padėjo pagrindus bakterijų sukeltų ligų gydymui. Baigiantis XIX a., vokiečių fizikas W. Roentgenas atrado naujus už šviesą trumpesnius elektromagnetinius spindulius, kurie vėliau buvo pritaikyti medicinos diagnostikai ir tapo vienu iš pačių svarbiausių žmogaus organizmo vidinės struktūros pažeidimų nustatymo ir ligų stebėjimo priemonių. Šie įvairių mokslo sričių tyrinėjimai ir atradimai sukūrė neinvazinės diagnostinės technologijos – optinės biopsijos ištakas. Jos atsiradimas atvėrė naujus medicinos, molekulių tyrimų, audinių analizės ir ligų diagnostikos horizontus taikant elektromagnetinę spinduliuotę, kurios dalis yra ir šviesa.

Šviesos prigimtis. Šviesos prigimtės problemos žmoniją domino labai seniai. Antikinės Graikijos mąstytojai Aristotelis, Platonas ir Euklidas pirmieji suformulavo pagrindinius šviesos sklaidimo ir atspindžio dėsnius, tačiau net iki XIX a. pradžios buvo manoma, kad šviesa yra šviesos šaltinio skleidžiamas dalelių srautas, kuris, patekęs į akį, stimuliuoja regėjimą. Šią idėją ypač rėmė I. Newtonas. Jis XVII a. antrojoje pusėje išplėtojo korpuskulinės šviesos prigimtės teorijos sampratą ir ją remdamasis aiškino šviesos atspindžio ir lūžio reiškinius. Newtono amžininkas olandų mokslininkas Ch. Huygensas manė, kad šviesa – tai bangos, plintančios nuo šviesos šaltinio į aplinką. Jis 1670 m. padėjo pagrindus banginės šviesos prigimtės sampratai, tačiau nesukūrė

nuoseklios teorijos, kuri būtų galėjusi konkuruoti su I. Newtono korpuskuline teorija. Maždaug tuo pačiu metu (1665 m.) F. Grimaldis eksperimentiškai pagrindė difrakcijos ir interferencijos reiškinius, tačiau daugelis mokslininkų, veikiami didžiulio I. Newtono autoriteto, dar maždaug šimtmetį laikėsi korpuskulinės teorijos, nepripažindami banginės šviesos prigimties.

Tik vėlesni XIX a. pradžios T. Youngo ir A.J. Fresnelio darbai tiriant šviesos interferencijos reiškinį argumentuotai pagrindė banginę šviesos prigimtį ir ši teorija tapo lygiavertė korpuskulinės šviesos prigimties teorijai. Visi tuo metu žinomi optiniai reiškiniai imti aiškinti pagal banginę šviesos teoriją. Šviesa buvo suprantama kaip skersinė banga, sklindanti skaidria aplinka – eteriu. Eterio idėja padėjo paaiškinti daugelį žinomų optinių reiškinių, tačiau sukėlė ir naujų problemų, kurias išsprendė J. C. Maxwello 1865 m. paskelbta elektromagnetinio lauko teorija.

Remdamasis M. Faradėjaus atradimais, J.C. Maxwellas padarė išvadą, kad šviesa – tai ne skaidria aplinka sklindančios skersinės bangos, o didelio dažnio elektromagnetinės bangos. Jis apskaičiavo, kad tų bangų greitis turėtų būti 3×10^8 m/s. J. C. Maxwello teorija teigia, kad šviesa gali būti aprašyta kaip skersinės elektromagnetinės bangos, išreiškiamos dviem tarpusavyje statmenais vektoriais: osciliuojančiu elektrinio lauko stipriu ir osciliuojančiu magnetinio lauko stipriu. Abu jie yra statmeni bangos vektoriui, kuris sutampa su bangos sklidimo kryptimi. Dažniausiai elektromagnetinėms bangoms aprašyti vartojamas tik elektrinio lauko stiprio vektorius, mat šviesos sąveika su medžiaga, jos cheminis ir biologinis poveikis iš esmės priklauso tik nuo elektromagnetinės bangos elektrinio lauko dėmens.

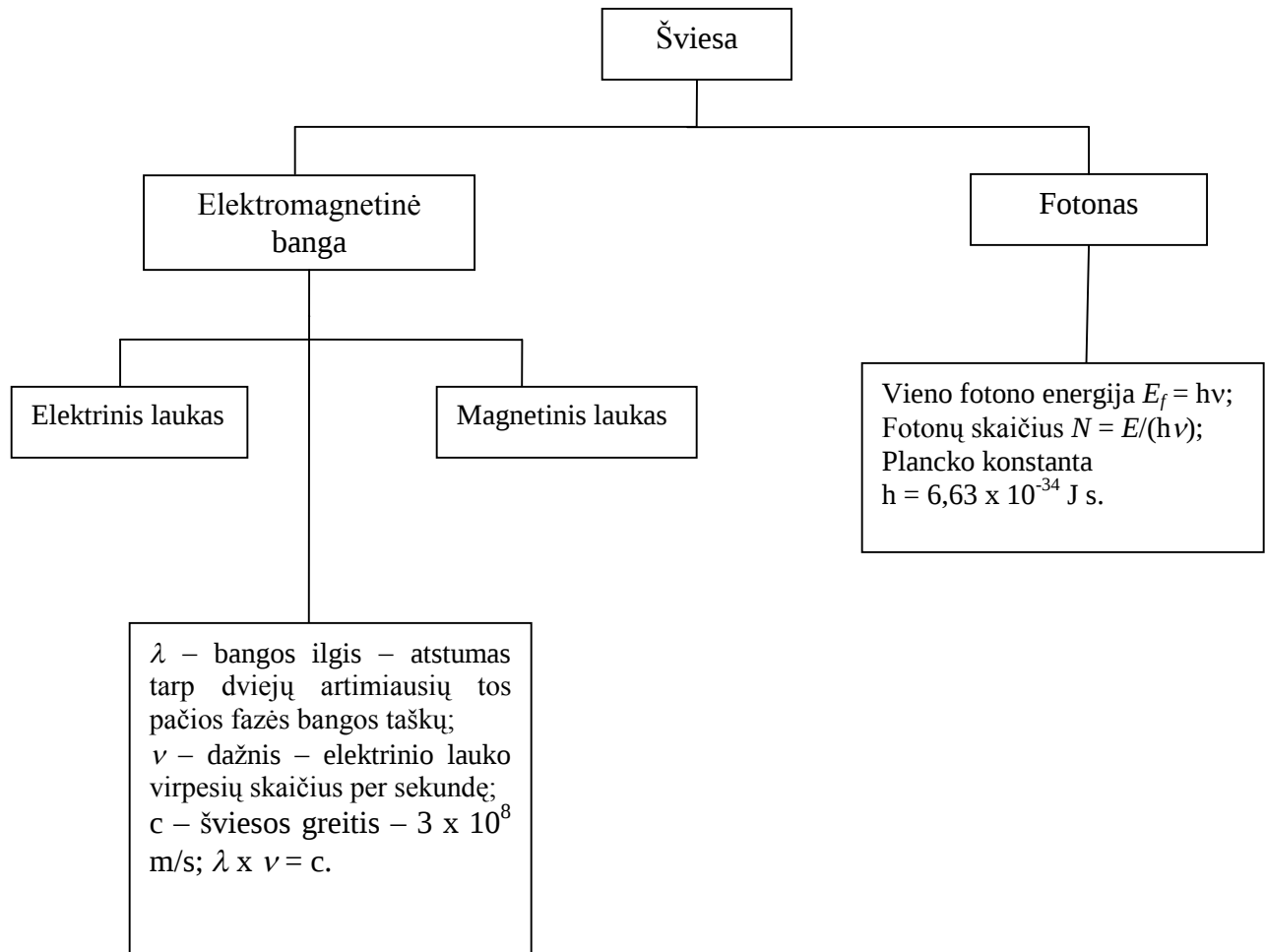
Vėlesni kitų mokslininkų tyrimai pademonstravo, kad elektromagnetinėms bangoms būdingi atspindžio, lūžio ir kiti optiniai reiškiniai. Tačiau elektrodinaminė teorija, pagrindusi šviesos kaip elektromagnetinės bangos sampratą, vis dėlto nesugebėjo paaiškinti šviesos sugerties ir emisijos dėsningumų. Tik XX a. pradžioje M. Planckas, nagrinėdamas absoliučiai juodo kūno spinduliavimą, priėjo išvadą, kad šviesa sugerama ir išspinduliuojama kvantais – tam tikromis porcijomis, kurios proporcingos šviesos dažniui. A. Einšteinas šviesos kvantams suteikė impulsą ir masę, šviesai grąžindamas korpuskulinės prigimties įvaizdį. Šie atradimai padėjo suprasti anksčiau nepaaiškinamus šviesos reiškinius, ir XX a. korpuskulinė ir banginė šviesos prigimtis buvo sujungta į vientisą teoriją, pagrįstą kvantine mechanika ir kvantine elektrodinamika. Tad šiandien šviesa aprašoma remiantis kvantinės dalelės – fotono, pasižyminčio banginėmis savybėmis, samprata.

Fotono energijos išraiška (1.1) sujungia abi šviesos prigimtis:

$$E = h\nu = hc/\lambda. \quad (1.1)$$

Kiekvieno fotono energija (E), išreikšta džauliais (J), yra tiesiog proporcinga spinduliuotės dažniui (ν) (t. y. atvirkščiai proporcinga bangos ilgiui λ). Proporcingumo konstantos: h – Plancko konstanta ($6,63 \times 10^{-34}$ J s) ir c – šviesos greitis vakuume (3×10^8 m/s).

Dvilypę šviesos prigimtį apibūdinantys parametrai pateikiami 1.1 paveiksle.

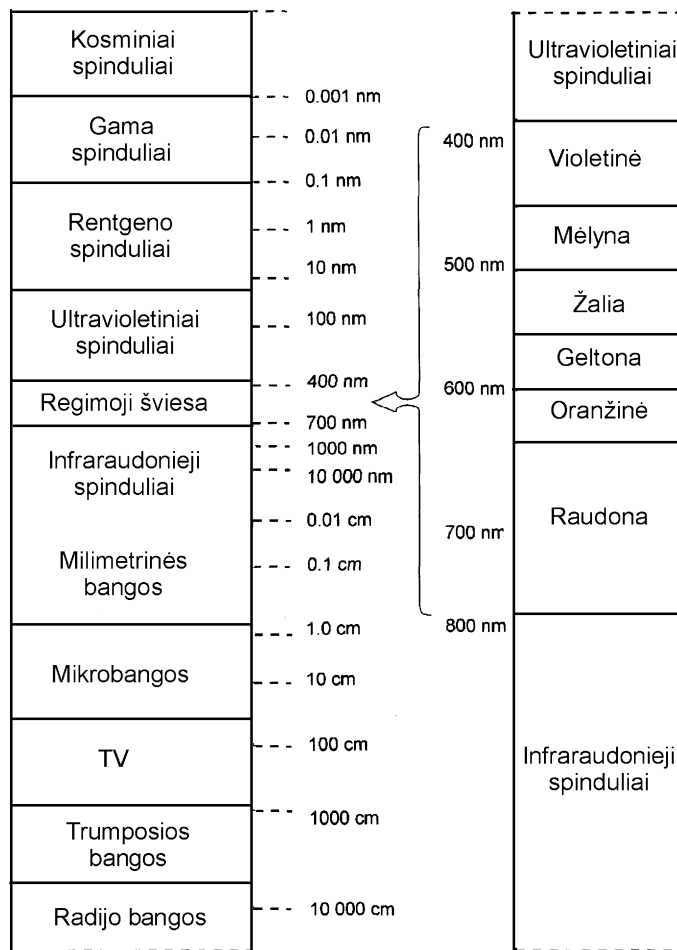


1.1 pav. Dvejoją šviesos prigimtį atspindintys parametrai

Optinės biopsijos, platesne prasme – biomedicininės fotonikos, ribos vis dar nėra iki galo apibrėžtos ne tik dėl to, kad tai dar gana nauja mokslo ir medicinos sritis, bet ir todėl, kad ji susikūrė per mokslų sandūrą. Jos formavimąsi ir tobulėjimą nuolat stimuliuoja nauji fizikos, molekulinės biologijos ir prietaisų inžinerijos išradimai.

Biomedicininė fotonika apima ne tik „optinę“, kitaip tariant, regimąją, elektromagnetinės spinduliuotės dalį, kuriai jautri žmogaus akis, bet ir žmogui neregimus elektromagnetinių bangų spektro sričių spindulius.

Elektromagnetinių bangų spektras. Elektromagnetinės spinduliuotės visų bangos ilgių visuma, apimanti sritį nuo radijo bangų iki γ spindulių, vadinama elektromagnetinių bangų spektru (1.2 pav.). Pagal bangų ilgius spektras skirstomas į ruožus. Ruožas nuo tolimosios infraraudonosios (IR) srities iki tolimosios ultravioletinės (UV) srities vadinamas optinių bangų diapazonu. Regimoji šviesa apima tik nedidelę elektromagnetinių bangų spektro dalį – nuo 400 nm iki 700 nm.



Elektromagnetinių bangų spektras

1.2 pav. Elektromagnetinių bangų spektras

Artimojo UV ruožui priskiriama sritis nuo 300 nm iki 400 nm, o artimajam IR ruožui – nuo 760 nm iki 1400 nm. Regimosios šviesos spektras skirstomas į spalvas pagal bangų ilgius (1.2 pav.).

Optinė biopsija. Biomedicininė fotonika gali būti apibrėžta kaip mokslo ir technologijų sritis, nagrinėjanti visą elektromagnetinių bangų spektrą ir jų sąveiką su biologiniu objektu. Ši sritis jungia mokslo kryptis, kurios tiria ne tik įvairius šviesos fotonų ir jų sąveikos su biologiniu objektu aspektus, bet taip pat apima optines ir ne tik optines technologijas, susijusias su elektromagnetinių bangų fotono sąvoka. Tai gali būti didelės energijos kosminiai, gama ar rentgeno spinduliai ir mažos energijos šiluminis arba mikrobangis spinduliavimas. Biomedicininės fotonikos sąvoka apima fotonų sugertį, emisiją, medžiagų pralaidumą fotonams, sklaidą ir šviesos stiprinimą. Jai priklauso medžiagos ir fotono sąveikos tyrimo metodai ir technologijos, tokios kaip lazeriai ir kiti šviesos šaltiniai, šviesolaidžiai, elektrooptiniai prietaisai, sudėtingos mikromechaninės ir mikroskopinės sistemos ir, žinoma, nanosistemos, kurios dar tik pradeda skintis keliai į įvairiausias žmonių veiklos sferas. Suprantama, kad šios mokslo ir technologijų sritys yra labai plačios ir biomedicininė fotonika apima jose tik tą dalį, kuri susijusi su ligų diagnozavimu, gydymu ir profilaktika. Optinė biopsija yra dar siauresnė sritis, susijusi su tiesioginiu šviesos fotonų panaudojimu medicininei diagnostikai. Tiesa, reikėtų pažymėti, kad nėra griežtos ribos tarp atskirų elektromagnetinės spinduliuotės spektrinių ruožų. Netgi žmonių akys mato skirtingai. Regimosios šviesos srities skirtingų bangos ilgių šviesą žmogaus akis mato kaip skirtingų spalvų šviesą labai individualiai, intervalais nuo 20 nm iki 160 nm. Taigi spalvos yra ne šviesos savybė, o subjektyvus fiziologinis ir psichologinis individo atsakas į šviesą. Vienų akys mato tolesnėje infraraudonoje spektro srityje spinduliuojančius fotonus, kitų žmonių akies jautrumas šiai spektro sričiai yra mažesnis. Optinė biopsija siejama ir su tomis elektromagnetinio spektro sritimis, kurios yra už regimosios šviesos ruožo ribų, t. y. jai priskiriama dalis ultravioletinės ir artimosios infraraudonosios spektro srities.

Svarbiausias optinės biopsijos uždavinys yra suteikti stebėtojai informaciją apie biologinį objektą, konkrečiau kalbant, ligos ar kitų pažeidimų sukeltus žmogaus audinių ir ląstelių pokyčius. Kita vertus, pati šviesa neturi veikti audinio ir sukelti kokių nors pokyčių, galinčių modifikuoti tiriamo biologinio objekto savybes. Didelės energijos šviesos fotonai gali sukelti pokyčius organizme, todėl optinei biopsijai yra naudojami tik tokie fotonai, kurių energija nesukelia pokyčių audinyje.

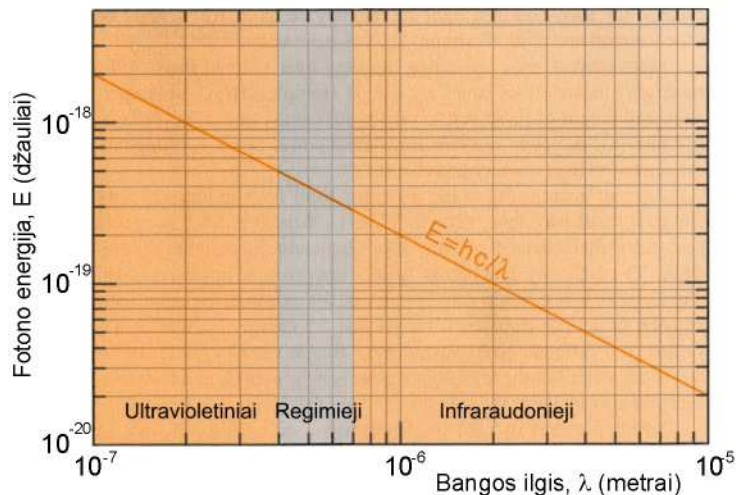
Fotono energija. Kaip matyti iš 1.1 pav. ir (1.1) formulės, šviesos fotono energija yra lygi apibrėžtam dydžiui $h\nu$. Taigi elektromagnetinės bangos energija yra kvantuota, o mažiausia bangos energija lygi fotono energijai. Visa į tiriamą objektą krįtančios šviesos energija E yra lygi $N h\nu$, o N yra fotonų skaičius:

$$E = N h\nu \quad (1.2)$$

arba

$$N = E/(h\nu).$$

Kuo trumpesnės bangos, tuo daugiau energijos turi fotonas. „Mėlyni“ fotonai turi daugiau energijos nei „raudoni“ (1.3 pav.). Kai elektromagnetinės spinduliuotės srautas sąveikauja su medžiaga, poveikį lemia fotono energija. Pavyzdžiui, rentgeno spinduliai gali išplėšti elektronus iš vidinių atomo orbitalių, o regimojo ir infraraudonojo ruožo spinduliai gali paveikti tik daug silpniau su branduoliu sujungtus molekulių išorinių orbitalių valentinius elektronus arba tik pakeisti molekulės virpesinę ar sukininę būseną. Nutraukus švitinimą visos mažos energijos fotonų paveiktos molekulės grįžta į įprastą būseną, ir nesuardomi nei tarpmolekuliniai ryšiai, nei apšvitinto audinio struktūra. Taigi optinei biopsijai naudojamų šviesos fotonų energija turi būti tokia, kuri nepažeistų audinių sudarančių molekulių.

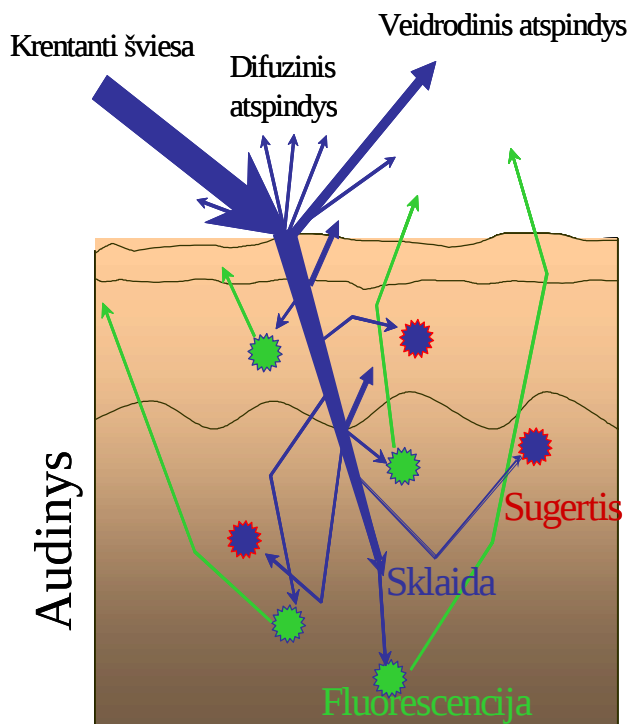


1.3 pav. Fotono energijos priklausomybė nuo bangos ilgio

Tačiau ir nedidelės energijos šviesos fotonai, jei jų yra gana daug, gali sukelti audinio pažaidas. Jeigu į nedidelį plotą sukoncentruojamas didelis, nors ir nedidelės energijos regimosios

šviesos fotonų srautas, kaip šitai galima padaryti galingais lazeriais, nesunkiai galima pažeisti ne tik audinį sudarančias ląsteles, bet suardyti ir labai kietas medžiagas. Lazeriais atliekamos ne tik chirurginės operacijos, bet ir suvirinami metalai, daroma daug įvairių operacijų apdorojant labai atsparias ir tvirtas medžiagas.

Informaciją apie žmogaus audinius ir ląstelių struktūrą arba dėl ligos ar kito pažeidimo atsiradusius jų pokyčius galima gauti nagrinėjant šviesos sąveiką su biologiniu audiniu. Žmogaus organizmas sudarytas iš daugelio molekulių, kurios, susijungusios į atitinkamus darinius, sudaro ląsteles; šios atitinkamai yra organizuotos į struktūras, iš kurių formuojasi audiniai. Sąveikaudamos su tokiu sudėtingu dariniu keičiasi šviesos savybės. Nagrinėjant dėl sąveikos kilusius šviesos savybių pokyčius galima gauti išsamią informaciją apie organizmą sudarančių molekulių, sudėtingų subląstelinių darinių, ląstelių sandarą ir struktūrą, o atsiradus pažeidai ar organizmą paveikus ligai, diagnozuoti ligą ar net prognozuoti ir sekti ligos eigą.



1.4 pav. Šviesos sąveikos su audiniu schema

Šviesos sąveika su biologiniu objektu nėra paprastas reiškinys, jį galima suskaidyti į kelis sąveikos metu pasireiškiančius vyksmus, kurių kiekvienas gali suteikti specifinės informacijos apie audinio struktūrą, jį sudarančias molekules ir vykstančius pokyčius. Į biologinį objektą krintanti šviesa gali atsispindėti nuo audinio paviršiaus, sklaidyti audiniu, būti sugerta audinio molekulių arba išsklaidyta audinyje, nes jis yra nehomogeniškas, būti sugerta fluoroforų ir išspinduliuota fluorescencijos pavidalu (1.4 pav.).

1.2. Šviesos sklaidymas biologiniu audiniu

Optinė biopsija, įgalinanti charakterizuoti audinius ir diagnozuoti jų pokyčius, pagrįsta šviesos sąveika su biologiniais audiniais. Šviesos sklaidymas audiniu kaip ir kiekviena neskaidria aplinka sukelia keturis fotofizikinius vyksmus: atspindį, lūžį, sklaidą ir sugertį. Šie vyksmai yra glaudžiai susiję tarpusavyje ir aprašomi Fresnelio, Lamberto–Bugero ir Beero bei kitais dėsniais. Šiuos reiškinius lemia tai, kad elektromagnetinės bangos, taigi ir šviesos, sklaidymas tam tikra aplinka priklauso nuo aplinkos lūžio rodiklio $n(\lambda)$, kuris savo ruožtu yra bangos ilgio funkcija. Vakuume šviesos sklaidymo greitis $c = 3 \times 10^8$ m/s, tačiau dėl sąveikos su medžiaga jos greitis mažėja ir šį sumažėjimą parodo medžiagos lūžio rodiklis $n(\lambda)$, kuris yra šviesos greičio vakuume santykis su šviesos greičiu atitinkamoje terpėje.

Homogeninėje terpėje lūžio rodiklis atspindi tiesines šviesos sąveikos su medžiaga savybes. Bendra lūžio rodiklio išraiška yra išreiškiama kompleksiniu dydžiu:

$$\tilde{n}(\lambda) = n(\lambda) - i\alpha(\lambda), \quad (1.3)$$

čia menamoji lūžio rodiklio dalis $\alpha(\lambda)$ išreiškia šviesos sugertį (jeigu aplinka heterogeninė, tai šis narys taip pat išreiškia ir sklaidą heterogeninėje aplinkoje), o realioji dalis rodo šviesos greičio sumažėjimą sklindant šviesai tam tikra aplinka:

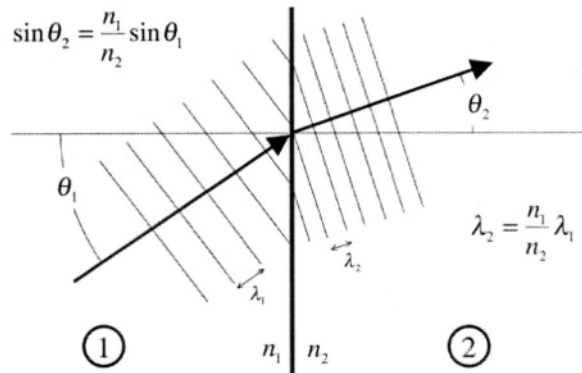
$$c_m(\lambda) = c/n(\lambda), \quad (1.4)$$

čia: $c = 3 \times 10^8$ m/s – šviesos greitis vakuume; $n_{\text{vaak.}} = 1$. Bangos ilgis aplinkoje gali būti išreiškiamas kaip

$$\lambda_m = \lambda/n(\lambda). \quad (1.5)$$

Taigi šviesos greitis aplinkoje ir joje sklindančios bangos ilgis priklauso nuo lūžio rodiklio ir bangos dažnis užrašomas taip:

$$v = c/\lambda = c_m/\lambda_m. \quad (1.6)$$



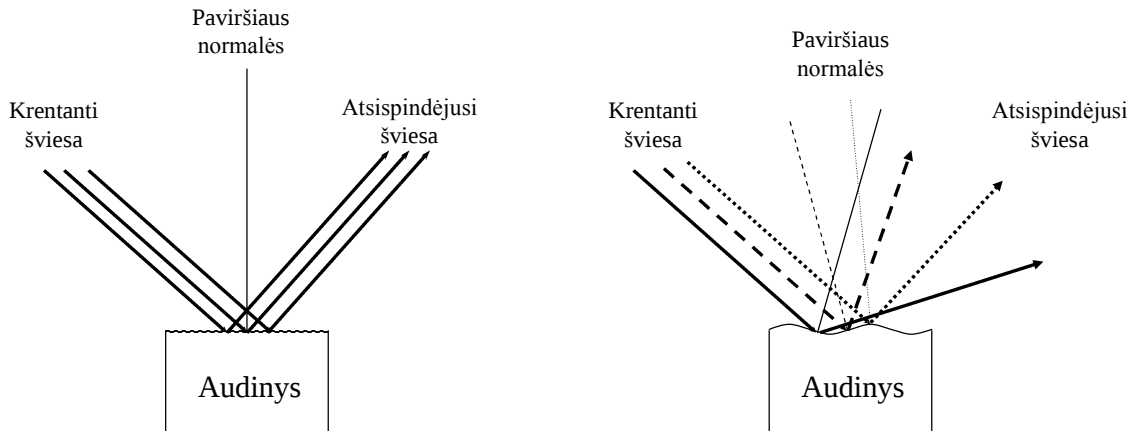
1.5 pav. Šviesos lūžio geometrija – į terpių ribą krintanti šviesa lūžta. Šviesos kritimo kampas žymimas θ_1 , lūžio kampas – θ_2 ; n_1 ir n_2 yra terpių lūžio rodikliai

Fotono energija, net ir sklindant šviesai tam tikra aplinka, išlieka tokia pati kaip ir vakuume, tačiau jo bangos ilgis priklauso nuo aplinkos, kurioje ši banga sklinda. Heterogeninėje aplinkoje šviesos sklidimas aprašomas dar sudėtingiau. Nesigilinant į matematinį aprašymą, galima konstatuoti, kad tokia heterogeniška terpė kaip biologinis audinys šviesos sklidimui daro labai didelę įtaką. Matuojant atitinkamus biologiniu audiniu sklindančios šviesos parametrus galima daug ką pasakyti apie audinio sandarą ir su liga susijusius pokyčius.

Kai šviesos banga, judėdama viena medžiaga, kurios lūžio rodiklis vienoks, pasiekia kitą medžiagą, kurios lūžio rodiklis skiriasi nuo pirmosios, keičiasi šviesos sklidimo kryptis ir dalis šviesos atspindima. Dviejų terpių riboje atspindėtos šviesos kiekis priklauso nuo medžiagų lūžio rodiklio ir šviesos kritimo kampo (pav.1.5).

Jeigu paviršius, į kurį krinta šviesa, yra glotnus, o jo nelygumai, palyginti su krintančios šviesos bangos ilgiu, maži, pagal paprastą atspindžio dėsnį krintantis ir atspindžio spinduliai bei atspindintis paviršius yra vienoje plokštumoje, o atspindžio kampas yra lygus kritimo kampui. Toks atspindys vadinamas veidrodiniu. Jeigu paviršiaus nelygumai yra palyginamo dydžio arba didesni nei krintančios šviesos bangos ilgis, sukeliamas difuzinis atspindys (1.6 pav.). Tada ne visi atspindimi spinduliai yra vienoje plokštumoje ir krintančios bei atspindėtos šviesos kampai nėra

lygūs. Difuzinis atspindys būdingas visiems biologiniams audiniams, nes jokie audiniai neturi ī veidrodžius panašaus glotnaus paviršiaus.



1.6 pav. Veidrodinis (kairėje) ir difuzinis (dešinėje) atspindys

Šviesa, pereidama iš vienos terpės į kitą, lūžta todėl, kad terpėse, kurių skirtingi lūžio rodikliai, yra skirtingas šviesos sklaidimo greitis ir šviesa, krisdama į terpių ribą, nukrypsta nuo savo pradinės sklaidimo krypties. Matematiškai šį reiškinį aprašo Snellijaus dėsnis:

$$\frac{\sin \theta}{\sin \theta'} = \frac{v}{v'}; \quad (1.7)$$

čia: θ' yra lūžio kampas, v ir v' – šviesos greitis atitinkamai terpėse iki atspindinčio paviršiaus ir už jo. Kadangi terpių lūžio rodikliai yra:

$$n = \frac{c}{v}, \quad (1.8)$$

$$n' = \frac{c}{v'},$$

kur c yra šviesos greitis vakuume, tai (1.7) formulė gali būti perrašyta taip:

$$n \sin \theta = n' \sin \theta'. \quad (1.9)$$

Šviesos sklaidimas audiniu kaip ir kiekviena neskaidria aplinka sukelia įvairius vyksmus. Daugiausia šviesos prasiskverbs į audinį, jei ji kris statmenai audinio paviršiui. Kadangi biologinis audinys yra labai sklaidanti terpė, labiausiai pastebimas reiškinys yra šviesos sklaida. Audinys

nepraleidžia šviesos dėl sudėtinės sklaidos nuo heterogeninių audinio komponentų: makromolekulių, ląstelių organelių, mažųjų vandens sankaujų. Audinio komponentų lūžio rodikliai yra skirtingi. Nors šie skirtumai nėra dideli, jie šiek tiek keičia šviesos sklaidimo audiniu kryptis, o pokyčių visuma šviesai sklindant audiniu sukelia pastebimus vyksmus.

Kai krintanti šviesa atspindi nuo audinio paviršiaus, sukeliamas veidrodinis atspindys, o kai šviesa audinio viduje yra atspindima nuo paviršiaus atgal į audinį – vidinis atspindys. Šviesą audinyje sugeria įvairios ląstelių ir tarpląstelinės terpės komponentus sudarančios molekulės, kurios sugertą šviesą gali išspinduliuoti fluorescencijos pavidalu.

Į biologinę terpę krintančios šviesos intensyvumas silpnėja, nes dalį jos sugeria terpė. Šviesos sugertis vyksta dėl to, kad dalis jos energijos virsta šiluma arba sugeriančios terpės molekulių virpesių energija. Taigi šviesos sugertis apibrėžiama sugertos ir krintančios šviesos intensyvumų santykiu.

Kiekvienos terpės geba sugerti elektromagnetinę spinduliuotę priklauso nuo įvairių veiksnių – nuo terpę sudarančių atomų ir molekulių elektroninės struktūros, nuo į terpę krintančios spinduliuotės bangų ilgio, sugeriančio sluoksnio storio ir nuo spinduliuotę sugeriančių medžiagų koncentracijos.

Jei chromoforų (šviesą sugeriančių junginių) žadinimui naudojama šviesa, kurią jie gerai sugeria, šviesos stiprio I eksponentinį silpnėjimą nusako Lamberto–Bugero ir Beero dėsnis, teigiantis, kad sugertos elektromagnetinės spinduliuotės stipris eksponentiškai priklauso nuo sugeriančių dalelių koncentracijos ir nuo šviesą sugeriančio sluoksnio storio:

$$I(\nu) = I_0 e^{-k(\nu)bc} = I_0(\nu) 10^{-\varepsilon(\nu)bc}. \quad (1.10)$$

Koeficientas $\varepsilon(\nu)$ vadinamas moliniu ekstinkcijos koeficientu [$l/(\text{mol cm})$]. Jis priklauso nuo medžiagos prigimties ir krintančios šviesos bangos ilgio. Dydis b [cm] yra optinio kelio ilgis (sluoksnio storis) – atstumas, kurį sugeriančioje terpėje nueina šviesa.

Formulę (1.10) pertvarę į dešimtainį logaritmą ir pažymėję santykį

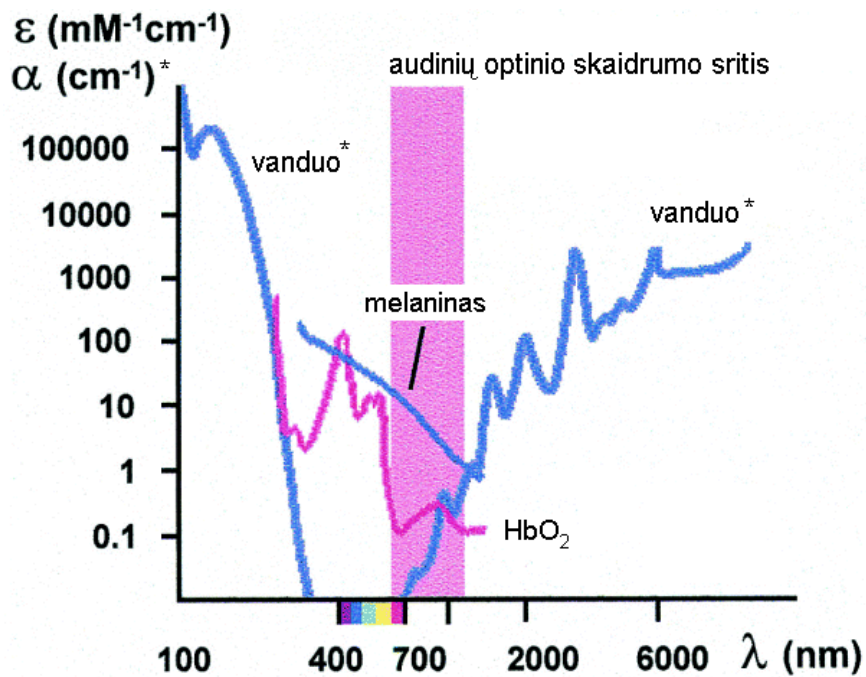
$$\lg I_0(\nu)/I(\nu) = A \text{ (optinis tankis),}$$

gauname paprastesnę išraišką:

$$A = \varepsilon(\nu) c b. \quad (1.11)$$

Tirpalo optinis tankis tiesiogiai proporcingas šviesą sugeriančių dalelių koncentracijai ir sugeriančio sluoksnio storiui. Tirpalo molinio ekstinkcijos koeficiento arba optinio tankio priklausomybė nuo bangos ilgio vadinama sugerties spektru.

Biologiniuose audiniuose šviesą sugeria vanduo ir makromolekulės, daugiausia baltymai ir įvairūs pigmentai. Vandens molekulės sugeria IR ruožo šviesą, o baltymai ir pigmentai – UV ir regimąją šviesą. Odos pigmento melanino sugertis didėja mažėjant bangos ilgiui. Kadangi hemoglobino sugertis smarkiai susilpnėja, kai bangos ilgis didesnis nei 550 nm šviesos skvarbumo į audinius gylis padvigubėja didėjant bangos ilgiui nuo 550 nm iki 630 nm. Ilgesnės šviesos bangos (iki 700 nm) išsiskverbia į audinius dar dukart giliau. Silpniausiai audinių komponentų sugeriama šviesos sritis yra nuo 650 nm iki 1300 nm, ji vadinama „audinių optinio skaidrumo langu“ (1.7 pav.).

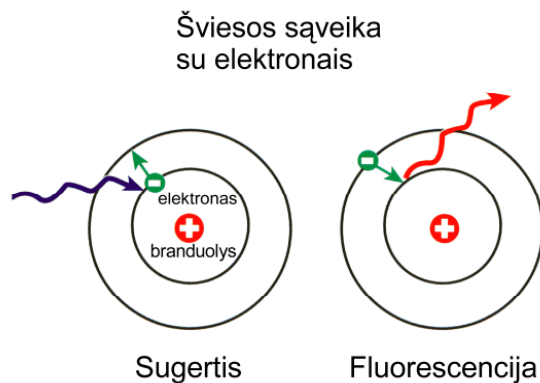


1.7 pav. Vandens, hemoglobino (HbO_2), ir melanino sugerties spektrai

1.3. Šviesos sugertis ir fluorescencija

Fotofizikiniai ir fotocheminiai vyksmai prasideda medžiagos molekulei susidūrus su fotonu. Jei molekulė sugeria šviesos fotoną, jos išorinėje orbitalėje esantis elektronas įgyja daugiau energijos ir peršoka į aukštesnį lygmenį (molekulė tampa sužadinta), iš kurio grįžta į pradinę būseną, įgytą energiją atiduodamas aplinkai arba išspinduliuodamas šviesos pavidalu (sukeliama liuminescencija – fluorescencija ar fosforescencija) (1.8

pav.). Išspinduliuotos šviesos savybės yra būdingos kiekvienos medžiagos molekulėms ir priklauso nuo jas supančios aplinkos.



1.8 pav. Fotono sąveika su vandenilio atomo elektronais

Elektronų šuoliai ir šviesos sugertis. Organinio junginio molekulę galima įsivaizduoti kaip santykinai lėtai judančių atomų branduolių ir labai greitai judančių elektronų rinkinį. Elektronas, kurio energija E_n , gali būti aptinkamas tam tikros erdvės, vadinamos orbitale, tam tikrame taške. Kitaip tariant, elektronai atomuose ir molekulėse gali egzistuoti būdami tam tikros energinės būsenos, dar vadinamos energijos lygmeniu. Remiantis kvantinės mechanikos dėsniais, elektrono energijos E vertės yra kvantuotos, t. y. jos gali būti tik tam tikrų reikšmių $E_0, E_1, E_2 \dots E_n$. E_0 yra vadinamas pagrindinės būsenos energijos lygmeniu, o $E_1, E_2 \dots E_n$ – sužadintųjų būsenų energijos lygmenimis. Kambario temperatūroje beveik visos molekulės yra pagrindinės būsenos.

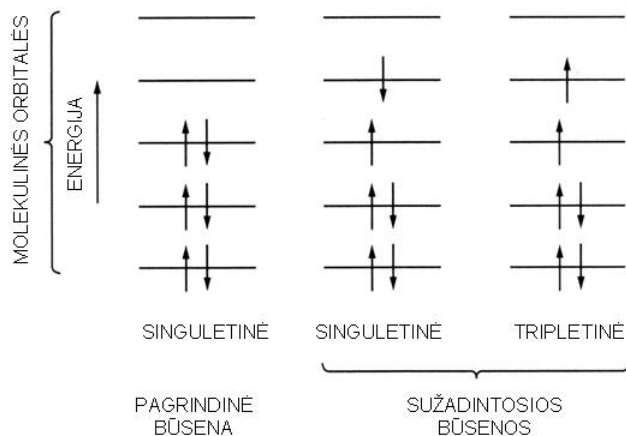
Optinės atomo ar molekulės savybės nulemia jų elektronų šuoliai iš pagrindinės būsenos į aukštesnes neužpildytas molekulės orbitales. Kad sąveikos metu įvyktų fotono sugertis, energinis skirtumas tarp aukščiausios užpildytos elektronais orbitalės ir aukštesnių elektronais neužpildytų orbitalių turi atitikti su molekule sąveikaujančio fotono energiją, t. y. molekulę sužadinti gali tik tas fotonas, kurio energija lygi šių molekulės elektroninių lygmenų energijų skirtumui:

$$E_{\text{fotono}} = h\nu = E_1 - E_0 = \Delta E; \quad (1.12)$$

čia h yra Plancko konstanta, ν – fotono dažnis, E_0 ir E_1 – molekulės nesužadintosios ir sužadintosios būsenų energijos. Sugerties vyksmo metu fotonas atiduoda savo energiją molekulei, ir ši tampa sužadinta.

Elektroninių būsenų multipletumas. Kiekvienam elektronui būdingas sukinio kvantinis skaičius, arba sukinys. Kvantinė teorija nurodo, kad laisvo elektrono sukinys (S) reliatyvaus išorinio magnetinio lauko atžvilgiu galėtų būti tik dviejų krypčių, atitinkamai žymimų $\uparrow$ ir $\downarrow$, kurių skaitinės vertės yra $+1/2$ ir $-1/2$. Pagal Pauli draudimo principą vieno energinio lygmens gali būti tik du skirtingų sukinų elektronai ($\uparrow\downarrow$), todėl pagrindinės būsenos suminis sukinys lygus nuliui. Molekulės magnetinis kvantinis skaičius M yra lygus $2S + 1$. Taigi pagrindinės būsenos molekulių M yra lygus vienetui, o tokia būsena vadinama singuletine.

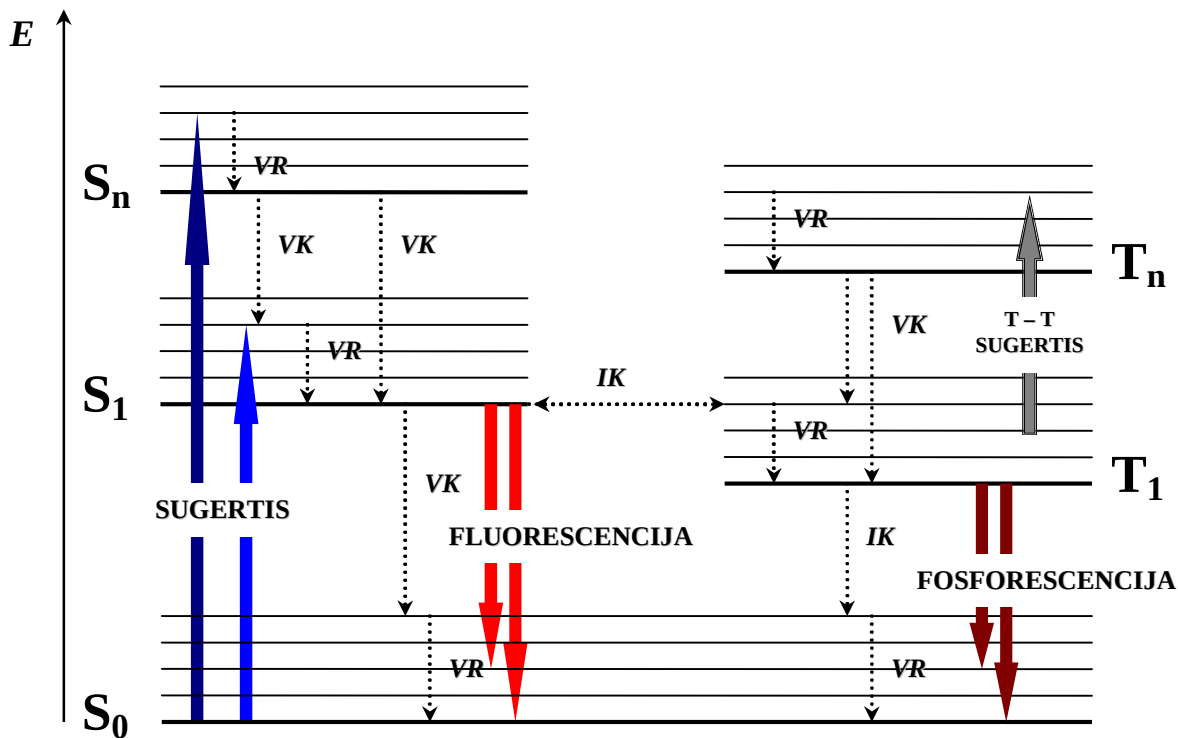
Sugėrusios šviesos fotoną (sužadintos) molekulės elektronas iš pagrindinės būsenos energijos lygmens E_0 peršoka į aukštesnę orbitalę. Sužadintosios būsenos molekulės elektronų sukiniai gali būti orientuoti ta pačia arba priešinga kryptimi. Pirmuoju atveju $S = 0$ ir $M = 1$ – susidaro sužadintoji singletinė būsena. Antruoju atveju $S = 1$ ir $M = 3$ – susidaro sužadintoji tripletinė būsena (1.9 pav.).



1.9 pav. Pagrindinės ir sužadintųjų singletinės ir tripletinės būsenų elektronų sukinų išsidėstymas

Paprastai daugiaatomių molekulių pagrindinės būsenos yra singuletinės. Išimtį sudaro kai kurios dviatomės molekulės (pavyzdžiui, deguonis O_2), kurių pagrindinė būsena yra tripletinė. Multipletumas yra svarbi sąvoka, nes nuo jo priklauso molekulių sužadintųjų būsenų aktyvumas.

Molekulių sužadinimas ir sužadinimo praradimo būdai (Jablonskio diagrama). Daugiaatomių molekulių elektronų šuoliai ir galimi spinduliniai ir nespinduliniai vyksmai paprastai aiškinami pasitelkiant lenkų mokslininko Jablonskio (1898–1980) pasiūlytą energijos lygmenų diagramą (1.10 pav.), kuri gerai padeda aiškinant fotofizikinių savybių sąsajas su optiniais spektrais.

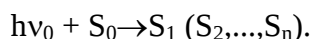


1.10 pav. Organinės molekulės energijos lygmenų Jablonskio diagrama. VR – virpesinė relaksacija, VK – vidinė konversija, IK – interkombinacinė konversija. S_0 ir S_n ($n \geq 1$) – molekulės pagrindinė singuletinė ir aukštesnės sužadintosios singuletinės būsenos, T – sužadintosios tripletinės būsenos

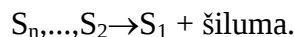
Kitaip nei ryškūs atomų elektronų lygmenys, molekulių energiniai lygmenys sudaryti iš gausybės vibracinių lygmenų, kurie dar turi rotacinius polygmenis. Energijos skirtumas tarp dviejų elektroninių lygmenų paprastai yra kelių eV eilės, tai atitinka 0,2–1 μm bangos ilgio šviesą. Vibracinių lygmenų energijos skirtumai yra 10^{-1} eV eilės (10 μm), o rotacinių – 10^{-3} eV (1 mm). 1.10 paveiksle pateiktoje Jablonskio diagramoje storos horizontalios linijos vaizduoja molekulės singuletinių (S) ir tripletinių (T) būsenų energinius lygmenis. Kiekvieno lygmens vibracinius lygmenis vaizduoja plonos horizontalios linijos. Tankūs susiliejęs rotaciniai lygmenys schemoje neparodyti.

Atomų elektroninių būsenų energijų skirtumai yra tiksliai apibrėžti, todėl jų sugerties spektrus sudaro siaurų linijų rinkinys. Molekules sudaro daugybė tam tikra tvarka išsidėsčiusių atomų, kurie gali judėti ir sukis vienas kito atžvilgiu, dėl to atsiranda virpesiniai ir rotaciniai elektroninių lygmenų polygmenys, ir molekulių sugerties spektras yra ne siaurų linijų rinkinys, o plačios juostos.

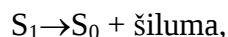
Kambario temperatūroje praktiškai visos molekulės yra pagrindinės (nesužadintosios) būsenos. Tokių molekulių energija mažiausia, visi elektronai išsidėstę energiška žemiausiuose lygmenyse, kurių aukščiausias yra S_0 lygmuo. Sužadinus molekulę elektronas iš šio lygmens peršoka į aukštesnį neužpildytą energinį lygmenį ($S_1, S_2, \dots, S_n$), kurio energija didesnė:



Taip molekulė yra sužadinama, tai yra ji turi energijos perteklių, kurį atitinkamu pavidalu turi perduoti aplinkai grįždama į pagrindinę būseną. Sužadintosios molekulės elektronas iš aukštesnių didesnės energijos lygmenų per labai trumpą laiką (10^{-13} s) nespinduliniu būdu peršoka į energiška žemiausio sužadintojo elektroninio lygmens nulinį virpesinį polygmenį atiduodamas aplinkai energiją šilumos pavidalu:

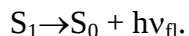


Nespindulinis sugerto fotono energijos praradimas šilumos pavidalu molekulei grįžtant į žemiausią sužadintąją elektroninę būseną S_1 arba į pagrindinę pusiausvirąją būseną S_0 :

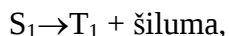


vadinamas vidine konversija (1.10 pav. VK).

Fluorescencijos metu sugerto fotono energija išspinduliuojama fluorescencijos fotono pavidalu (1.10 pav. FL):

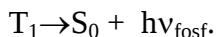


Iš žemiausio sužadintojo elektroninio energinio lygmens S_1 , kurio gyvavimo trukmė labai trumpa, sužadinimo energija taip pat gali būti prarandama elektronui peršokant į žemiausią tripletinę būseną (interkombinacinė konversija) (1.10 pav. IK). Vykstant interkombinacinei konversijai keičiasi molekulės multipletumas – vyksta šuolis iš singuletinės būsenos į tripletinę



iš kurios gali prasidėti pirminiai fotocheminiai vyksmai, nes ši molekulės sužadintoji būsena yra ilgai gyvuojanti, todėl sąveikaudama su aplinka molekulė gali atiduoti sužadinimo energiją aplinkos molekulėms arba inicijuoti fotocheminę reakciją.

Molekulei grįžtant iš tripletinės T_1 į pagrindinę S_0 būseną sukelia fosforescencija (1.10 pav. FS) – energija išspinduliuojama fosforescencijos fotono pavidalu:



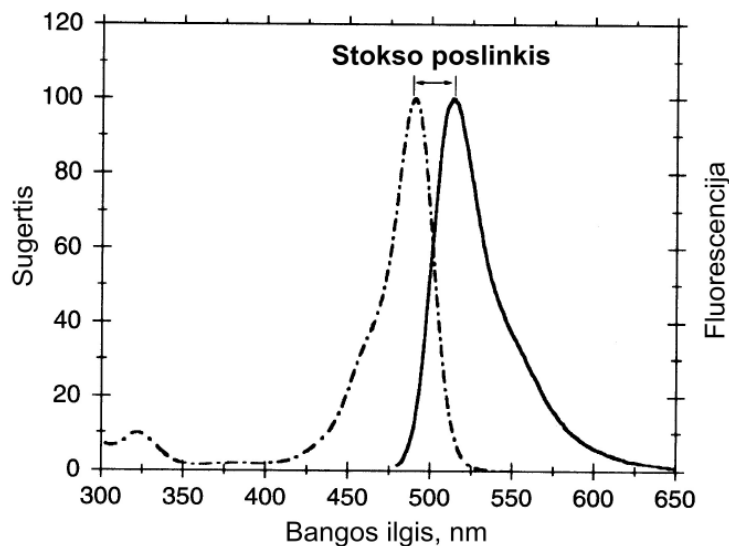
1.4. Fluorescencinė spektroskopija

1852 m. anglas D. G. Stoksas Kembridže atrado fluorescencijos reiškinių. Jis pastebėjo, kad UV šviesa apšvietus fluoritą, jis išspinduliuodavo ilgesnių bangų šviesą. Todėl fluorescencijos spektro poslinkis į ilgesniųjų bangų pusę sugerties spektro atžvilgiu pavadintas Stokso poslinkiu (1.11 pav.). Toks poslinkis atsiranda dėl to, kad sužadintai molekulei vidinės konversijos metu grįžtant į žemiausią S_1 lygmens virpesinį polygmenį, iš kurio vyksta fluorescencija, prarandama dalis energijos ir fluorescencijos pavidalu išspinduliuojama tik dalis sugertos energijos, o kita dalis šilumos pavidalu atiduodama aplinkai.

Šis atradimas nesulaukė ypatingo dėmesio iki XX a. pradžios, kai buvo pradėtos tirti potencialios fluorescencijos taikymo medicinos tikslams galimybės.

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

Fluorescencijos spektras gaunamas žadinant tiriamas molekules tokio bangos ilgio šviesa, kurią jos gerai sugeria. Fluorescencijos spektras matuojamas per visą emisijos intervalą žadinant vieno bangos ilgio šviesa. Taip pamatuotas spektras parodo



1.11 pav. Fluoresceino sugerties ir fluorescencijos spektras: (---) – sugertis; (—) – fluorescencija

fluorescencijos intensyvumo priklausomybę nuo matavimo bangos ilgio.

Informacijos gali suteikti ne tik fluorescencijos spektras, bet ir kiti svarbūs fluorescuojančių molekulių (fluoroforų) parametrai: fluorescencijos gyvavimo trukmė ir fluorescencijos kvantinis našumas.

Vidutinis laikas, kurį

gyvuoja sužadintosios būsenos molekulė, vadinamas fluorescencijos gyvavimo trukme τ ; ji priklauso nuo fluorescencijos gesimo būdo. Paprastas fluorescencijos gesimas yra eksponentinis vyksmas, kurio greičio konstanta k ir kuris nusako fluorescencijos intensyvumo I silpnėjimą $I = I_0 e^{-kt}$, kai I_0 yra pradinis fluorescencijos intensyvumas ($t = 0$).

Greičio konstanta yra dviejų konstantų suma: k_{sp} – spindulinio gesimo konstantos (gesimo trukmė τ_{sp}) ir k_{nesp} – nespindulinio gesimo konstantos (gesimo trukmė τ_{nesp}). Taigi

$$k = k_{sp} + k_{nsp} = 1/\tau_{sp} + 1/\tau_{nsp} = 1/\tau \quad (1.13)$$

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

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

Fluorescencijos kvantinis našumas yra per tą patį laiką išspinduliuotų N_f ir sugertų N_s fotonų santykis:

$$\varphi_{kv} = N_f/N_s. \quad (1.14)$$

Kai nevyksta jokie kiti nespindulinės relaksacijos vyksmai, fluorescencijos kvantinis našumas lygus 1. Tai yra sužadavimo energija išspinduliuojama tik fluorescencijos pavidalu. Toks yra idealios fluorescencijos atvejis. Taigi fluoroforai, kurie galėtų būti vartojami kaip fluorescenciniai žymenys, turėtų turėti vienetui artimą fluorescencijos kvantinį našumą. Nors daugelio endogeninių fluoroforų kvantinis našumas nėra didelis, fluorescencinė spektroskopija yra labai jautrus matavimo metodas. Be to, fluorescencijos kvantinis našumas yra geras parametras, padedantis įvertinti biologinės aplinkos įtaką fluoroforui. Naudojant tinkamą fluorescencinės spektroskopijos aparatūrą, pagal būdingus fluorescencijos spektrus įvairiose terpėse galima aptikti net ir labai mažos koncentracijos fluoroforų.

Sužadinta molekulė sugertus fotonus išspinduliuoja šviesos, kurios savybės yra specifinės tai molekulei ir priklauso nuo ją supančios aplinkos, pavidalu. Todėl fluorescencija dažnai vadinama molekulių „pirštų atspaudu“, o fluorescencinių matavimų rezultatai suteikia daug vertingos informacijos apie tiriamų objektų sudėtį ir struktūrą. Įvairiems klinikinės diagnostikos tikslams sukurtos specifiskai pritaikytos sistemos, kurios leidžia įvertinti įvairius fluorescencijos parametrus: fluorescencijos intensyvumą, spektrų formą ir fluorescencijos gyvavimo trukmę.

Fluorescenciją naudoti medicininei diagnostikai pradėta XX a. trečiajame dešimtmetyje, kai prancūzas A. Policardas Lione, atlikdamas eksperimentus su žiurkėmis, kurioms buvo įskiepyta sarkoma, pastebėjo raudoną navikų fluorescenciją apšvietus juos ultravioletine šviesa. Jis teisingai priskyrė ją navike susikaupusiam endogeniniam porfirinui (Policard, 1924). 1942 m. paskelbti duomenys apie egzogeninio hematoporfirino kaupimąsi eksperimentinių gyvūnų navikuose ir jo raudoną

fluorescenciją (Auler ir Banzer, 1942; Figge, 1942). Tai buvo pirmosios optinės biopsijos – iš audinių optinių savybių nustatytos ligos pažeistos vietos.

1.5. Kiekybinis biologinių audinių optinių parametrų įvertinimas

Ultravioletinės spektrinės srities šviesa biologiniuose audiniuose sužadina mėlynos ir žalios spalvos fluorescenciją. Tai ir yra audinių savitoji fluorescencija (autofluorescencija), o jos pobūdis priklauso nuo audinio endogeninių fluoroforų. Taigi audinio savitosios fluorescencijos spektro formą nulemia jo sudėtyje esančių fluorescuojančių molekulių visuma.

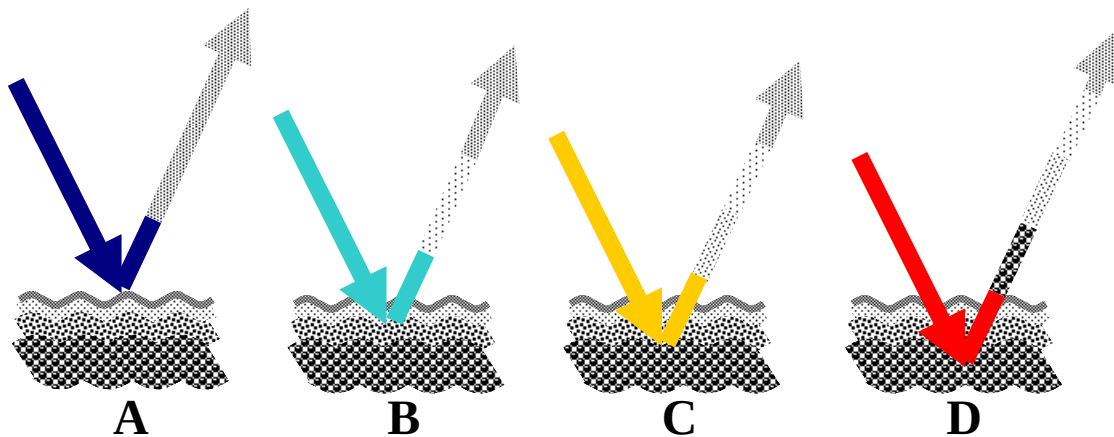
Audinių fluoroforų tyrimams buvo dėta daug pastangų. Daugelis jų buvo aptikti taikant įvairius spektroskopinius metodus, pavyzdžiui, tokius kaip žadinimo–fluorescencijos matricos ir fluorescencijos su laikine skyra spektroskopija. Fluorescencinė mikroskopija ir mikrospektrofluorimetrija taip pat buvo taikomos audinių fluoroforų paieškai. Ištirtos daugelio audinyje esančių molekulių tirpalų fluorescencinės savybės, tačiau natūralaus biologinio audinio fluorescencijos signalą tiksliai interpretuoti yra sudėtinga dėl jo kompleksiško ir spektrų priklausomybės nuo *in vivo* mikroaplinkos bei biomolekulių tarpusavio sąveikos.

Be fluoroforų – molekulių, kurios sugertą šviesą išspinduliuoja fluorescencijos pavidalu, audinių sudėtyje yra ir molekulių, kurios šviesą tik sugeria, bet nespinduliuoja fluorescencijos, arba kurios tik sklaido šviesą. Atliekant audinių spektroskopinę diagnostiką būtina žinoti, kad krintanti šviesa gali įvairiai sąveikauti su audiniu:

- 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.

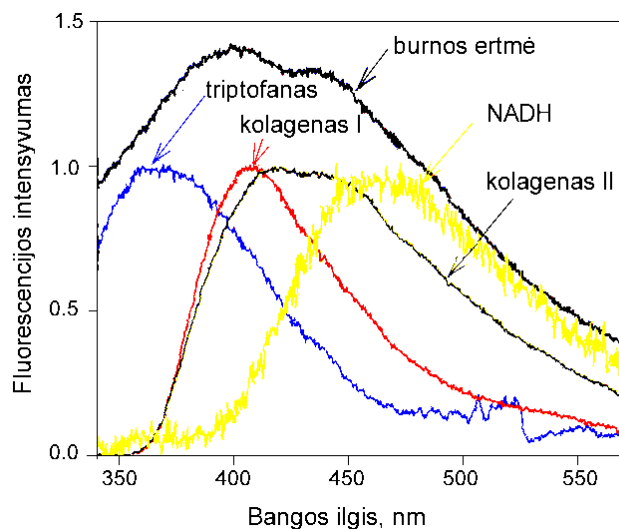
Sužadintos audinių savitosios fluorescencijos šviesa taip pat yra sklaidoma audinio komponentų, dalį jos gali sugerti kiti chromoforai, kita dalis išspinduliuojama nuo audinio paviršiaus. Tad visada privalu prisiminti, kad audinio paviršiuje matuojamos fluorescencijos signalas nebus gryna fluoroforo fluorescencija, spektre atsispindės ir

šviesą tik sugeriančių ar tik sklaidančių dalelių indėlis. Be to, fluoroforai yra netolygiai pasiskirstę audinio paviršiuje, taip pat ir nevienodame gylyje. Todėl nuo audinio paviršiaus pamatuotas fluorescencijos spektras bus kiek kitoks negu iš gilesnių sluoksnių. Įvairių gylių sluoksnių fluorescencijos spektrai gali būti skirtingi, o matuojant juos audinio paviršiuje gaunamas įvairių sluoksnių fluorescencijų mišinys. Santykinis įvairių gylių fluorescencijos spektrų indėlis į realiai nuo audinio paviršiaus pamatuotą spektrą priklauso ne tik nuo audinio fluorescencinių savybių, bet ir nuo fluorescenciją žadinančios bangos ilgio, nes skirtingų bangos ilgių šviesa įsiskverbia į audinį skirtingu gyliu (1.12 pav.), tad audinio paviršiuje matuojama fluorescencija, priklausomai nuo žadinančios bangos ilgio, atspindės skirtingo gylio sluoksnių fluorescencijų derinius.



1.12 pav. Skirtingų bangos ilgių šviesa įsiskverbia į audinį skirtingu gyliu

Audinius sudaro sudėtingas įvairiausių molekulių mišinys, tačiau už audinių savitąją fluorescenciją atsakingi keli fluoroforai, kurių svarbiausieji yra baltymų sudėtyje esančios aminorūgštys (triptofanas, tirozinas ir fenilalaninas), fibriliniai baltymai kolagenas ir elastinas, redukuotas nikotinamidadenindinukleotidas NADH ir jo fosfatas (NADPH), flavinai ir flavoproteinai, lipopigmentai, β -karotinas ir porfirinai. Todėl audinių savitosios fluorescencijos spektrų juostos yra plačios ir dengia viena kitą, o viso spektro forma yra neišraiškinga palyginus su atskirų fluoroforų spektrais (1.13 pav.).



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

Fluoroforai turi jiems būdingus:

- sugerties koeficientą, nurodantį tikimybę sugerti šviesos fotoną šviesos kelio ilgio vienetą;
- sklaidos koeficientą, nusakantį fotono sklaidos šviesos kelio ilgio vienetą tikimybę;
- fluorescencijos kvantinį našumą, priklausantį nuo žadinimo ir emisijos bangų ilgių ir nurodantį fluoroforo išspinduliuotos fluorescencijos energijos ties emisijos bangos ilgiu santykį su fluoroforo sugerta žadinimo bangos ilgio šviesos energija.

Kai kurių svarbiausių fluoroforų pagrindinės žadinimo ir fluorescencijos bangų ilgių smailės pateiktos 1.1 lentelėje. Triptofano (Trp), kurio daugiausia yra mitochondrijų baltymuose, fluorescencija vyrauja spektruose, kai žadinimo bangos ilgis yra trumpesnis nei 300 nm. Esant ilgesnių bangų žadinimo šviesai, Trp įtaka savitosios fluorescencijos spektrams mažėja. Kolagenas ir elastinas susiję su struktūriniu tarpląsteline audinio medžiaga. Žadinant azoto lazerio spinduliuote (337 nm), audinio fluorescencijos spektro formą nulemia kolagenas ir elastinas, o žadinant ties 365 nm, spektruose vyrauja NADH fluorescencija.

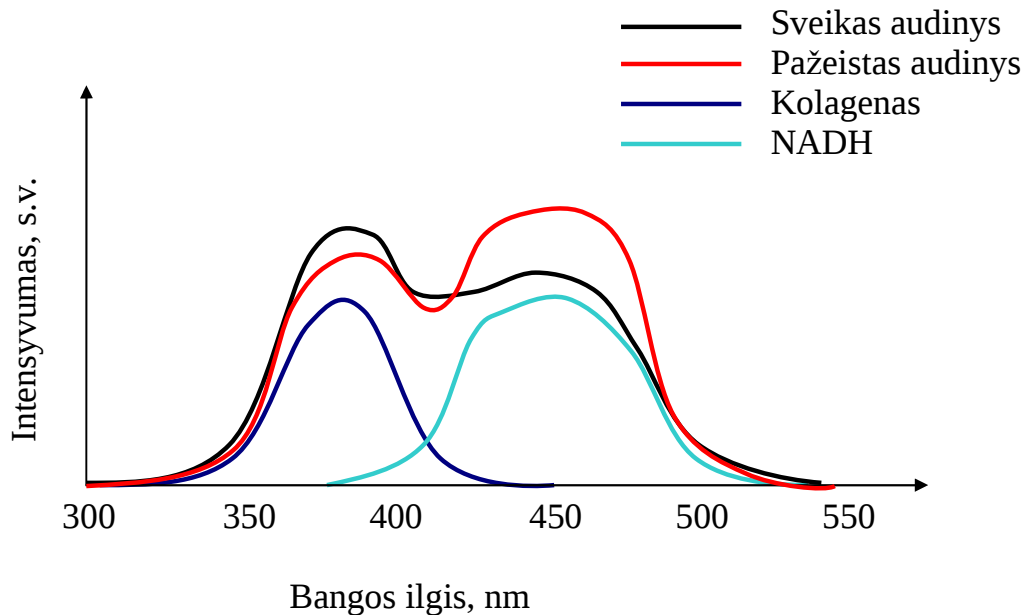
1.1 lentelė. Biologinių audinių endogeniniai fluoroforai

Fluoroforas	Žadinimo bangos ilgis (nm)	Fluorescencijos bangos ilgis (nm)
Triptofanas	275	350
Kolagenas	340	395
	270	395
	285	310
Elastinas	460	520
	360	410
	425	490
	260	410
NADH	350	460
Flavinas	450	520
β-karotinas		520
Porfirinai	400	610; 675

Nors audinių savitosios fluorescencijos spektrai nėra išraiškingi ir juos gana sunku interpretuoti, tačiau jais remiantis gana dažnai galima apibūdinti biologinės sistemos fiziologinę būseną, aptikti, kaip ji atitinka normalią būseną, nustatyti mikroskopinius audinių piktybinius pakitimus, t. y. atlikti optinę biopsiją nepakenkiant aplinkiniams audiniams. Optiniai diagnostiniai metodai grįsti tuo, kad ligos pažeistų audinių spektrai skiriasi nuo sveikų audinių spektrų. Norint tinkamiau panaudoti savitąją fluorescenciją grįstos diagnostikos galimybes ir geriau suprasti jos ribotumus, būtina žinoti patologijos sukeltų fluorescencijos pokyčių biochemines ir morfologines ištakas, o tam reikia nustatyti sveikų ir pažeistų audinių fluorescencijos signalų šaltinius.

Kol kas dar gana menkai suprata audinio biochemijos ir jo fluorescencijos sąsaja. Navikų ar kitokių pažaidų audiniuose sukelti biocheminiai ir morfologiniai pokyčiai keičia audinių spektrines savybes, tačiau tų pokyčių priežastys nėra iki galo suprastos. Kadangi ne visada žinomos spektre atsispindinčios audinio savybės, neįmanoma iki galo įvertinti spektrų teikiamos diagnostinės informacijos. Epitelio sluoksnio sustorėjimas, kuris yra būdingas, pavyzdžiui, displazijos pažeistiems gimdos kaklelio audiniams, gali paaiškinti, kodėl sumažėja kolageno fluorescencijos įnašas į audinio savitosios fluorescencijos spektrą. Taip pat egzistuoja hipotezė, kad ligos pažeistame audinyje yra suaktyvėjusi medžiagų apykaita, dėl to padidėja redukuotų elektronų nešiklių NADH ir FADH₂ koncentracija ir sumažėja oksiduotų elektronų nešiklių NAD ir FAD

koncentracija. Dėl to ligos pažeistų audinių savitosios fluorescencijos spektre padidėja NADH ir FADH₂ fluorescencijos intensyvumas, palyginti su sveikais audiniais (1.14 pav.).

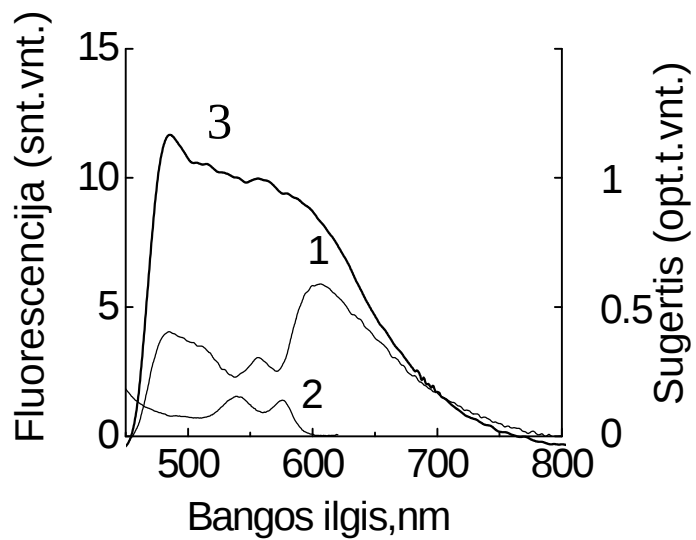


1.14 pav. Ligos sukelti kolageno ir NADH fluorescencijos intensyvumų pokyčiai

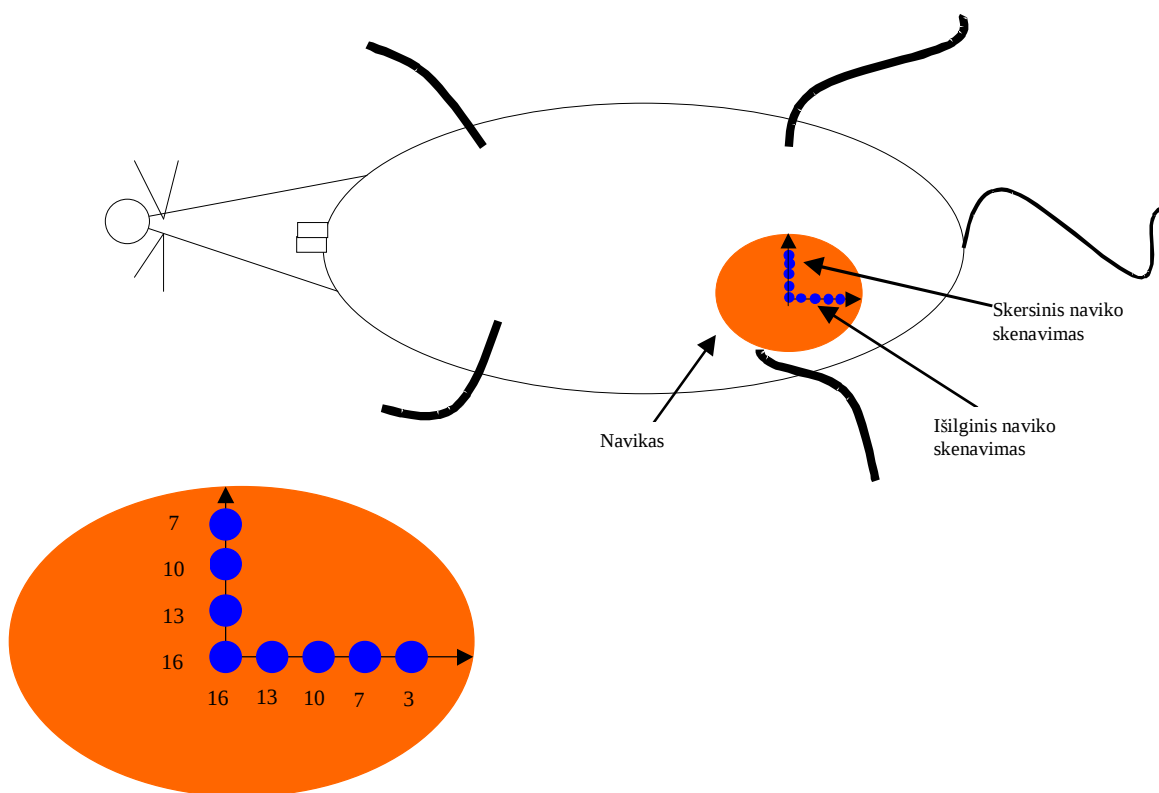
Metabolizmo spartos skirtumai gali atspindėti sveikų ir ligos pažeistų audinių spektruose. Nustatyta, kad NADH fluorescencija eksponentiškai užgęsta praėjus 2 val. po audinio pašalinimo, nes audiniuose esantis NADH oksiduoja į nefluorescuojantį NAD. Be to, sveiko ir navikinio audinio pH yra skirtingas ir tai taip pat veikia fluorescuojančio NADH ir beveik nefluorescuojančio NAD koncentracijų santykį. Galbūt todėl daugelio tyrėjų nustatyta, kad navikinių audinių mėlynoji fluorescencija yra silpnesnė negu sveikų audinių.

Kraujyje esančio hemoglobino šviesos sugertis irgi veikia audinio savitosios fluorescencijos spektrą. Hemoglobinas gali sugerti žadinančią šviesą ir, veikdamas kaip signalą slopinantis ekranas, smarkiai susilpninti fluorescencijos signalą. Kitas galimas reiškinys yra vadinamoji reabsorbcija, kai hemoglobinas sugeria išspinduliuotą

fluorescenciją. Tai sukelia įvairius fluorescencijos spektrų iškraipymus. Dėl stiprios sugerties ties tam tikrais bangų ilgiais gaunamos tariamos smailės ir įdubos (1.15 pav.).



1.15 pav. Nekrozės nepažeisto navikinio audinio (3) ir kraujosruvos srities audinyje savitosios fluorescencijos spektras (1); (2) – kraujo sugerties spektras

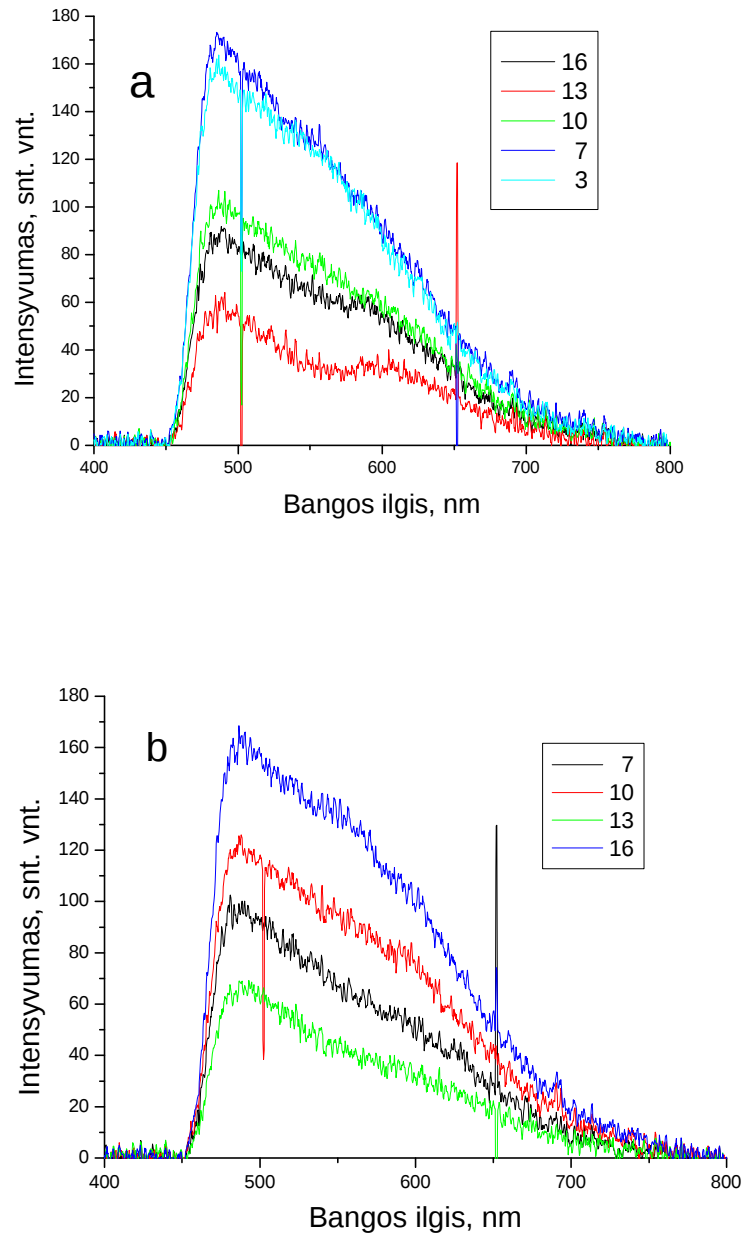


1.16 pav. Eksperimentinės pelės modelinė schema ir skenuojamos naviko vietos

Siekiant įvertinti įvairių veiksnių poveikį navikinių audinių savitosios fluorescencijos spektrams, buvo atliktas eksperimentas, kurio metu buvo matuojami pelės kirkšnyje įskiepyto vidutinio dydžio (1,5 cm) naviko fluorescencijos spektrai. Siekta nustatyti, kiek oda „pridengia“ naviko fluorescenciją, t. y. kiek ir kaip iškreipomi spektrai matuojant naviko (prapjovus odą) ir virš naviko esančios odos savitosios fluorescencijos spektrus. Taip pat buvo stengiamasi kaip galima suvienodinti fluorescencijos žadinimo ir registravimo sąlygas, nes tik taip galima tinkamai įvertinti ir patikimai palyginti nuo odos virš naviko ir nuo atviro naviko paviršiaus matuojamos fluorescencijos intensyvumus. Eksperimento *in vivo* metu pelė buvo užmigdoma ir stabiliai mobilizuojama ant mikrometrinio stalelio. Šitaip buvo galima matuoti odos virš naviko spektrus ir naviko spektrus prapjovus odą tiksliai tose pačiose vietose. Navikas buvo skenuojamas skersai (statmenai pelės uodegai) ir išilgai (lygiagrečiai su pelės uodega), tikintis ir čia rasti

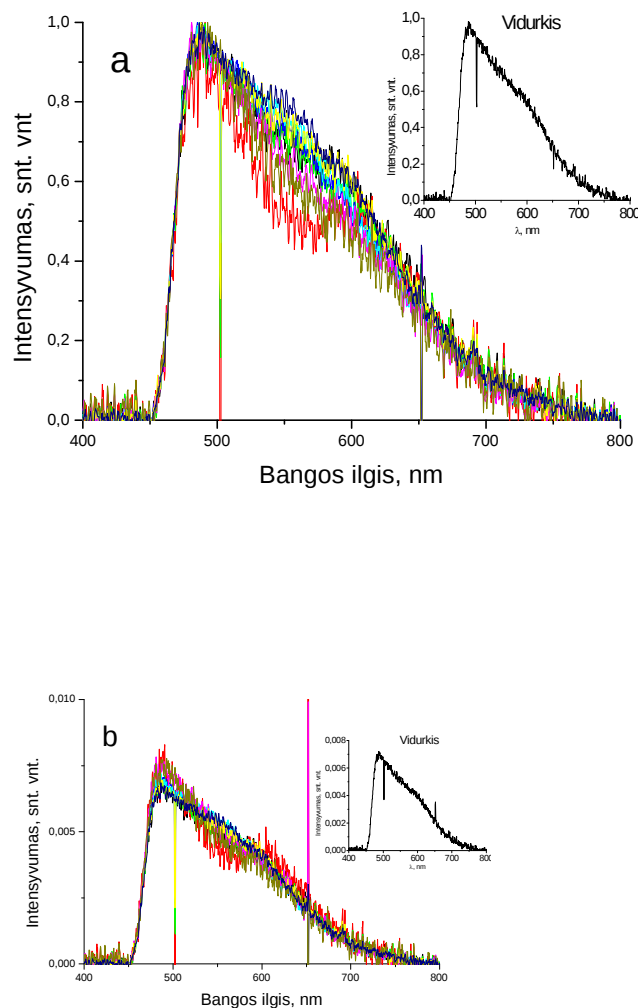
dėsningumą. Išilgai pamatuoti penkių vietų fluorescencijos spektrai, o skersai – keturių (1.16 pav.).

Odos virš naviko išilgai ir skersai (pagal 1.16 schemą) pamatuoti savitosios fluorescencijos spektrai pateikiami 1.17 paveiksle. Matyti, kad fluorescencijos intensyvumas nepriklauso nuo matavimo vietos, ir nėra jokio dėsningo kitimo nuo krypties „centras–kraštas“.



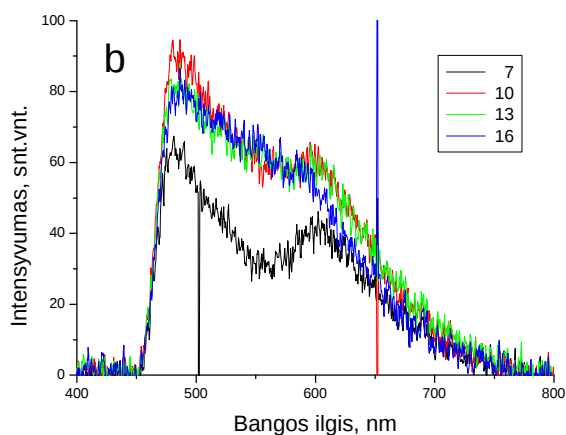
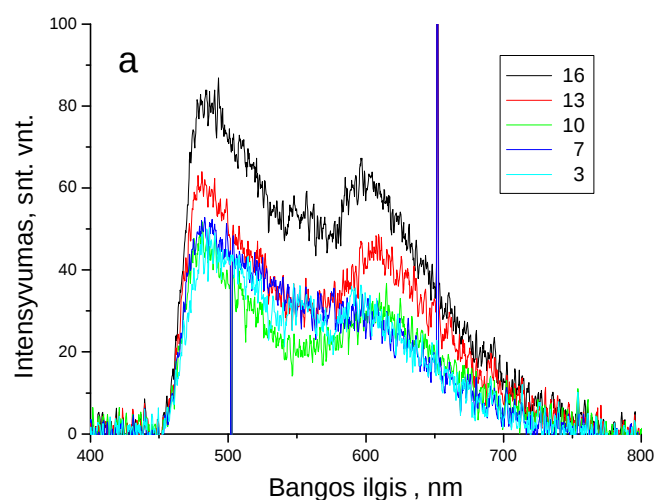
1.17 pav. Odos virš naviko fluorescencijos spektrai: matuojant išilgai (a) ir skersai (b) nurodytose vietose

Kadangi nėra skersai ir išilgai matuotų odos spektrų ryškių skirtumų ir neaptikta jokių dėsningumų matuojant spektrus nuo naviko vidurio link krašto, tai visi spektrai buvo analizuojami neatsižvelgiant į matavimo vietą. Kad išryškėtų spektrų formos ypatumai, jie buvo sunormuoti į didžiausią intensyvumo vertę (1.18 pav. a) ir į matuojamo spektro plotą (1.18 pav. b).



1.18 pav. Į didžiausią intensyvumo vertę (a) ir į spektro plotą (b) normuoti odos virš naviko spektrai. Intarpai vaizduoja spektrų vidurkį

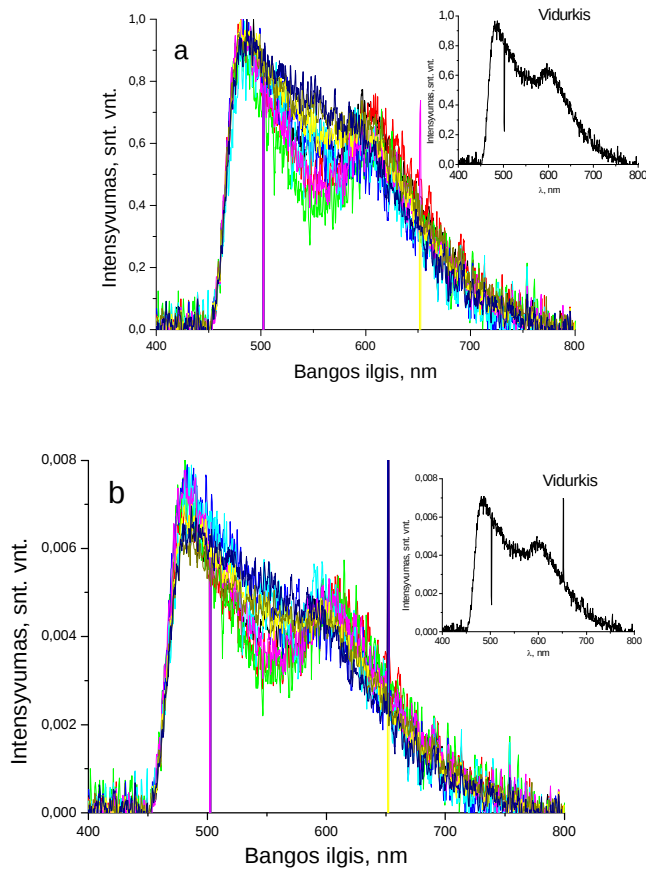
Matyti, kad abiem normavimo atvejais vidurkiniai spektrai yra panašūs. Spektrams būdingas nedidelis petys ties 605–620 nm. Prapjovus odą virš naviko lygiai tose pačiose vietose išmatuoti naviko savitosios fluorescencijos spektrai (1.19 pav.).



1.19 pav. Išilgai (a) ir skersai (b) nurodytose vietose pamatuoti naviko fluorescencijos spektrai

Ir šiuo atveju fluorescencijos intensyvumai yra išsibarstę atsitiktiniu būdu, tad jie analizuojami visi drauge, nepriklausomai nuo to, kaip buvo matuoti (išilgai ar skersai,

arčiau ar toliau nuo naviko centro). Svarbu pastebėti, kad odos virš naviko (1.17 pav.) ir paties naviko (1.19 pav.) savitosios fluorescencijos spektrų intensyvumai skiriasi – antru atveju fluorescencijos intensyvumas yra beveik perpus mažesnis. Kaip minėta, eksperimento sąlygos kaip galima buvo palaikomos vienodos, todėl fluorescencijos intensyvumo pokyčiai gali būti laikomi parametru, leidžiančiu atskirti sveiką ir pažeistą audinį. Taigi fluorescencijos signalo intensyvumas matuojant jį tiesiogiai

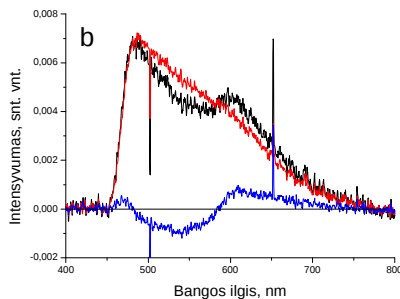
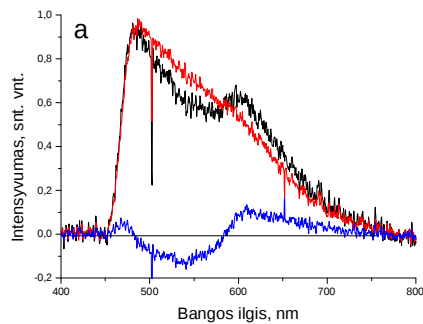


1.20 pav. Į didžiausią intensyvumą (a) ir į spektro plotą (b) normuoti naviko spektrai. Intarpai vaizduoja spektrų vidurkius

virš naviko yra silpnesnis, palyginti su odos virš naviko fluorescencijos signalo intensyvumu. Spektrai buvo sunormuoti į maksimalų intensyvumą ir į spektro plotą (1.20 pav.).

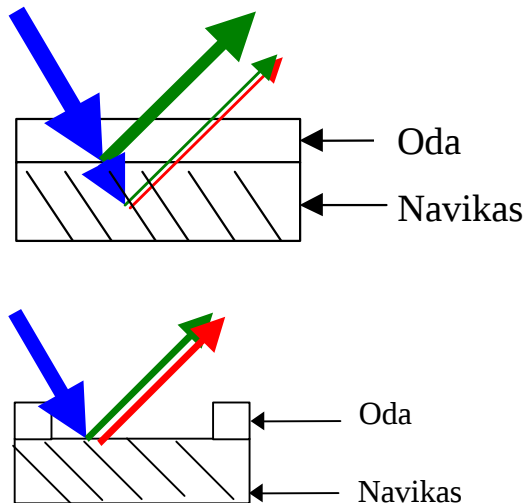
Kaip matyti iš pateiktų paveikslų, nuo odos paviršiaus ir nuo atverto naviko paviršiaus matuotų fluorescencijos spektrų forma skiriasi. Taigi oda nėra tiesiog paprastas sluoksnelis, sumažinantis fluorescencijos, matuojamos tiesiog nuo naviko paviršiaus, intensyvumą, o yra biologinis audinys, dėl savo optinių savybių galintis modifikuoti naviko fluorescencijos spektrą.

Normuotų spektrų smailė ties 605–620 nm yra žymesnė, taip pat išryškėja įduba ties 570 nm (1.20 pav.). Norint įsitikinti, ar skirtumai gali labiau išryškėti, buvo gauti naviko ir odos virš naviko normuotų savitosios fluorescencijos skirtuminiai spektrai (1.21 pav.). Buvo išvesti normuotų naviko ir odos virš naviko spektrų vidurkliai ir tada iš į maksimalų intensyvumą normuoto vidurkinio naviko spektro buvo atimtas į maksimalų intensyvumą normuotas vidurkinis odos virš naviko spektras (1.21 pav. a). Analogiška procedūra atlikta ir su į spektro plotą normuotais spektrais (1.21 pav. b).



1.21 pav. Į didžiausią intensyvumą (a) ir į spektro plotą (b) normuoti naviko (juoda kreivė) ir odos virš naviko (raudona kreivė) savitosios fluorescencijos spektrai; skirtuminis spektras (navikas–oda virš naviko) (mėlyna kreivė)

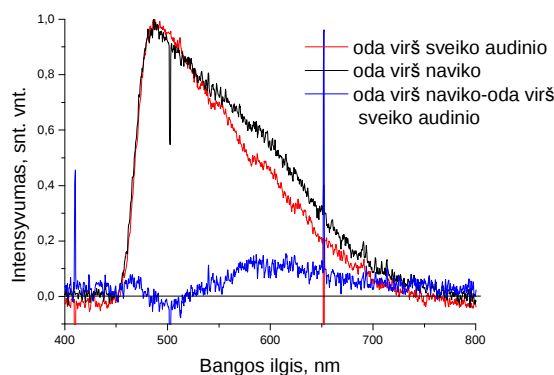
Anksčiau pastebėti skirtumai dar labiau išryškėjo. Navikų spektrų intensyvumas 500–575 nm intervale yra mažesnis nei odos virš naviko spektrų fluorescencijos intensyvumas, tačiau jis yra didesnis 605–640 nm spektriniame intervale. Galima įtarti, kad skirtumai 500–575 nm intervale atsirado dėl hemoglobino sugerties (reabsorbcijos reiškiny). Spektriniame intervale nuo 605 nm iki 640 nm fluorescuoja endogeniniai porfirinai. Tai tikėtinas rezultatas, nes yra žinoma, kad navikiniuose audiniuose kaupiasi daugiau endogeninių porfirinų. Odos virš naviko spektruose endogeninių porfirinų aptikta mažiau nei matuojant fluorescenciją tiesiogiai virš naviko. Šį faktą galima būtų paaiškinti tuo, kad odos sluoksnis tarsi ekranuoja naviko fluorescencijos signalą (1.22 pav.). Matuodami odos virš naviko spektrus fiksuojame bendrą odos ir naviko



1.22 pav. Odos virš naviko (a) ir naviko (b) spektrų matavimas. Mėlyna rodyklė vaizduoja žadinančią šviesą, o žalia ir raudona – savitąją fluorescenciją

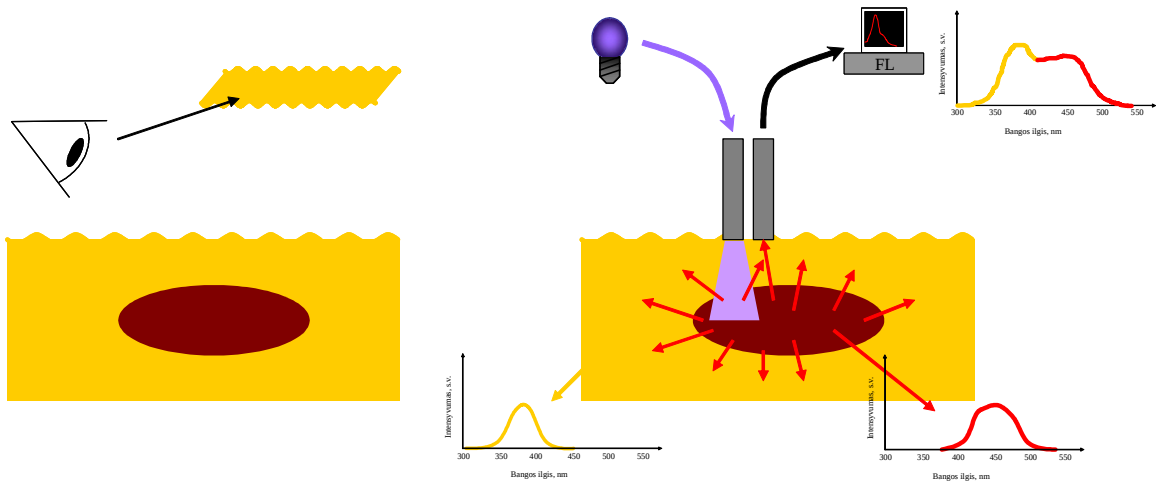
savitąją fluorescenciją. Mėlynos šviesos prasiskverbimo gylis į audinį yra apie 3 mm. Tai reiškia, kad žadinimo šviesa sužadina ne tik odos sluoksnį, bet ir giliau esančius audinius (šiuo atveju naviką). Yra žinoma, kad navikinių audinių savitosios fluorescencijos intensyvumas yra mažesnis nei sveikų audinių. Aptariamuoju atveju silpną naviko fluorescencijos signalą kelyje į išorę dar labiau silpnina audinių sklaida ir sugertis. Galima įsivaizduoti, kad odos sluoksnis veikia kaip tam tikras filtras. Šiuo atveju fiksuojama silpna naviko savitoji fluorescencija, o dominuojanti yra odos fluorescencija (1.22 pav. a). Kai fluorescencija matuojama tiesiogiai virš naviko (pav. 1.22 b), registruojamas tik naviko fluorescencijos spektras su jam būdinga endogeninių porfirinų juosta (605–620 nm) (1.20 pav.).

Jei per odą matuojamos naviko savitosios fluorescencijos signalas yra toks silpnas, ar galima atskirti odos virš sveiko audinio ir virš naviko fluorescencijos spektrus? Norint atsakyti į šį klausimą, reikia matuoti odos virš sveikų audinių spektrus ir palyginti juos su jau turimais odos virš naviko spektrais. Virš sveikų eksperimentinės pelės nugaros ir pilvo audinių esančios odos savitosios fluorescencijos spektrų vidurkiai buvo sunormuoti į vienetinį intensyvumą ir atimti iš taip pat normuotų odos virš naviko spektrų (1.23 pav.).



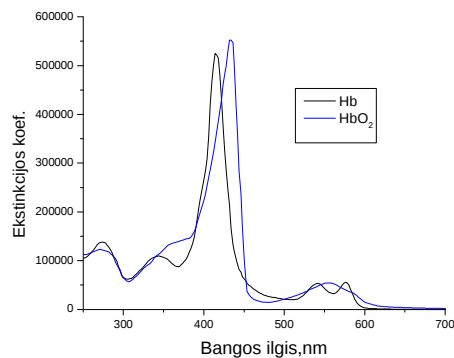
1.23 pav. Į didžiausią intensyvumą normuoti vidurkiniai odos virš sveiko audinio (raudona kreivė) ir odos virš naviko (juoda kreivė) savitosios fluorescencijos spektrai. Odos virš naviko ir odos virš sveiko audinio skirtuminis spektras (mėlyna kreivė)

Iš skirtuminio spektro matyti, kad odos virš naviko savitosios fluorescencijos intensyvumai didesni spektriniame ruože nuo 580 nm iki 620 nm. Šis ruožas atitinka navikų fluorescencijai būdingą endogeninių porfirinų juostą (605–620 nm). Apibendrinant galima pasakyti, kad, matuojant įtariamo navikinio darinio fluorescencijos spektrus net ir per jį dengiantį odos sluoksnį, naviką galima aptikti, kas neįmanoma vizualios apžiūros metu (1.24 pav.).



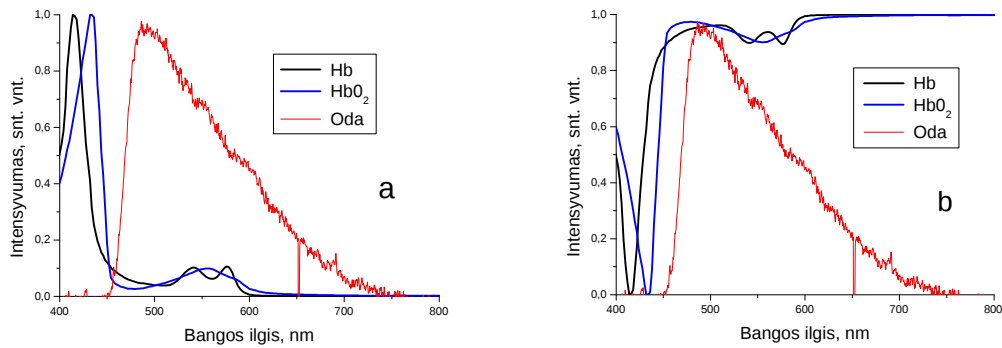
1.24 pav. Naviko diagnozavimo galimybės vizualios apžiūros ir optinės diagnostikos metu

Fluorescencijos intensyvumų skirtumai, esantys 500–575 nm intervale, kur navikų spektruose yra įduba (1.21 pav.), greičiausiai, yra hemoglobino sugerties (1.25 pav.) pasekmė.



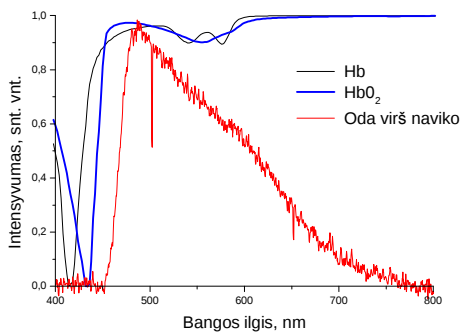
1.25 pav. Oksiduoto (mėlyna kreivė) ir neoksiduoto (juoda kreivė) hemoglobino sugerties spektrai

Norint tai įrodyti, buvo analizuoti tos pačios pelės odos virš sveiko audinio, odos virš naviko, raumens, naviko ir naviko pjūvio fluorescencijos spektrai. Suvidurkinti ir į vienetinių intensyvumą sunormuoti atitinkamų audinių spektrai sugretinti su normuotais oksiduoto ir neoksiduoto hemoglobino spektrais (1.26 pav.).

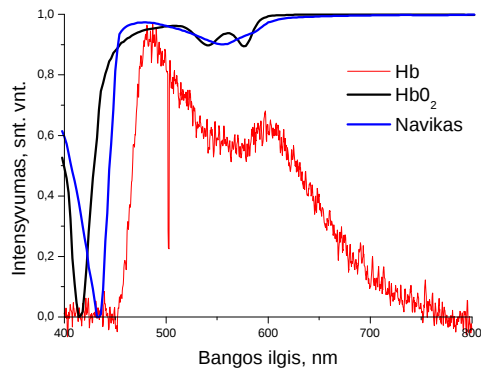


1.26 pav. Normuoti į maksimalų intensyvumą odos virš sveiko audinio savitosios fluorescencijos spektrai, sugretinti su hemoglobino sugerties spektrais (a) ir su invertuotais hemoglobino sugerties spektrais (b)

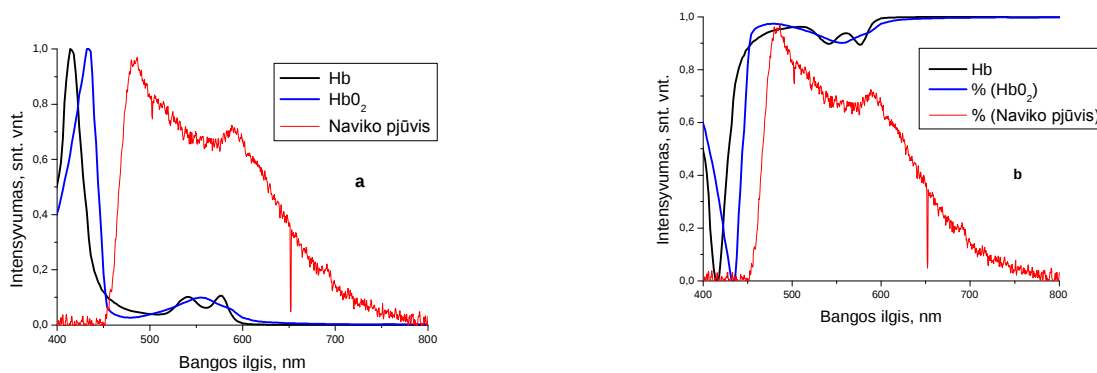
Kaip matyti iš 1.26 paveikslo, hemoglobino sugertis odos fluorescencijos spektrams įtakos neturi.



1.27 pav. Normuoti į maksimalų intensyvumą odos virš naviko savitosios fluorescencijos ir invertuoti hemoglobino sugerties spektrai



1.28 pav. Normuoti į maksimalų intensyvumą naviko savitosios fluorescencijos ir invertuoti hemoglobino sugerties spektrai



1.29 pav. Normuoti į vienetinį intensyvumą naviko pjūvio savitosios fluorescencijos spektrai, sugretinti su hemoglobino sugerties spektrais (a) ir su invertuotais hemoglobino sugerties spektrais (b)

Iš paveikslų 1.26–1.29 matyti, kad ten, kur yra kraujas ar kraujosruvų (navikas ir naviko pjūvis), dėl hemoglobino sugerties (fluorescencijos reabsorbcijos) registruojamas netikslus savitosios fluorescencijos spektras. Kadangi odos paviršiuje kraujas nėra, fluorescencija 500–580 nm intervale yra intensyvesnė ir spektre būdingos įdubos nėra. 1.2 lentelėje pateiktos apskaičiuotos įvairių audinių vidutinės savitosios fluorescencijos intensyvumų vertės.

1.2 lentelė. Įvairių audinių vidutinės savitosios fluorescencijos spektrų intensyvumo vertės

Audinys	Vidutinė intensyvumo vertė
Oda virš sveiko audinio	122
Oda virš naviko	116
Raumuo	95
Navikas	69
Naviko pjūvis	69

Lentelės duomenys patvirtina išvadą, kad sveiko audinio (raumens) fluorescencija yra intensyvesnė už naviko fluorescenciją. Kadangi sveiko audinio fluorescencija yra intensyvesnė už naviko, tai galima tikėtis, kad ir odos virš sveiko audinio savitosios fluorescencijos spektras bus intensyvesnis nei odos virš naviko. Tą ir patvirtino eksperimentiniai rezultatai.

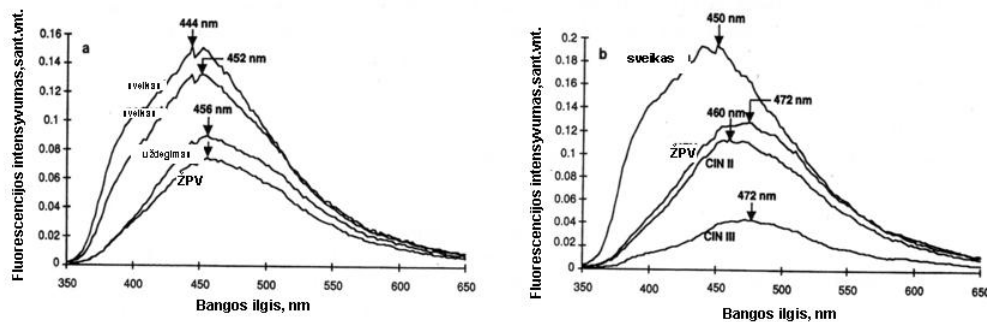
Taigi iš pateikto pavyzdžio matyti, kaip svarbu suprasti dėl biologinio objekto sudėtingumo daugelio veiksnių veikiamus optinius signalus ir tinkamai interpretuoti jų teikiamą informaciją. Tam tikslui tyrinėtojai kuria įvairius modelius, kurie padeda gauti kuo tikslesnę kiekybinę informaciją, apimančią optines, morfologines ir biochemines biologinių audinių savybes. Remiantis tokiais modeliais, gauti parametrai panaudojami audinių diagnostikai (pavyzdžiui, sveikas–ligos pažeistas) arba audinio komponentų kiekybiniam įvertinimui.

Kaip jau minėta, biologiniuose audiniuose egzistuoja gana nedaug fluoroforų, kurių fluorescencija gali būti sužadinta 300–600 nm spektrinio ruožo šviesa. Svarbiausieji iš jų yra Trp, kolagenas, elastinas, NAD(P)H, FAD ir porfirinai. Ir nors vieno bangos ilgio žadinimo šviesa galima sužadinti tik du ar tris iš išvardytų fluoroforų, jų fluorescencijos spektrų interpretaciją labai sunkina tai, kad fluorescencijos parametrai priklauso nuo fluoroforo mikroaplinkos, sąveikos su šalia esančiomis molekulėmis, audinio sugerties ir sklaidos savybių. Todėl, siekiant iš savitosios fluorescencijos spektroskopinių matavimų gauti patikimą diagnostinę informaciją, leidžiančią atskirti

sveikas ir ligos pažeistas audinių vietas, kuriami įvairūs statistiniai ir empiriniai algoritmai. Jie dažniausiai grįsti fluorescencijos intensyvumų arba jų santykių ties tam tikrais žadinimo–emisijos bangų ilgiais vertinimu (Panjehpour ir kt., 1996). Tokie metodai dažnai taikomi atliekant klinikinę diagnostiką (Lam ir kt., 1998; Goujon ir kt., 2001).

Vienas dažniausiai taikomų statistinių duomenų apdorojimo metodų yra principinių komponentų analizė. Taikant ją nustatomi sveikų ir nesveikų audinių spektriniai skirtumai ir jų pagrindu sukuriama diagnostiniai algoritmai. Pavyzdžiui, metodas buvo taikytas analizuojant 337 nm, 380 nm ir 460 nm bangų ilgių šviesa žadintos fluorescencijos matavimais gautus gimdos kaklelio audinių spektrinius duomenis. Diagnozuojant plokščialąstelines intraepitelines pažaidas, pasiektas 82 % jautrumas ir 68 % specifiškumas (Ramanujam ir kt., 1996).

Tos pačios grupės atlikti tyrimai ir sudarytas algoritmas, pagrįstas audinių savitosios fluorescencijos intensyvumų palyginimais, padeda identifikuoti histologiškai pakitusį gimdos kaklelį (Ramanujam ir kt., 1994 a). Klinikinio tyrimo metu buvo matuojama 337 nm bangos ilgio lazerio spinduliuote sužadinta tiriamo audinio savitoji fluorescencija. Kolposkopiškai nustatyti pakitę plotai ir prieš imant bandinius biopsijai buvo pamatuoti tų vietų fluorescencijos spektrai. Vidutiniškai matuota po 2 pakitusios ir 2 sveikos vietos spektrus. Buvo imamos tik pakitusių vietų biopsijos. Fluorescencijos spektrai registruoti 350–700 nm intervalu (1.30 pav.). Pamatuoti 28 pacienčių gimdos kaklelio spektrai, iš 66 kolposkopiškai apžiūrint atrodančių sveikų ir 49 histologiškai nesveikų vietų (5 uždegimo, 21 papilomos viruso (HPV) infekcija ir 23 įvairių stadijų gimdos kaklelio intraepitelinė neoplazija (CIN)). Šio tyrimo metu buvo daroma prielaida, kad kolposkopiškai apžiūrint sveikai atrodantys audiniai yra histologiškai sveiki.



1.30 pav. Dviejų pacienčių gimdos kaklelio audinių fluorescencijos spektrai: a – sergančios lėtiniu uždegimu ir žmogaus papilomos viruso infekcija ir sergančios II ir III stadijos CIN ir HPV infekcija

Fluorescencijos matavimų rezultatai parodė, kad pakitusios histologijos audinių fluorescencijos intensyvumas yra mažesnis kaip sveikų audinių. Sveikų audinių spektrų forma kinta priklausomai nuo matavimo vietos tiek tos pačios pacientės, tiek skirtingų pacienčių audinius. Sveiko audinio didžiausias fluorescencijos intensyvumas yra ties 442 arba 453 nm (± 3 nm); nesveikų audinių: ties 444, 454, 464 arba 470 nm (± 3 nm). Sveikų ir nesveikų audinių spektrų maksimumo padėties skirtumas byloja apie spektrinės formos skirtumus. Vienas iš spektrų formos vertinimo būdų yra polinkio kampo matavimai tam tikrame bangų ilgių ruože. Nustatyta, kad sveikų ir nesveikų audinių spektrų polinkio kampai labiausiai išsiskiria 420–440 nm intervale. Prieš nustatant polinkio kampą, visi spektrai buvo sunormuoti į vienetinį intensyvumą. Sveikų audinių polinkio kampai yra mažesni už nesveikų audinių, ir tai atspindi nesveikų audinių ilgesnį didžiausio fluorescencijos intensyvumo bangos ilgį.

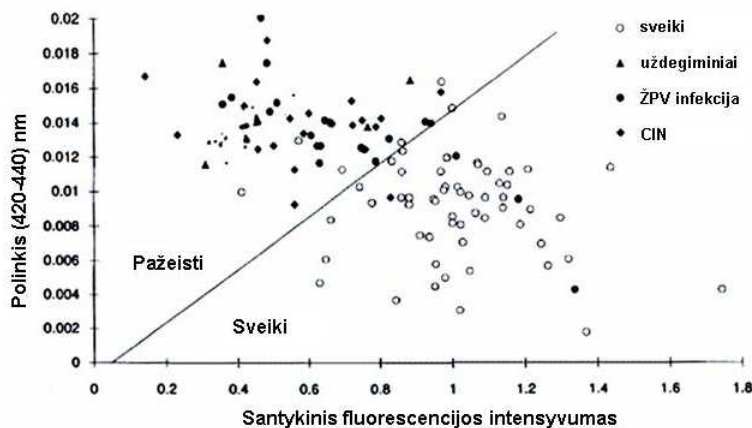
Nustatant, ar sveikų ir nesveikų audinių fluorescencijos intensyvumų maksimumų skirtumai yra statistiškai reikšmingi, naudotasi t-testais (*one-sided paired t-test*). Hipotezės, kad sveikų audinių fluorescencijos intensyvumas didesnis negu nesveikų, patvirtina rezultatas $p < 0,005$, o kad tos pačios pacientės papilomos viruso infekcijos pažeisti audiniai fluorescuoja intensyviau negu intraepitelinės neoplazijos pažeisti –

rezultatas $p < 0,05$. Taip pat ir tikrinant spektrų polinkio kampų skirtumus (ligos pažeistų audinių spektrų polinkio kampai didesni negu sveikų) gauta patikimumo vertė $p < 0,005$.

Algoritmas, įgalinantis *in vivo* nustatyti, ar tiriama audinio sritis yra histologiškai nesveika, buvo sudarytas remiantis dviem spektroskopiniais komponentais:

- nežinomo audinio maksimalios fluorescencijos intensyvumo vertės palyginimu su vidutine tos pačios pacientės kolposkopiškai apžiūrint sveikai atrodančios vietos maksimalia fluorescencijos intensyvumo verte;
- tiriamos vietos spektro polinkio kampu 420–440 nm spektriniame ruože.

Pagal šį algoritmą apdoroti visų matavimų duomenys pateikiami (1.31 pav.) (Ramanujam ir kt., 1994 b). Ordinačių ašis atitinka į vienetinį intensyvumą normuotų spektrų polinkio kampą, abscisių ašis – santykinį kiekvieno bandinio maksimalų fluorescencijos intensyvumą (kiekvieno matavimo maksimalus fluorescencijos intensyvumas buvo padalijamas iš tos pačios pacientės visų kolposkopiškai apžiūrint sveikai atrodančių audinių spektrų maksimalios vertės vidurkio). Šio algoritmo jautrumas ir specifiškumas yra 92 % ir 90 %.



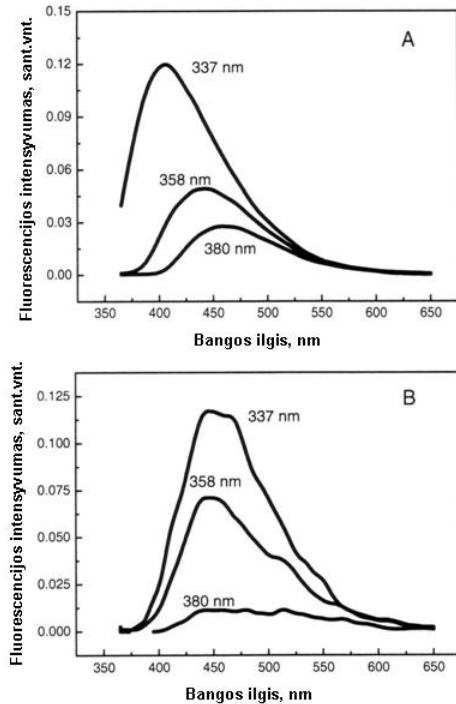
1.31 pav. Sveikų (balti) ir histologiškai nesveikų (juodi) audinių spektrų polinkio 420–440 nm ruože ir santykinio fluorescencijos intensyvumo tarpusavio priklausomybė. Adaptuota pagal (Ramanujam ir kt., 1994 b)

Taigi tinkamų algoritmų sukūrimas padeda identifikuoti diagnostikai tinkamiausius spektrinius ruožus, t. y. tuos, kuriuose matomi didžiausi sveikų ir nesveikų audinių spektriniai skirtumai. Kartais jie gali suteikti naudingos informacijos ir apie tai, dėl ko atsiranda tokie skirtumai. Tačiau labai dažnai nedidelius ir subtilius spektrų skirtumus trikdo ir slepia audinių sugertis ir sklaida. Tad norint gauti tikrai patikimą informaciją apie ligos sukeltus audinių biocheminius pokyčius ir juos atitinkančius fluorescencijos spektrų pasikeitimus, būtina eliminuoti trukdžius. Tam tikslui kuriami empiriniai ir tikslesni teoriniai modeliai.

Vienas iš tokių empirinių modelių buvo sukurtas kraujagyslių *ex vivo* diagnostikai identifikuojant sveikas ir aterosklerozės pažeistas vietas (Richards-Kortum ir kt., 1989). Pagal šį modelį pamatuota savitoji fluorescencija išreiškiama dviejų faktorių sandauga: (a) tiesinio visų fluoroforų, nuo kurių priklauso savitoji fluorescencija, derinio ir (b) fluorescencijos silpninimo faktoriaus, apimančio silpninimą dėl audinių sklaidos ir kraujo sugerties. Modelis panaudotas analizuojant kraujagyslių fluorescencijos spektrus, matuotus žadinant 476 nm bangos ilgio šviesa. Esant tokiam žadinimui arterijose fluorescuoja struktūriniai baltymai (kolagenas ir elastinas) ir ceroidai, o fluorescencija silpnėja dėl hemoglobino sugerties (Richards-Kortum ir kt., 1989). Taikant sukurtojo algoritmą, sveikos kraujagyslės nuo aterosklerozės pažeistų buvo atskiriamos 91 % jautrumu ir 85 % specifiškumu.

Tas pats modelis taikytas analizuojant *in vivo* pamatuotus gimdos kaklelio audinių fluorescencijos spektrus žadinant 337 nm bangos ilgio šviesa (Ramanujam ir kt., 1994 a). Audinių savitoji fluorescencija priskirta kolagenui, elastinui, NAD(P)H ir FAD, o fluorescencijos slopinimas – oksihemoglobino sugerčiai ir sklaidai. Sklaidos poveikis laikytas nekintančiu. Sunormavus kiekvienos pacientės kiekvienos matuotos vietos kolageno fluorescencijos įnašą į tos pačios pacientės sveikų vietų fluorescencijos spektruose esančio kolageno įnašo vidurkį, pastebėta bendra tendencija, kad ikinavikinių pažaidų paliestuose audiniuose kolageno fluorescencija yra mažesnė negu sveikų audinių. Šitaip buvo nustatytas NAD(P)H fluorescencijos padidėjimas ikinavikiniuose audiniuose, palyginti su sveikais. Taigi tokia duomenų analizė suteikia informacijos, paaiškinančios dėl ko atsiranda spektrų pokyčių. Tačiau dėl gana sudėtingų normavimo sąlygų metodas nėra patogus taikyti klinikinėje diagnostikoje.

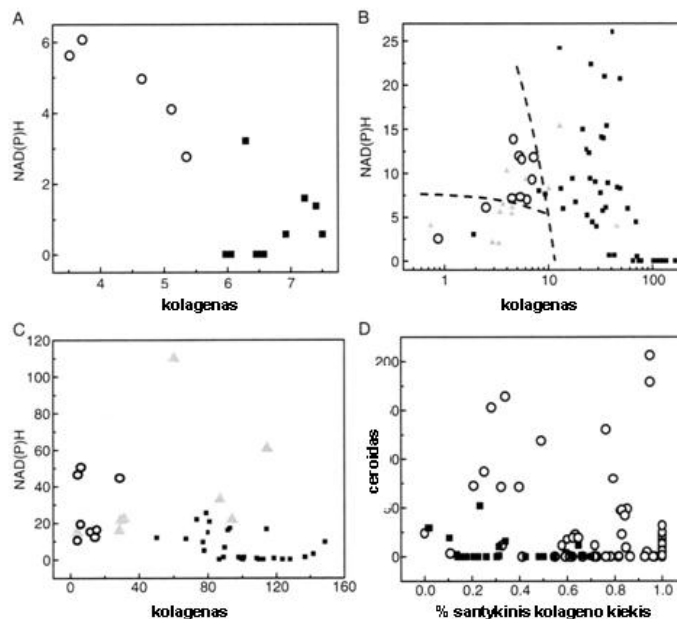
Kitaip nei realiai pamatuoti fluorescencijos spektrai, kuriuose egzistuoja netiesinėms priklausomybėms paklūstantis audinių fluorescencijos, sklaidos ir sugerties įnašai, tikrąjį savitosios fluorescencijos spektrą sudaro tiesinėms priklausomybėms paklūstantys tam tikro bangos ilgio šviesa sužadinamų atskirų fluoroforų spektrų derinys. Tad, žinant atskiro komponento spektrines savybes, paprasta tiesinė spektrų analizė leidžia gauti kiekybinę informaciją apie audinio biocheminę sudėtį. Tačiau, nors ir žinant, kokios yra fluoroforų tirpalų spektrinės savybės, negalima jų tiesiogiai lyginti su *in vivo* pamatuotomis spektrinėmis savybėmis, nes fluoroforo aplinka gyvame objekte jas keičia. Siekiant gauti dviejų svarbiausių endogeninių fluoroforų, kolageno ir NAD(P)H fluorescencijos spektrus *in vivo* aplinkoje, buvo pasinaudota fluorescencijos ir atspindžio spektrų duomenimis, gautais matuojant juos *in vivo* žmogaus stemplės audiniuose sustabdžius kraujo tekėjimą (Georgakoudi ir kt., 2002 a). Pokyčiai, kuriuos audiniuose sukelia pakitusi oksidacinė-redukcinė būklė, buvo matomi ir atspindžio, ir fluorescencijos spektruose. Tokie pokyčiai buvo tikėtini, nes mažėjant audiniuose deguonies kiekiui, NAD(P)H kiekis didėja. Apdorojant matuotų spektrų duomenis pagal multivariacinį kreivių išskyrimo algoritmą, gauti du spektriniai komponentai, kurių buvimas gali būti paaiškintas sumažėjusio deguonies kiekio poveikiu. Tų komponentų spektriniai parametrai sutampa su kolageno ir NAD(P)H. Taigi multivariaciniu kreivių išskyrimo būdu gauti fluorescencijos spektrai reprezentuoja kolageną ir NAD(P)H *in vivo* (1.32 pav.) (Georgakoudi ir kt., 2002 a).



1.32 pav. (A) Žmogaus stemplės audinių kolageno fluorescencijos spektrai pamatuoti *in vivo* žadinant fluorescenciją 337, 358 ir 380 nm bangos ilgio šviesa. (B) Tų pačių audinių NAD(P)H fluorescencijos spektrai. Adaptuota pagal (Georgakoudi ir kt., 2002 a)

Fluorescencinių matavimų duomenys buvo įrašyti į sveikų ir ligos pažeistų audinių savitosios fluorescencijos žadinimo-fluorescencijos matricas. Rezultatai suteikė kiekybinės informacijos apie audinių biocheminę sudėtį ir jos pokyčius vystantis ligai. Duomenys apie Barretto stemplės, gimdos kaklelio, burnos ir koronarinių arterijų audinius pateikti 1.33 pav. (Georgakoudi ir kt., 2002 a).

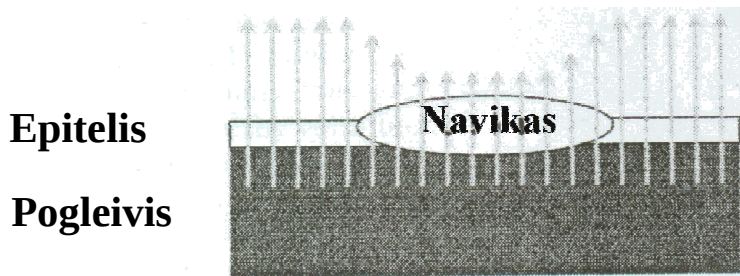
Barretto stemplė yra ikivėžinė stemplės audinio būklė, kuri kelia grėsmę, kad gali išsivystyti stemplės adenokarcinoma. Todėl sergantys Barretto stempale turi būti dažnai apžiūrimi endoskopiškai, kad displazijos pokyčiai būtų pastebėti kuo anksčiau ir gydymas pradėtas laiku. Bėda ta, kad displazijos atsiradimas endoskopiškai praktiškai nepastebimas, todėl tenka imti mėginius biopsijai. Taigi optinės biopsijos panaudojimas labai palengvintų tyrimą ligoniui ir padėtų gydytojui.



1.33 pav. NAD(P)H ir kolageno fluorescencijos įnašas į audinių savitosios fluorescencijos žadinimo–emisijos matricas (žadinimo bangos ilgiai nuo 337 iki 425 nm; emisijos – nuo 375 iki 700 nm). (A) Displazijos nepalieti audiniai (stačiakampiai) ir displastiniai Barretto stemplės audiniai. (B) Gimdos kaklelio audinių sveikas epitelis (stačiakampiai), kolposkopiškai apžiūrint nustatyta plokščialąstelinė metaplazija (gerybinė) (trikampiai) ir vėžio pažaidos (apskritimai). (C) Burnos ertmės epitelio sveiki audiniai (stačiakampiai), displazija (trikampiai) ir vėžys (apskritimai). (D) Ceroidų fluorescencijos priklausomybė nuo santykinio kolageno fluorescencijos įnašo į koronarinės arterijos savitosios fluorescencijos spektrą. Adaptuota pagal (Georgakoudi ir kt., 2003)

Išanalizavus Barretto stemplę sergančių septynių ligonių stemplės audinių fluorescencijos spektrus, nustatyta, kad vėlyvų stadijų displazijos pažeistuose audiniuose yra mažiau kolageno ir daugiau NAD(P)H negu displazijos nepaliestuose audiniuose. Didesnis NAD(P)H keikis navikiniuose audiniuose siejamas su intensyvia ląstelių proliferacija ir intensyvesne medžiagų apykaita (Mayevsky ir Chance, 1982). Kolageno kiekio sumažėjimas gali būti paaiškinamas tuo, kad kolageninės struktūros silpnėja jungiamajame audinyje galbūt dėl suaktyvėjusios kolageną skaldančio fermento kolagenazės veiklos. Iš dalies kolageno fluorescencijos silpnėjimas galimas ir dėl navikui

vystantis atsiradusio epitelio sluoksnio sustorėjimo. Dėl navikams būdingo gleivinės sluoksnio sustorėjimo silpnėja naviko stromos žadinimas šviesa ir labiau ekranuojama jungiamojo audinio fluorescencija (1.34 pav.).



1.34 pav. Dėl atsiradusio naviko sustorėjęs epitelio sluoksnis susilpnina stromos fluorescencijos intensyvumą

Analogiškai kolageno ir NAD(P)H kiekių pokyčiai aptinkami ir gimdos kaklelio audiniuose (Goergakoudi ir kt., 2002 a; Goergakoudi ir kt., 2002 b). Kolposkopinės apžiūros metu gimdos kaklelio vaizdas didinamas 6 arba 15 kartų ir iš nesveikai atrodančių vietų imami mėginiai ir tiriami histopatologiškai. Nors kolposkopija ir biopsija yra labai jautrūs metodai, padedantys aptikti gimdos kaklelio vėžį arba ikivėžines būsenas, jų specifiskumas mažas. Tai reiškia, kad daugelis kolposkopiškai apžiūrint įtartinai atrodančių vietų, atlikus histopatologinį tyrimą, pasirodo esančios sveikos ir biopsija nebuvo tikslinga. Taigi specifiskesnė technologija labai sumažintų diagnozavimo trukmę ir sąnaudas.

In vivo pamatuotų 35 pacienčių gimdos kaklelio kolposkopinės apžiūros metu sveikai ir įtartinai atrodžiusių kaklelio audinio vietų fluorescencijos spektrų apdoroti rezultatai pateikiami 1.33 pav. B. Iš įtartinai atrodžiusių vietų paimti biopsiniai mėginiai klasifikuoti kaip plokščialąstelinės metaplazijos (t. y. gerybiniai navikai) ir plokščialąstelinės intraepitelinės (t. y. ikivėžinės) pažaidos. Panašiai kaip ir dėl Barretto stemplės pažeistose vietose aptiktas sumažėjęs kolageno kiekis taip pat gali būti priskiriamas suaktyvėjusiai kolagenazės veiklai. Plokščialąstelinėse intraepitelinėse pažaidose NAD(P)H fluorescencija buvo intensyvesnė negu plokščialąstelinės

metaplazijos vietose. Šis didėjimas gali būti dėl sustorėjusio epitelio sluoksnio arba aktyvesnės medžiagų apykaitos. Kaip rodo diagnostinio diferencijavimo linijos (1.33 pav. B), nubrėžtos atlikus regresinę analizę, kolopskopinės apžiūros metu įtartinai atrodančios ir histopatologiškai identifikuotos kaip gerybinės plokščiakąstelinės metaplazijos vietos gali būti patikimai atskirtos nuo plokščiakąstelių intraepitelinių pažeidų. Taigi kiekybiniai biocheminės sudėties duomenys gali gerai padėti sprendžiant, kurias kolposkopiškai apžiūrint įtartinai atrodžiusias vietas būtina tikrinti.

Dar viena tirta audinių rūšis – burnos ertmės plokščiakąstelinis epitelis (Georgakoudi ir kt., 2003). Buvo nustatyta, kad tiriant burnos audinius svarbu žinoti keratino turinčio ir neturinčio epitelio savybes. Kolageno ir NAD(P)H buvimas sveiko, displazijos pažeisto ir navikinio keratino neturinčio epitelio vietose parodytas 1.33 pav. C. Kaip ir sergant Barretto stemplės liga, displazijos pažeistuose ir navikiniuose audiniuose yra mažesnė kolageno ir didesnė NAD(P)H fluorescencija.

Ieškant naujų aterosklerozinių plokštelių kraujagyslėse diagnozavimo būdų, buvo matuojama kraujagyslių fluorescencija *in vitro* (Richards-Kortum ir kt., 1989; Richards-Kortum ir kt., 1991; Laifer ir kt., 1989). Arterijų sienelių sudėtyje pagal spektrines charakteristikas identifikuoti keturi komponentai: kolagenas, elastinas, ceroidas ir triptofanas. Kolagenas ir elastinas yra ir sveikų, ir pažeistų arterijų struktūriniai baltymai. Vystantis aterosklerozei kolageno kiekis didėja (Rekhter ir kt., 1993; Tammi ir kt., 1978; Levene ir kt., 1962). Triptofanas – aromatinė aminorūgštis – yra baltymų, esančių lygiųjų raumenų ląstelių, kurios proliferuoja formuojantis aterosklerozinėms plokštelėms, sudėtyje. Ceroidas yra netirpus konglomeratas, kuris kaupiasi aterosklerozinių plokštelių nekrozinėse zonose (Hoff ir Hoppe, 1995). Jo svarbiausias komponentas yra oksiduoti mažo tankio lipoproteinai, kurių būdinga fluorescencija ir padeda identifikuoti aterosklerozines pažeidas (Hoff ir Hoppe, 1995; Fitzmaurice ir kt., 1989).

Analizuojant 110 vainikinių arterijų segmentų *ex vivo* pamatuotus spektrus, nustatyta, kad ne tik hemoglobinas, bet ir β -karotinas sugeria šviesą ir dėl to iškraipo matuojamus fluorescencijos ir atspindžio spektrus. Atitinkamai apdorojus spektrų duomenis, nustatyta, kad aterosklerozės pažeistų kraujagyslių segmentuose ceroido ir kolageno fluorescencija buvo gerokai intensyvesnė negu sveikų (1.33 pav. D)

(Georgakoudi ir kt., 2003). Šitie rezultatai gerai sutapo su histopatologinių tyrimų duomenimis.

Buvo aptarti būdai, kaip iš audinių savitosios fluorescencijos spektrų gauti kiekybinių duomenų apie audinių biocheminę sudėtį. Būtina sąlyga – iš fluorescencinių spektrų eliminuoti audinių sklaidos ir chromoforų sugerties sukeltus pokyčius. Gauta kiekybinė informacija labai naudinga nustatant diagnozę ir gilinantis į *in vivo* vykstančius audinių ligos sukeltus biocheminius pokyčius. Tokia informacija labai vertinga ir optimizuojant optinės biopsijos aparatūrą.

Literatūra

Auler H., G. Banzer (1942) Untersuchungen über die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. Z.Krebsforsch., 53, 65.

Figge R.H. (1942) Near ultraviolet light rays and fluorescence phenomena as aids to discovery and diagnosis in medicine. Univ.Md.Med.Bull., 26, 165.

Fitzmaurice M., J.O. Bordagaray, G.L. Engelmann, R. Richards-Kortum, T. Kolubayev, M.S. Feld, N.B. Ratliff, J.R. Kramer (1989) Argon ion laser-excited autofluorescence in normal and atherosclerotic aorta and coronary arteries: morphologic studies. Am. Heart J., 118, 1028.

Georgakoudi I., B.C. Jacobson, M.G. Müller, K. Badizadegan, D.L. Carr-Locke, E.E. Sheets, C.P. Crum, R.R. Dasari, J. Van Dam, M.S. Feld (2002 a) NADPH and collagen as *in vivo* quantitative biomarkers of epithelial pre-cancerous changes. Cancer Res., 62, 682.

Georgakoudi I., J.T. Motz, V. Backman, G. Angheloiu, A.S. Haka, M.G. Müller, R.R. Dasari, M.S. Feld (2003) Quantitative characterization of biological tissue using optical spectroscopy. In: Biomedical Photonics Handbook (ed. Tuan Vo-Dinh), CRC Press.

Georgakoudi I., E.E. Sheets, M.G. Müller, V. Backman, C.P. Crum, K. Badizadegan, R.R. Dasari, M.S. Feld (2002 b) Tri-modal spectroscopy for the detection and characterization of cervical precancers *in vivo*. Am. J. Obstet. Gynecol., 186, 374,

Goujon D., T. Glanzmann, T. Gabrecht, M. Zellweger, A. Radu, H. van den Bergh, P. Monnier, G.A. Wagnieres (2001) Detection of early bronchial carcinoma by imaging of the tissue autofluorescence. In: Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine, Proc. SPIE, Munich, Germany.

Hoff H.F., G. Hoppe (1995) Structure of cholesterol-containing particles accumulating in atherosclerotic lesions and the mechanisms of their derivation. *Curr. Opin. Lipidol.*, 6, 317.

Laifer L.I., K.M. O'Brien, M.L. Stetz, G.R. Gindi, T.J. Garrard L.I. Deckelbaum (1989) Biochemical basis for the difference between normal and atherosclerotic arterial fluorescence. *Circulation*, 80, 1893.

Lam S., T. Kennedy, M. Unger, Y. Miller, D. Gelmont, V. Rusch, B. Gipe, D. Howard, J. LeRiche, A. Coldman, A. Gazdar (1998) Localization of bronchial intraepithelial neoplastic lesions by fluorescence spectroscopy. *Chest*, 113, 696.

Levene C.I., J.C.F. Poole (1962) The collagen content of the normal and atherosclerotic human aortic intima. *Br. J. Exp. Pathol.*, 43, 469.

Mayevsky A., B. Chance (1982) Intracellular oxidation-reduction state measured *in situ* by a multichannel fiber-optic surface fluorometer. *Science*, 217, 537.

Panjehpour M., B. Overholt, T. Vo-Dinh, R. Haggit, D. Edwards, F. Buckley (1996) Endoscopic fluorescence detection of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus. *Gastroenterology*, 111, 93.

Policard A. (1924) Etudes sur les aspects offerts par des tumeur experimentales examinee a la lumiere de woods. *C.R. Soc. Biol.*, 91, 1423-1428.

Ramanujam N., M.F. Mitchell, A. Mahadeevan, S. Thomsen, A. Malpica, T. Wright, N. Atkinson, R. Richards-Kortum (1996) Development of a multivariate statistical algorithm to analyze human cervical tissue fluorescence spectra acquired *in vivo*. *Lasers Surg. Med.*, 19, 46.

Ramanujam N., M.F. Mitchell, A. Mahadeevan, S. Warren, S. Thomsen, E. Silva, R. Richards-Kortum (1994 a) *In vivo* diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337-nm-excited laser induced fluorescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 10193.

Ramanujam N., M.F. Mitchell, A. Mahadeevan, S. Thomsen, E. Silva, R. Richards-Kortum (1994 b) Fluorescence spectroscopy: A diagnostic tool for cervical intraepithelial neoplasia (CIN). *Gyn. Oncol.*, 52, 31.

Rekhter M.D., K. Zhang, A.S. Narayanan, S. Phan, M. Schork, D. Gordon (1993) Type I collagen gene expression in human atherosclerosis. Localization to specific plaque regions. *Am. J. Pathol.*, 143, 1634.

Richards-Kortum R., R.P. Rava, M. Fitzmaurice, J. Kramer, M.S. Feld (1991) 476 nm excited laser induced fluorescence spectroscopy of human coronary arteries: applications in cardiology. *Am. Heart J.*, 122, 1141.

Richards-Kortum R., R.P. Rava, M. Fitzmaurice, L. Tong, N.B. Ratliff, , J. Kramer, M.S. Feld (1989) A one-layer model of laser induced fluorescence for diagnosis of disease in human tissue: applications to atherosclerosis. IEEE Trans. Biomed. Eng., 36, 1222.

Tammi M., P.O. Seppala, A Lehtonen, M. Mottonen (1978) Connective tissue components in normal and atherosclerotic human coronary arteries. Atherosclerosis, 29, 191, 51.