

2. FLUORESCENCIJOS REGISTRAVIMO TECHNIKOS

Optinė biopsija – tai neinvazinis diagnostikos metodas, paremtas audinių optinių savybių tyrimu. Dažniausiai optinės biopsijos procedūrai yra taikomas fluorescencinės spektroskopijos metodas. Fluorescencija yra audinio atsakas į apšvietus (sužadinus) atitinkamos spalvos (bangos ilgio) šviesa. Biologiniuose audiniuose šis atsakas yra gana silpnas, todėl, kad jis būtų užregistruotas reikia turėti didelio jautrumo aparatūros. Kadangi tyrimo objektas yra konkretus – biologiniai audiniai *in vivo*, tai optinės biopsijos prietaisams keliamas pagrindinis reikalavimas – turi tiktai tyrimams tiek su gyvais eksperimentiniais gyvūnais, tiek su žmonėmis. Tokiu atveju klasikiniai fluorescenciniai spektrometrai jau nėra tinkami, tačiau juos šiek tiek modifikavus galima padaryti labai jautrų, informatyvų optinės biopsijos prietaisą. Deja, tokio prietaiso kaina yra labai didelė, o taikant jį diagnostikai *in vivo* būtų panaudojama tik nedidelė visų jo galimybių dalis. Todėl buvo sukurti naujos kartos spektrometrai, kurie yra gerokai patogesni, paprastesni bei pigesni, bet ne tokie jautrūs. Tai šviesolaidiniai fluorescencijos spektrometrai, kurių jautrumas tobulėjant technologijoms stiprėja.

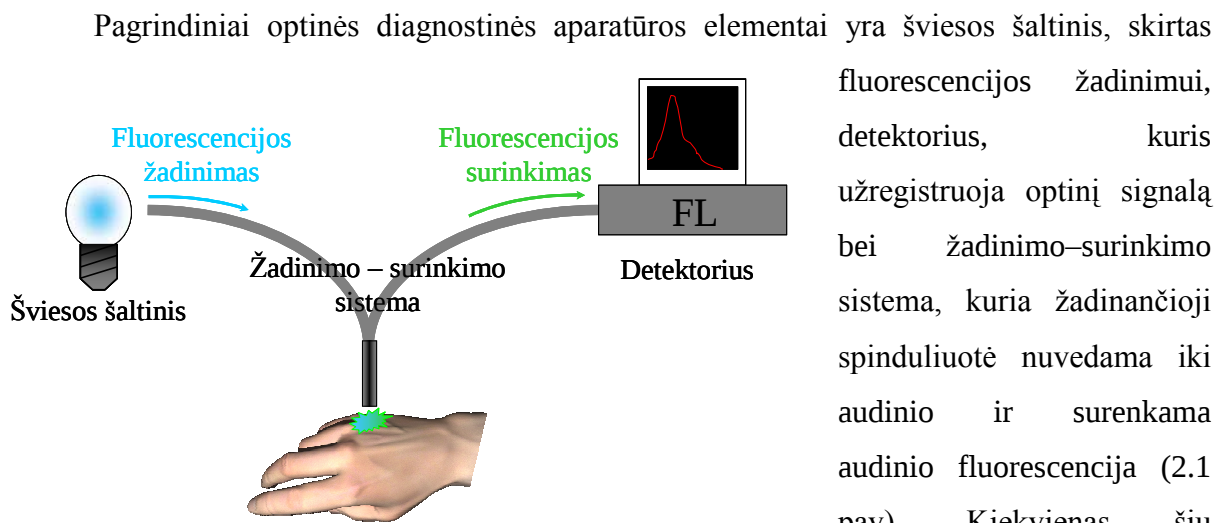
Diagnostikai taikomi fluorescenciniai metodai gali būti padalyti į dvi dalis – tai nuostoviosios fluorescencinės spektroskopijos metodai ir fluorescencijos su laikine skiriamąja geba metodai. Pastarieji yra daug sudėtingesni, tačiau jais gaunama informacija yra gerokai tikslesnė. Be to, tokie tyrimai kol kas negali būti atliekami su šviesolaidiniais spektrometrais.

Šiame skyriuje bus išanalizuota optinės biopsijos aparatūra, aptarti konkretūs jos komponentai aprašant kiekvieno iš jų paskirtį. Bus pateikta keletas alternatyvų kiekvienam komponentui, išryškinti jų taikymo optinei biopsijai privalumai bei trūkumai. Taip pat bus apžvelgiami optinio signalo registravimo būdai naudojant klasikinius bei šviesolaidinius spektrometrus, supažindinama su tam tikrais apribojimais, susijusiais su jų konstrukcija. Bus apžvelgti nuostoviosios fluorescencijos metodai nuo jų pereinant prie fluorescencijos su laikine skiriamąja geba metodų.

2.1. OPTINĖS BIOPSIJOS SCHEMA

Kad fluorescencijos metodai būtų sėkmingai taikomi diagnostiniams tyrimams, būtina išmanyti fluorescencijos dėsningumus ir diagnostinę aparatūrą. Optinė biopsija yra labai jautrus diagnostikos metodas, todėl yra daug veiksnių, kurie vienaip ar kitaip veikia fluorescencijos spektrus, ir jų nežinant galima klaidingai interpretuoti gaunamus rezultatus.

Dalis šių artefaktų yra susiję su itin sudėtingu tiriamuoju objektu – biologiniu objektu, kita dalis gali būti sąlygojama pačios diagnostinės aparatūros.



2.1 pav. Optinės biopsijos schema

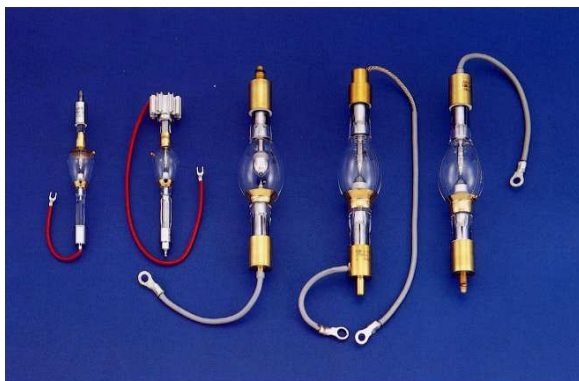
užduoties gali arba turi būti keičiamas. Šiuos komponentus gerai išmanant bei suprantant teisingai įvertinamos esamos konfigūracijos diagnostinės aparatūros galimybės bei taikymo ribos. Taigi panagrinėsime kiekvieną komponentą.

2.2. ŠVIESOS ŠALTINIAI

Norint užregistruoti bet kokio tiriamojo objekto fluorescencinį atsaką, pirmiausia reikia sužadinti jame esančias fluorescuojančias molekules. Tai padaryti galima įvairiais būdais, tačiau optinėje biopsijoje tam naudojama šviesa. Atliekant optinę biopsiją, registruojant fluorescencijos spektrą, paties šviesos šaltinio spinduliuotės intensyvumo pasiskirstymas nėra svarbus, nes šiuo atveju audinio atsakui (spektrui) sukelti naudojamas tik vienas bangos ilgis. Svarbu tik, kad viso tyrimo metu intensyvumas nekistų. Tačiau, jei optinės biopsijos metu yra registruojamas fluorescencijos žadinimo spektras, intensyvumo pasiskirstymas tampa ypač svarbus ir į jį turi būti atsižvelgiama pateikiant rezultatus. Visi naujausi prietaisai dažniausiai tai daro automatiškai ir dirbančiam nieko koreguoti nereikia. Šiuo metu, sparčiai vystantis technologijoms, priklausomai nuo pasirinkto tikslo bei užduoties, fluorescencijos žadinimui galima rinktis įvairių tipų šviesos šaltinius. Išskirsime tris pagrindinius šiuo metu optinei biopsijai naudojamus šviesos šaltinių tipus: lempas, lazerius ir šviesą emituojančius diodus (angl. *LED*).

2.2.1 Lempas

Pirmiausia šiam tikslui buvo pradėtos taikyti įvairių tipų lempos (2.2 pav.), tačiau

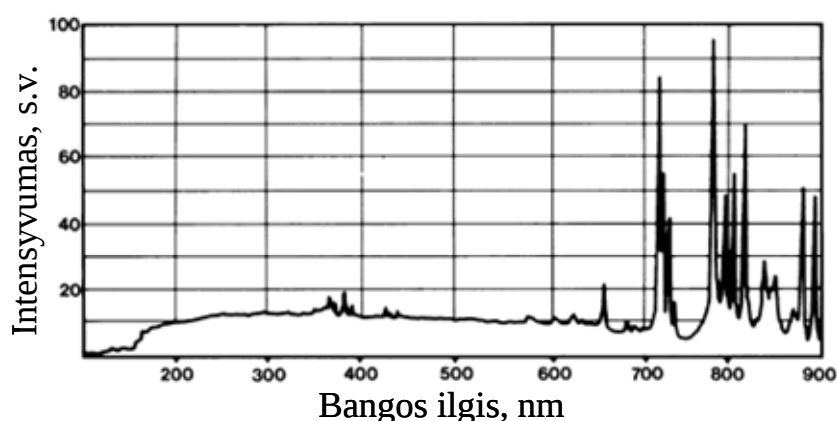


2.2 pav. Įvairių tipų aukšto slėgio lempos

dabar tokio tipo šviesos šaltinius dažniausiai galima aptikti tik labai sudėtinguose, plataus panaudojimo spektrometruose. Jų privalumas – platus emituojamos šviesos diapazonas. Kadangi tiriant biologinį objektą labai svarbu tiksliai parinkti žadinančiosios spinduliuotės bangos ilgį, kuris įvairių

tirimų metu gali būti vis kitoks, toks pasirinkimas atrodo tinkamiausias. Tačiau kartais fluorescencijos žadinimui, ypač siekiant sužadinti gilesnius sluoksnius, reikia didelių intensyvumų ir tai įgyvendinti naudojant lempas yra sudėtinga, o kartais ir neįmanoma. Be to, lempų naudojimas daro sudėtingesnę žadinimo–surinkimo sistemą, čia be spinduliuotės nuvedimo iki audinio bei fluorescencijos surinkimo sistemos papildomai turi būti naudojamas spinduliuotės spektrinės sudėties modifikavimo įrenginys. Tai yra dar vienas komponentas, kuris daro diagnostikos sistemą sudėtingesnę.

Paminėsime keletą šiuo metu populiariausių lempų. Dažniausiai šiuo metu yra naudojamos aukšto slėgio **kсенono (Xe) lempos**. Jų privalumas – platus, gana tolygus emituojamos šviesos diapazonas – nuo 250 nm iki 750 nm (2.3 pav.). Dėl kvarcinio apvalkalo



2.3 pav. Ksenono lempos spektras

šios lempos nespinduliuoja trumpesnių nei 250 nm bangų spinduliuotės, tačiau spektre esanti UV srities spinduliuotė gali negrįžtamai pažeisti akis, todėl reikia vengti žiūrėti į veikiančią ksenono lempą. Daugelis

kсенono lempų yra laikomos beozonėmis, tai yra veikdamos jos nesukuria aplinkoje ozono. Ksenono lempų veikimo trukmė yra maždaug 2000 valandų. Šios lempos yra gaminamos su specialiais korpusais (2.4 pav.), nes pačios lemputės yra užpildytos aukšto slėgio (~ 10 atm) dujomis ir dėl to atsiranda sprogo rizika. Šių lempų maitinimo šaltiniai taip pat gali kelti

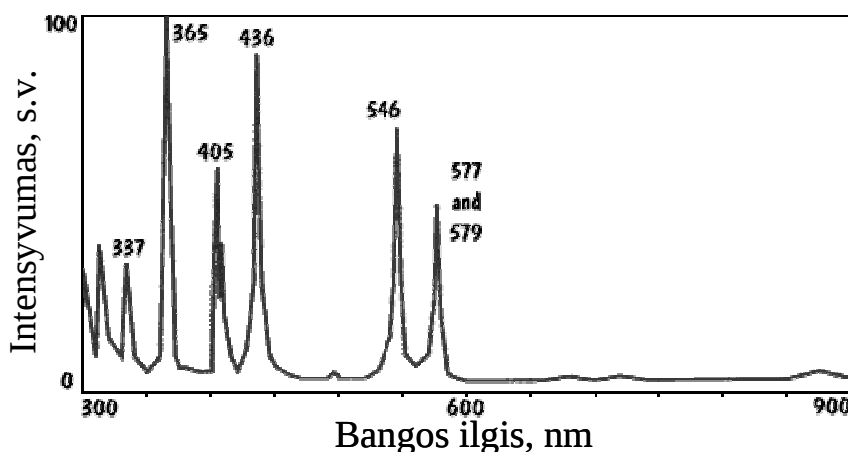


2.4 pav. Hamamatsu Xe lempa ir maitinimo blokas

pavojų. Veikimo metu jie kuria 25 A srovę esant 20 V įtampai (450 W galimumo lempai), o lempos įjungimo momentu yra generuojami 20–40 kV impulsai. Tokia įtampa lengvai prasiskverbia per odą, o vėliau tekanti stipri srovė gali būti mirtina. Reikia nepamiršti, kad ksenono lempa, kaip ir daugelis kitų, spinduliuoja labai daug infraraudonųjų spindulių, kitaip tariant,

smarkiai kaista. Taigi naudojant šias lempas reikia imtis atitinkamų saugumo priemonių, o taikant jų spinduliuotę tiesiogiai, be spektrinės sudėties modifikavimo įrenginių, siekiant išvengti tiriamosios vietos nudegimų, reikia naudoti šilumą absorbuojančius filtrus.

Aukšto slėgio gyvsidabrio (Hg) lempos. Savo paskirtimi ir veikimu gyvsidabrio lempos yra panašios į ksenono lempas. Hg lempų spinduliuotė yra intensyvesnė nei ksenono, tačiau ji sukoncentruota į gana siauras, gyvsidabriui būdingas linijas (2.5 pav.). Taigi, jei fluorescencijos žadinimui yra tinkamos gyvsidabrio emituojamos linijos, dėl didesnio



2.5 pav. Gyvsidabrio lempos spektras

spinduliuotės intensyvumo geriau yra naudoti šį šviesos šaltinį. Egzistuoja ir žemo slėgio gyvsidabrio lempos. Jos sverbios tuo, kad jų emituojamos linijos yra ypač siauros, todėl jos daugiausiai naudojamos kalibravimo tikslais.

Taip pat yra galimas abiejų anksčiau minėtų lempų derinys. Tai yra vadinamosios gyvsidabrio–ksenono (Hg–Xe) lempos. Jų privalumas yra tas, kad dėl esančio jose Hg yra gaunamas didesnis intensyvumas UV srityje nei veikiant Xe lempoms, o Xe sukuria didesnę intensyvumą tarp Hg linijų.

Kvarco-volframo halogeninės (QTH) lempos. Šių lempų privalumas – intensyvus ir tolygus spinduliavimo spektras regimojoje ir infraraudonojoje srityje. Anksčiau jos buvo mažai naudojamos, nes netiko UV spinduliuotę sugeriančioms molekulėms sužadinti, tačiau

padidėjus susidomėjimui raudonoje bei infraraudonojoje srityse sugeriančiais fluoroformais šios lempos yra labai tinkamos.

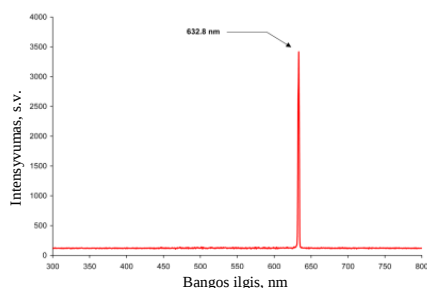
Visi šie išvardyti šviesos šaltiniai daugiausia yra naudojami nuostoviosios optinės biopsijos tikslams, nes lempomis labai sunku išgauti trumpus impulsus ar moduluoti jų intensyvumą, reikalingą laikinės skyros matavimams. Egzistuoja impulsinės lempos, generuojančios nanosekundžių trukmės impulsus, tačiau jų spinduliuotės intensyvumas yra per silpnas nuostoviesiems matavimams atlikti. Taip pat yra galimas ir intensyvumo moduliavimas, tačiau tai yra atliekama naudojant išorinį moduliatorių, kuris žadinimo sistemą padaro dar sudėtingesnę. Taigi laikinės skyros matavimams šiuo metu patogiau bei ekonomiškiau yra naudoti kitų tipų impulsinius šviesos šaltinius.

2.2.2 Lazeriniai šviesos šaltiniai

Pastaruoju metu, labai išpopuliarėjus lazeriams, jie vis dažniau yra taikomi ir



2.6 pav. Įvairių bangos ilgių lazeriniai diodai



2.7 pav. He-Ne lazerio emisijos spektras

medicinoje. Kalbant apie šio tipo šviesos šaltinių panaudojimą optinės biopsijos tikslams pirmiausia turimi galvoje puslaidininkiniai lazeriai (2.6 pav.). Kito tipo lazerius naudoti nėra tikslinga dėl jų dydžio ir sudėtingumo. Lazeriniai šviesos šaltiniai pirmiausia pasižymi mažu emituojamos spinduliuotės spektro pločiu – jų spinduliuotė yra monochromatinė (2.7 pav.). Šiuo atveju, kitaip nei lempoms, nereikia jokios spinduliuotės spektrinės

sudėties modifikavimo sistemos. Taip pat nekuriama pašalinė infraraudonoji spinduliuotė, todėl nespinduliuojama šiluma, tad net taikant šią spinduliuotę, tiesiogiai nereikia šilumą sugeriančių filtrų. Kitas privalumas – didelė spinduliuotės galia. Šiuo metu kuriamų puslaidininkinių lazerių galios netgi viršija optinei biopsijai atlikti reikalingas galias. Gal kiek prastesnė ultravioletinių lazerių

panaudojimo situacija. Dar viena savybė, lazerinius šviesos šaltinius išskirianti iš visų kitų

šviesos šaltinių, yra itin maža spindulio skėstis. Tai yra labai svarbi ir patogi savybė, kai šviesos šaltinio spinduliuotę reikia suvesti į šviesolaidį. Optinės biopsijos taikymui, registruojant biologinių audinių fluorescencijos spektrus, labai dažnai yra naudojamos šviesolaidinės sistemos, ir spinduliuotės įvedimas į šviesolaidį yra labai svarbus etapas siekiant neprarasti žadinančiosios spinduliuotės galios bei supaprastinti ar minimizuoti pačią optinės biopsijos sistemą. Be to, puslaidininkiniai lazeriai puikiai veikia impulsiniu režimu ir gali būti naudojami optinei biopsijai su laikine skiriamąja geba.

Deja, lazeriniai diodai kol kas yra gana brangūs. Žinant, kad lazeris spinduliuoja tik labai siauros spektrinės srities šviesą ir kad konkretus lazeris gali būti taikomas tik jo spinduliuojamos šviesos srityje sugertą turinčių molekulių sužadinimui, norint atlikti kito tipo audinių diagnostiką ar kitų funkcijų tyrimą, dažnai tenka pirkti kitokio bangos ilgio lazerį. Tad, nors pagal savo charakteristikas optinei biopsijai lazeris yra patogiausias šviesos šaltinis, kol kas yra brangu susirinkti visą lazerių rinkinį, apimančią spektrinę sritį nuo 400 nm iki 700 nm.

2.2.3 Šviesą emituojantys diodai (LED)

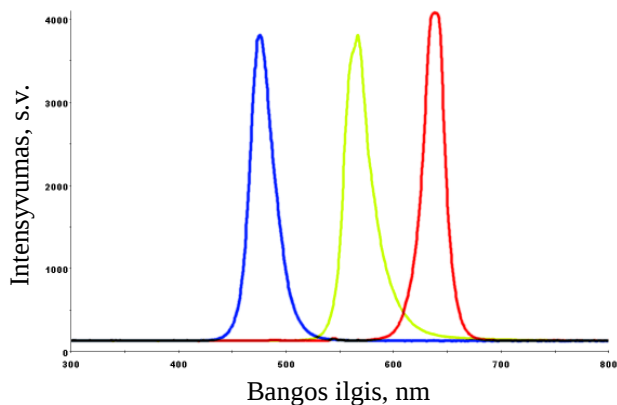
Kaip alternatyva lempoms bei lazeriams, yra naudojami šviesą emituojantys diodai



2.8 pav. Įvairių tipų, formų bei galingumo šviesos diodai

(2.8 pav.). Didžiausias jų privalumas yra palyginti nedidelė kaina, o didžiausias trūkumas, kurį šiuo metu labai intensyviai mėginama pašalinti, – nepakankamas tam tikrų bangos ilgių srities, konkrečiai ultravioletinės, galingumas. Iš esmės šviesos diodai yra tarpinis ir šiuo metu turbūt patogiausias fluorescencijos

žadinimo šaltinis iš visų trijų minėtų šviesos šaltinių tipų. Jų emituojamos šviesos spektras (2.9 pav.) yra platesnis nei lazerių, tačiau daug siauresnis nei lempų, todėl dažnai užtenka tik primityvių spektrinės sudėties modifikavimo įrenginių. Jie taip pat nespinduliuoja pašalinių infraraudonųjų spindulių, todėl nelieka papildomos šilumos ir nudeginimo problemų. Dažnai šviesos diodų spinduliuotė jau yra iš dalies fokusuota, todėl jos suvedimas į šviesolaidį taip pat yra gerokai paprastesnis ir patiriama mažesnių nuostolių. Kitos savybės, kurios daro juos patrauklius naudoti, yra mažas jų dydis bei, skirtingai nei lazerinių diodų, paprastas valdymo blokas. Šiuo metu parduodamų šviesos diodų spektrinių diapazonų gama siekia nuo mažiau nei 300 nm iki kelių mikronų, o galia – nuo kelių milivatų iki vatų. Paprastai optinei biopsijai



2.9 pav. Šviesos diodų emisijos spektrai

pakanka 10–20 mW galingumo šviesos šaltinio, tačiau tam tikrais atvejais gali prireikti ir daugiau nei 50 mW.

Šviesos diodai gali būti naudojami tiek nuostoviems, tiek matavimams su laikine skyra. Jie gali veikti impulsiniu režimu (pasiekama impulsų trukmė iki kelių šimtų

pikosekundžių), o jų intensyvumas gali būti nesunkiai moduluojamas.

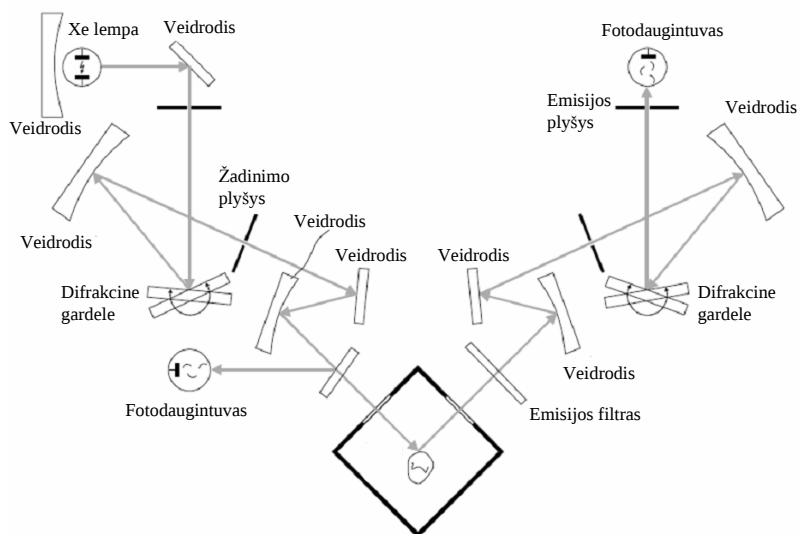
Taigi aptarėme dažniausiai optinei biopsijai taikomus šviesos šaltinius, nurodėme jų privalumus bei trūkumus. Tačiau konkretaus šviesos šaltinio fluorescencijai žadinti pasirinkimas priklauso nuo keliamos užduoties ir kitų optinės biopsijos aparatūros dalių. Kitas labai svarbus optinės biopsijos aparatūros komponentas yra fluorescencijos žadinimo–surinkimo sistema.

2.3. FLUORESCENCIJOS ŽADINIMO–SURINKIMO SISTEMA

Fluorescencijos žadinimo–surinkimo sistemos paskirtis yra nuvesti šviesos šaltinio spinduliuotę iki audinio, surinkti audinio fluorescenciją ir perduoti į detektorius. Šiuo metu yra naudojamos dviejų tipų žadinimo–surinkimo sistemos: spindulinė ir šviesolaidinė. Tam tikrais atvejais, siekiant geresnio rezultato, šios abi sistemos gali būti sujungiamos. Į fluorescencijos žadinimo–surinkimo sistemą taip pat įeina ir spektrinės sudėties modifikavimo sistema. Priklausomai nuo pasirinkto šviesos šaltinio bei keliamų uždavinių, žadinančiosios spinduliuotės kelyje ši sistema gali būti ir nereikalinga, tačiau iš audinio surinktos spinduliuotės kelyje tokia sistema yra būtina. Prieš patekdama į audinį žadinančioji spinduliuotė yra stipriai išsklaidoma, todėl didelė jos dalis kartu su audinio fluorescencija patenka į detektorius. Į detektorius patekęs išsklaidytos žadinančiosios spinduliuotės intensyvumas yra daug didesnis nei naudingą informaciją nešančio fluorescencijos signalo, todėl detektoriui sunku žadinančiosios spinduliuotės fone užregistruoti palyginti silpną fluorescencijos signalą. Taigi fluorescencijos surinkimo kanale reikia spektrinės sudėties modifikavimo sistemos, galinčios atskirti žadinančiąją spinduliuotę ir neleisti jos į detektorius. Tokios sistemos veikimas pagrįstas tuo, kad tik dalis žadinančiosios spinduliuotės fotonų energijos yra paverčiama fluorescencija, kita dalis yra prarandama šilumos pavidalu molekulių viduje vykstančiuose procesuose, todėl fluorescencija visada yra matoma ilgesnių bangų

2.3.1 Spindulinė žadinimo–surinkimo sistema

dėl plataus šios lempos emisijos spektro ir galimybės keisti žadinimo bangos ilgį. Tačiau lazerių taikymas spindulinėje sistemoje būtų didelis pranašumas, nes jų spinduliuotės skėstis yra labai maža ir ją pasiekti tiriamąjį objektą reikia labai mažai papildomų komponentų. Be to, naudojant lazerį, nereikia papildomos spinduliuotės spektrinės sudėties

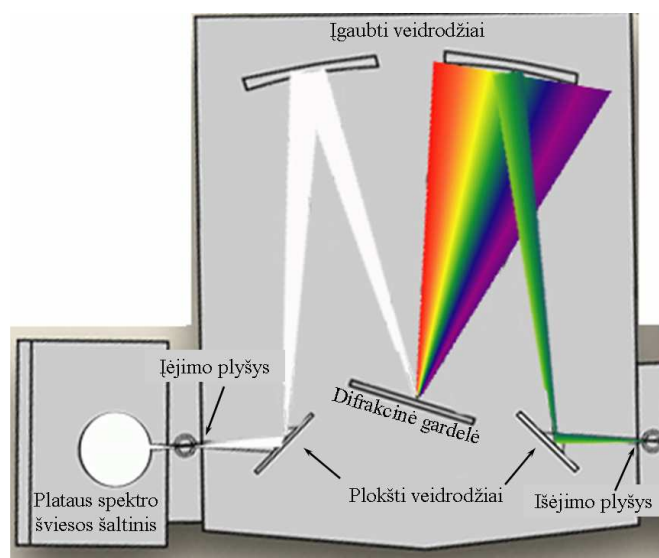


2.11 pav. Danties tyrimui naudojama spindulinė sistema

modifikavimo sistemos. Fluorescencija spindulinėje sistemoje taip pat yra renkama tam tikru atstumu nuo audinio ir yra perduodama į detektorių. Šios spinduliuotės kelyje jau yra reikalingas spektrinės sudėties modifikavimo įrenginys, kuris atskirtų išsklaidytą žadinančiąją spinduliuotę nuo audinio fluorescencijos. Spindulinėse sistemose tam tikslui dažniausiai yra naudojami monochromatoriai. Monochromatorius yra vienas iš optinės biopsijos sistemos elementų, kurie gali veikti registruojamą audinio fluorescencijos spektrą, todėl pakalbėsime apie jį plačiau.

2.3.1.1 Monochromatorius

Monochromatoriaus paskirtis yra iš plataus spinduliuotės spektro išrinkti



2.12 pav. Plokščiagardelinis monochromatorius

reikiamos bangos ilgio (spalvos) šviesą (2.12 pav.). Tai gali būti atlikta panaudojant difrakcines gardeles arba prizmes.

Šiuolaikiniai monochromatoriai dažniausiai yra gaminami su difrakcinėmis gardelėmis, todėl tokio tipo spinduliuotės spektrinės sudėties modifikavimo sistemos

vadinamos gardelinėmis. Pagrindiniai monochromatorių parametrai yra skiriamoji geba, pralaidumo efektyvumas ir pašalinės šviesos kiekis (šviesos kiekis už pasirinktos spektrinės srities (spalvos) ribų). Renkantis monochromatorių optinei biopsijai visų

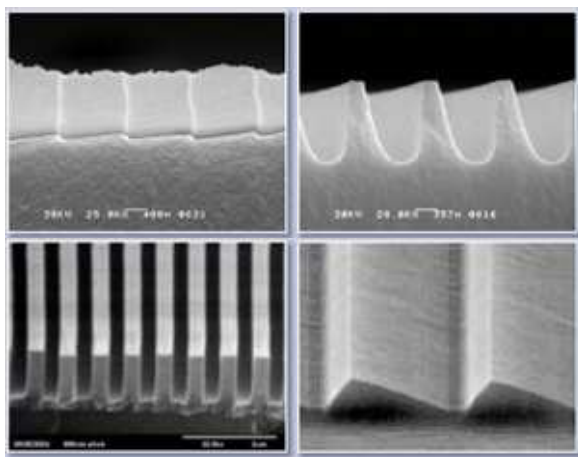


2.13 pav. Difrakcinė gardelė

pirma reikia atsižvelgti į tai, kad signalai dažnai yra labai silpni, todėl monochromatorius turi turėti kuo didesnę pralaidumo efektyvumą. Kitas parametras, kuris taip pat yra svarbus, tai mažas pašalinės šviesos kiekis; taip bus išvengiama, kad išsklaidyta šviesa nepatektų į detektorių. Paskutinis parametras, skiriamoji geba, šiuo atveju nėra toks svarbus, nes

biologiniuose audiniuose esančių pigmentų fluorescencijos spektrai nėra labai siauri. Monochromatorių skiriamąją gebą nulemia difrakcinė gardelė (2.13 pav.), o konkrečiau – difrakcinėje gardelėje esančių rėžių skaičius milimetre. Šiuo metu gaminamos gardelės, kurios turi nuo kelių šimtų iki 6000 rėžių milimetre. Monochromatoriaus skiriamoji geba taip pat gali būti keičiama didinant arba mažinant spinduliuotės įėjimo bei išėjimo iš monochromatoriaus plyšio pločius. Didesni plyšiai smarkiai padidina registruojamo signalo intensyvumą, tačiau pablogina skiriamąją gebą, ir atvirkščiai – mažesni plyšiai pagerina skiriamąją gebą, tačiau smarkiai krinta registruojamas intensyvumas.

Pagrindinis monochromatoriaus elementas, difrakcinė gardelė, gali būti plokščia arba įgaubta. Plokščios gardelės dažniausiai yra gaminamos mechaniškai raižant lygų būsimos gardelės paviršių ir dėl to gali atsirasti tam tikrų netikslumų įvairiose jos vietose, tuo tarpu įgaubtos gardelės dažniausiai yra gaminamos holografijos metodu. Gamybos metu atsiradę netikslumai kaip tik labiausiai ir nulemia monochromatoriaus pašalinės šviesos perdavimo savybes bei vaizdų „šmėklų“ atsiradimą. Jie pasireiškia kaip kitos spalvos arba baltos šviesos dėmės monochromatoriaus viduje. Kad šias dėmes būtų galima panaikinti, monochromatoriaus vidinės sienelės yra padengiamos šviesą sugeriančia medžiaga. Monochromatoriuose su įgaubtomis gardelėmis yra mažiau šviesą atspindinčių elementų, nes įgaubta gardelė atlieka ir šviesos išskaidymo į spalvas funkciją, ir fokusavimo funkciją. Taip pat labai svarbu atkreipti dėmesį į tai, kuriai spektrinei sričiai yra optimizuotas monochromatorius. Tai nulemia difrakcinės gardelės griovelio formą (2.14 pav.). Pavyzdžiui, vienokios formos grioveliai labiausiai tinka ultravioletinei spinduliuotei, o kitokios –



2.14 pav. Įvairių formų difrakcinių gardelių grioveliai

regimosios šviesos ar infraraudonosios srities spinduliuotei. Monochromatorių tinkamumą tam tikrai sričiai apibūdina pralaidumo efektyvumo kreivė. Ši kreivė parodo, kiek procentų įeinančios šviesos praeina monochromatorių. Monochromatorių su plokščiomis (mechaniškai gaminamomis) gardelėmis pralaidumas būna efektyvesnis nei su holografinėmis,

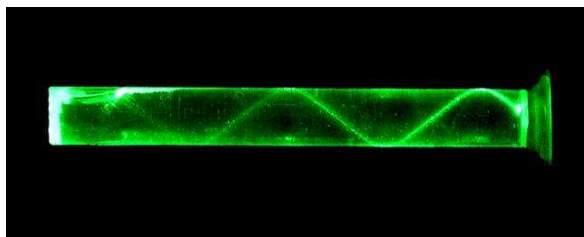
tačiau jų efektyvus pralaidumo sritis yra siauresnė. Monochromatorių efektyvumas taip pat yra nevienodas skirtingos poliarizacijos spinduliuotei. Kadangi molekulių fluorescencija yra iš dalies poliarizuota, tai registruojamame spektre matomas intensyvumo pasiskirstymas gali būti paveiktas ir šios monochromatoriaus savybės. Tačiau šie reiškiniai labiausiai pasireiškia atliekant poliarizacinius matavimus. Nepaisant visų išvardytų trūkumų, kurie išryškėja tik dirbant labai sudėtingomis sistemomis, monochromatorius kol kas yra geriausia bei universaliausia, tačiau ir sudėtingiausia, spinduliuotės spektrinės sudėties modifikavimo sistema.

Taigi grįžtame prie spindulinės žadinimo–registravimo sistemos. Tokios sistemos privalumas tas, kad tai yra nekontaktinis metodas, tačiau kartu tai yra stacionari sistema, reikalaujanti labai tikslaus optinių elementų išdėstymo. Dažniausiai tokia sistema yra sudėtinguose prietaisuose, nes kitokios spinduliuotės perdavimo sistemos (pavyzdžiui, šviesolaidžiai) padaro tam tikrų nuostolių bei netikslumų. Spindulinės žadinimo–surinkimo sistemos taikymą riboja tai, kad, norint atlikti optinę biopsiją ar pasirinkti kitą audinio vietą, kurioje bus atliekama optinė biopsija, yra keičiama tiriamojo objekto (ranka, koja, kaklas, veidas ir t. t.) padėtis. Dėl to dažnai daug paprasčiau ir saugiau yra naudoti šviesolaidines sistemas.

2.3.2. Šviesolaidinė žadinimo–surinkimo sistema

Siekiant supaprastinti optinės biopsijos aparatūrą, pirmiausia reikia supaprastinti fluorescencijos žadinimo–surinkimo sistemą. Tai yra ta aparatūros dalis, kuri turėtų būti paslankiausia, todėl šiam tikslui buvo pradėti naudoti šviesolaidžiai. Norint geriau suprasti šviesolaidinių sistemų savybes bei taikymo apribojimus, būtina susipažinti su šviesolaidžių sandara bei išsiaiškinti, kokiomis sąlygomis šviesa sklinda šviesolaidžiais.

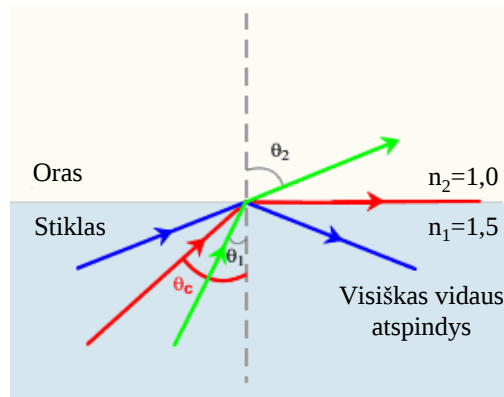
2.3.2.1. Šviesolaidžiai. Šviesolaidžių analogija galime laikyti paprasčiausius elektros laidus, kuriais teka elektra. Šviesolaidžiai netgi savo forma labai primena



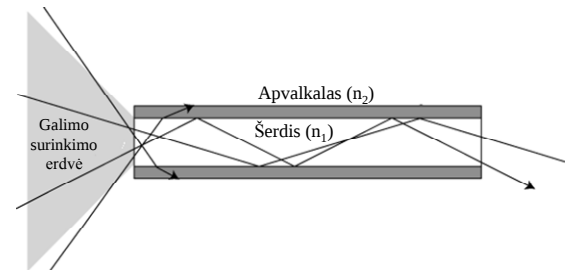
2.15 pav. Visiškas vidaus atspindys vandeny užpildytame stikliniame vamzdyje

laidus, kuriais „teka“ šviesa. Tačiau, skirtingai nei elektros, šviesos perdavimui reikia kur kas sudėtingesnių sąlygų. Taigi, kas nulemia, kad šviesa gali nusklisti šviesolaidžiu didžiulius atstumus ir beveik be nuostolių neišidama

iš jo? Tai nulemia specifinė optinio kabelio struktūra. Šviesos sklidimas šviesolaidžiu



2.16 pav. Visiškas vidaus atspindys



2.17 pav. Kampai, kuriais į šviesolaidį įvesti spinduliai patirs visišką vidaus atspindį – galės sklirti šviesolaidžiu

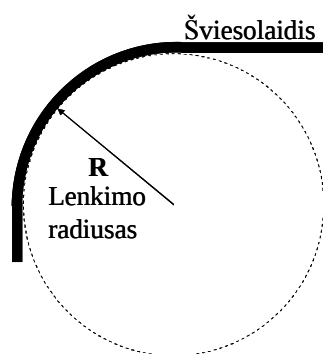
remiasi visiško šviesos atspindžio dėsniu. Visiškas atspindys (2.15 pav.) atsiranda dviejų skaidrių medžiagų skiriamosioje zonoje, jei šviesos spindulys į ją krinta iš optiškai tankesnės medžiagos ir jei kritimo kampas α didesnis už kritinį kampą. Kritinis kampas – tai šviesos kritimo kampas, kuriam esant vyksta visiškas vidaus atspindys (2.16 pav.). Šis kampas apskaičiuojamas: $\sin \alpha_{kritinis} = \frac{n_2}{n_1}$. Šiuo atveju

spindulys neišeis iš medžiagos ir jo optinė energija bus visiškai atspindėta. Iš principo visiškas vidaus atspindys vyksta be energijos nuostolių, tačiau realiai šviesa prasiskverbia kelių bangos ilgių atstumu į optiškai retesnę medžiagą. Tai rodo, kad šviesolaidžio skersmuo negali būti neribotai mažas, jis priklauso nuo perduodamos šviesos bangos ilgio. Kad būtų visiškas vidaus atspindys, turi būti tenkinama tokia sąlyga: $n_{centr} > n_{dang}$. Dangalo storis turi būti nuo 10 iki 20 kartų didesnis už bangos ilgį. Kritinis visiško vidaus atspindžio kampas riboja spindulių perdavimą: tik mažesniu nei tinkamu spindulių įvedimo kampu įvesti spinduliai bus perduodami šviesolaidžiu, visi kiti praras energiją ir bus labai susilpninti (2.17 pav.). Praktikoje yra nurodomas ne šis kampas, o šviesolaidžio skaitinė apertūra (NA), kuri yra lygi:

$$NA = n \sin \theta_{kr} = \sqrt{n_1^2 - n_2^2}.$$

Taigi, kuo didesnė skaitinė apertūra, tuo didesnis tinkamas

spindulių įvedimo kampas ir galimo surinkimo erdvė. Sklisdamas šviesolaidžiu spindulys silpsta ne vien tik dėl absorbcijos ar išsklaidymo, bet ir dėl energijos praradimo sulenkimuose. Šviesolaidžio maksimalaus sulenkimo radiusas R (2.18 pav.) yra vienas iš parametrų, kurių būtina žinoti dirbant su šviesolaidžiais ir siekiant išvengti negrįžtamų šviesolaidžių pažeidimų. Įprastinių šviesolaidžių pralaidumas smarkiai krinta sulenkus juos didesniu nei 30 mm radiusu, tačiau pastaruoju metu jau sukurti



2.18 pav. Šviesolaidžio lenkimo radiusas

šviesolaidžiai, kuriuos galima sulenkti net 7,5 mm radiusu. Tai yra ilgalaikiai sulenkimo radiusai, tačiau trumpam šviesolaidį be didesnių pažeidimų galima sulenkti beveik du kartus mažesniu radiusu. Pasiekus ribinį radiusą, praradimai staiga ima smarkiai didėti, be to, kuo storesnis šviesolaidis, tuo greičiau jie pasireiškia (užtenka didesnio radiuso). Šiuo atžvilgiu plonesni šviesolaidžiai yra pranašesni už storesnius. Jei šviesolaidžiai yra vienodo storio, tai leidžiamo sulenkimo radiusą nulemia jo skaitinė apertūra. Kuo didesnė skaitinė apertūra, tuo šviesolaidis gali būti daugiau sulenkiamas. Didesnė skaitinė apertūra taip pat nulemia ir kitas šviesolaidžio savybes, tokias kaip didesnį tinkamą spindulių įvedimo kampą.

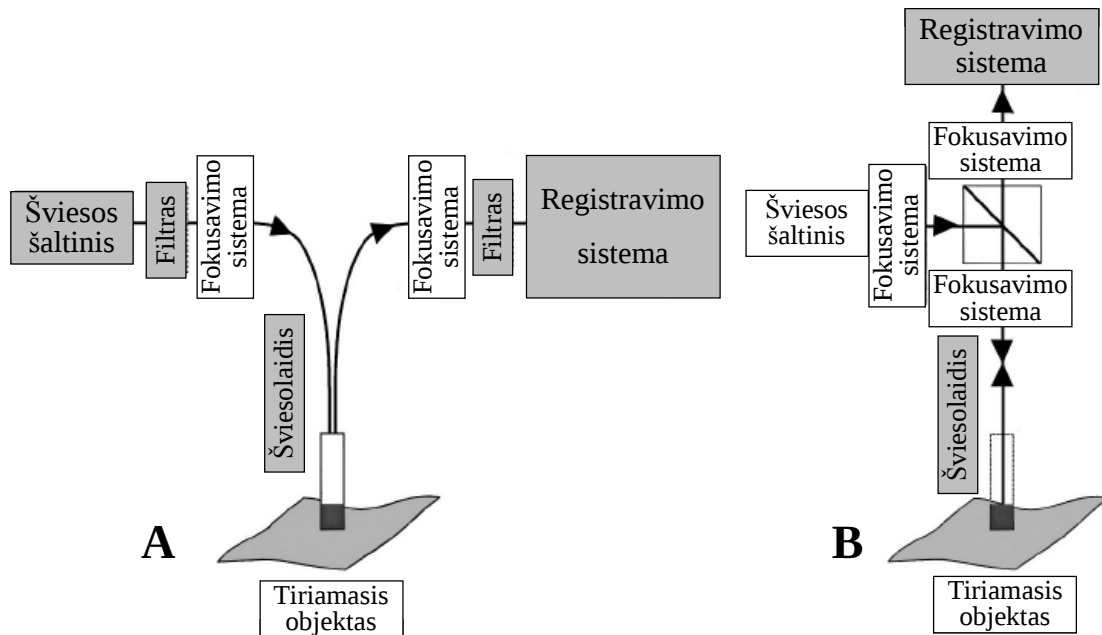
Renkantis šviesolaidžius optinei biopsijai svarbu atsižvelgti, kokios spektrinės srities spinduliuotė sklis šiais šviesolaidžiais, nes skirtingoms sritims reikalingos ir skirtingos medžiagos, iš kurių gaminamas šviesolaidis. Galima išskirti tris spektrines sritis – ultravioletinė sritis ($\lambda < 400$ nm), regimosios šviesos sritis (400 nm–700 nm) ir infraraudonoji sritis ($\lambda > 700$ nm). Naudojant tai sričiai netinkamų medžiagų šviesolaidį daromos signalo klaidos arba net galima sugadinti ir patį šviesolaidį. Pavyzdžiui, tam tikros medžiagos, iš kurių daromi šviesolaidžiai, veikiamos UV spinduliuotės, fluorescuoja. Dar vienas parametras, kuris yra svarbus renkantis šviesolaidžius, yra jų skersmuo. Viena vertus, pasirinkimą riboja kita aparatūros dalis (jei šviesolaidį reikia įvesti į endoskopo ar kito prietaiso ertmę), tačiau, kita vertus, negalima rinktis ir labai plono šviesolaidžio, nes juo bus surenkama tik nedidelė dalis fluorescencijos ir bus gaunamas tik labai silpnas optinis signalas. Dažniausiai optinei biopsijai yra naudojami 50–600 μ m skersmens šviesolaidžiai. Tam tikrais atvejais, kada reikia ypač storų šviesolaidžių, yra naudojamos šviesolaidžių pynės – t. y. 100–200 μ m skersmens šviesolaidžiai yra „supakuojami“ į vieną storą pynę.

Optinėje biopsijoje spindulių perdavimui bei fluorescencijos surinkimui dažniausiai



2.19 pav. Bifurkacinis šviesolaidis

yra naudojami du atskiri šviesolaidžiai. Dėl patogumo šie du šviesolaidžiai viename gale yra sujungiami į vieną antgalį, kuris ir yra prigludžiamas prie tiriamosios vietos. Tokie šviesolaidžiai vadinami bifurkaciniais (2.19 pav.). Kartais, kai reikia labai plono šviesolaidžio, ir žadinimui, ir surinkimui yra naudojamas tas pats šviesolaidis. Tada fluorescencijos atskyrimui nuo



2.20 pav. Šviesolaidinės sistemos. A – kai žadinimui ir surinkimui naudojami atskiri šviesolaidžiai; B – kai žadinimui ir surinkimui naudojamas tas pats šviesolaidis

žadinančiosios spinduliuotės yra naudojami papildomi optiniai elementai – prizmės, dichroiniai veidrodžiai ir kt. Abi sistemos yra pavaizduotos 2.20 paveiksle. Optinei biopsijai vietoje dviejų naudojant vieną šviesolaidį, priklausomai nuo šviesolaidžio skersmens, galima gauti 1,8–4 kartus efektyvesnę sistemą, tačiau tokios sistemos optinė schema yra gerokai sudėtingesnė.

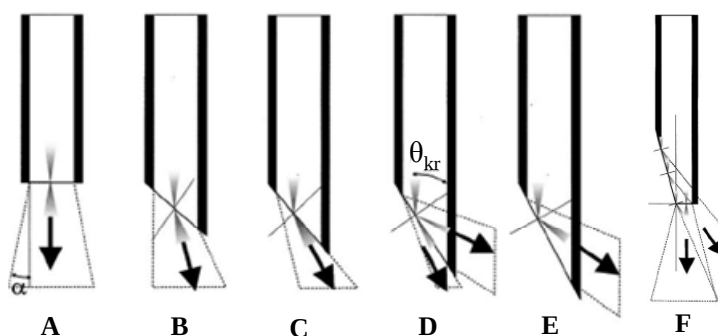
Aptartoji šviesolaidinė žadinimo–surinkimo sistema yra kontaktinė, t. y. zondas yra arba priglaudžiamas prie audinio, arba laikomas nedideliu atstumu nuo audinio, todėl naudojami šviesolaidiniai zondai turi atitikti tam tikrus saugumo reikalavimus. Kalbant apie saugumą, galima išskirti tokias potencialias grėsmes:

- **Pažaidos**, sukeltos žadinimui naudojamos spinduliuotės (tai galioja ir nespindulinei žadinimo–surinkimo sistemai). Šviesos energija, kuri saugiai gali būti naudojama optinio atsako sužadinimui, neturėtų viršyti 3 mJ/cm^2 ties 270 nm .
- **Terminio pažeidimo rizika**. Turėtų būti įvertinta audinio temperatūros padidėjimo iki pavojingos ribos rizika. Tai priklauso nuo audinio tipo ir kiekvienam audiniui ši rizika turėtų būti įvertinama atskirai.
- **Elektrošoko pavojus**. Medžiagos, iš kurių gaminami šviesolaidžiai (kvarcas, akrilas, polistirolas, silicis), yra geri elektros srovės izoliatoriai, todėl elektrošoko rizika yra minimali.
- **Klinikinis pavojus** (infekcijos įnešimas, užkrėtimas). Siekiant išvengti klinikinio pavojaus, šviesolaidinis zondas prieš kiekvieną naudojimą turi būti

dezinfekuojamas arba sterilizuojamas. Jei šviesolaidinis zondas yra vientisa optinės biopsijos sistemos dalis ir negali būti atjungiamas, galima naudoti specialius užmaunamus antgalius, kurie turi būti skaidrūs tiek žadinančiajai, tiek surenkamai spinduliutei bei atitikti tuos pačius saugumo reikalavimus, keliamus šviesolaidiniam zondui. Dezinfekuojant svarbiausia yra paties šviesolaidinio zondo atsparumas dezinfekavimo priemonėms.

- **Zondui naudojamų medžiagų kenksmingumas.** Šviesolaidžiai yra apibūdinami kaip trumpalaikio paviršinio arba išorinių kontaktų įrenginiai, todėl medžiagos, iš kurių jie yra pagaminti, turi būti ištirtos dėl citotoksiškumo, jautrinimo ar erzinimo (alerginės reakcijos) bei dėl toksiškumo, susijusio su dažnu ar ilgu naudojimu.

Priklausomai nuo tiriamojo objekto bei jo lokalizacijos – ar tai yra paviršinis darinys ir šviesolaidiniu zondų galima

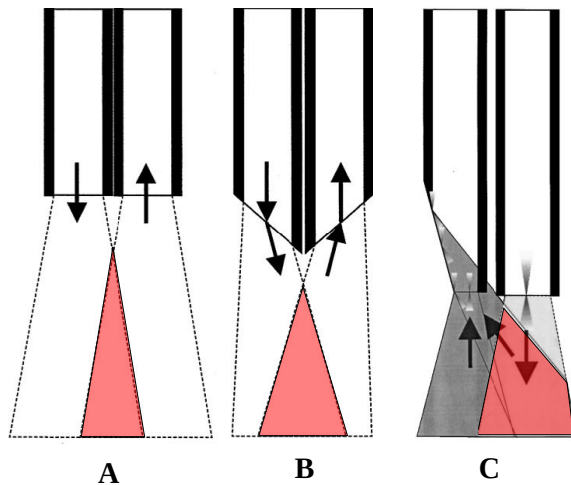


2.21 pav. Šviesolaidinių zondų antgaliai: A – bukas; B–E – nuožulnus; F – mišrus

prieiti tiesiogiai, ar tai yra vidaus organas ir šviesolaidinis zondas turi būti suderintas su esamais vidaus organų apžiūros prietaisais – endoskopais, yra galimi įvairūs šviesolaidinių zondų antgaliai. Pirmiausia antgaliai gali būti skirstomi pagal jų galo tipą:

- Antgaliai su bukais galais (2.21 A pav.). Šviesa iš šviesolaidžio sklinda tiesiai. Kokiu kampu skečiasi išėjusi šviesa, lemia šviesolaidžio skaitinė apertūra.
- Antgaliai su nuožulniais galais. Šviesa išeina pro šviesolaidžio galą, tačiau skėstis ir kryptis yra lemiamą šviesolaidžio skaitinės apertūros bei nuožulnumo kampo (2.21 B, C pav.). Pasiekus tam tikrą kritinį kampą θ_{kr} , sukeliamas visiškas šviesos atspindys ir dalis spinduliuotės iš šviesolaidžio išeina pro jo šoną (2.21 D pav.). Tokiu atveju šviesolaidžio apsauginis apvalkalas turi būti nuvalytas paliekant tik skaidrius sluoksnius. Dar padidinus nuožulnumo kampą visa šviesa išeis tik pro šviesolaidžio šoną (2.21 E pav.). Siekiant padidinti atspindį nuo nuožulniosios plokštumos, ji papildomai gali būti dengiama atspindinčia medžiaga. Taip pat yra galimybė sujungti abiejų tipų šviesolaidžio galus, taip padaromas mišraus tipo antgalis (2.21 F pav.).

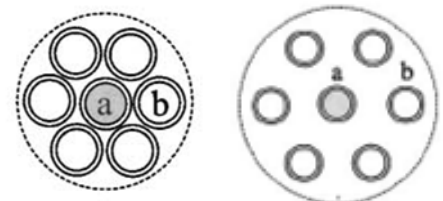
Tam tikras šviesolaidinių zondu antgalių pasirinkimas sąlygoja atitinkamas zondo



2.22 pav. Šviesolaidiniai zondai, sudaryti iš dviejų šviesolaidžių: A – abu šviesolaidžiai yra bukais galais, B – nuožulniais galais, C – vienas buku, kitas mišriu galu. Raudonai pažymėta erdvė, kur persikloja žadinimo bei surinkimo spinduliai

savybes žadinant bei surenkant fluorescenciją. Jei optinės biopsijos žadinimo–surinkimo sistemoje yra tik vienas šviesolaidis, tam beveik visada yra naudojamas buko tipo antgalis, retkarčiais – mišraus tipo. Tačiau kai žadinimo–surinkimo sistemai yra naudojami du ir daugiau šviesolaidžių, tam tikrais atvejais yra naudinga naudoti arba bukus, arba nuožulnius, arba sujungti abiejų tipų šviesolaidžių antgalius. Nuo žadinimo–surinkimo sistemos tipo priklauso ir šios sistemos savybės, pavyzdžiui, zondas, sudarytas iš dviejų nuožulnių

šviesolaidžių, yra maždaug 1,5 karto efektyvesnis nei zondas, sudarytas iš dviejų bukų šviesolaidžių. Taip yra todėl, kad apšvietimo ir surinkimo plotai persidengia daugiau (2.22 A, B pav.) ir didesnė dalis sužadintų molekulių fluorescencijos patenka į šviesolaidžių galimo surinkimo erdvę. Tačiau tūris, iš kurio nuožulniuojų zonde yra renkama informacija, yra mažesnis ir yra arčiau zondo. Dar vieno tipo zondas, kuriame fluorescencija yra surenkama netgi iš viso apšviečiamo ploto, gali būti sukonstruotas naudojant mišraus ir buko tipo antgalius (2.22 C pav.). Tokio zondo, palyginus jį su bukų antgalių zonde, efektyvumas yra didesnis nuo 6,5 iki 20

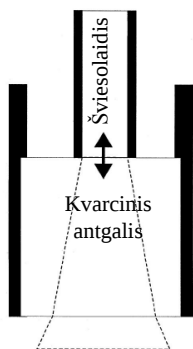


2.23 pav. Iš 7 šviesolaidžių sudarytas optinis zondas: (a) žadinimui skirtas šviesolaidis, (b) surinkimui skirti šviesolaidžiai

kartų, priklausomai nuo nuožulnumo kampo. Siekiant dar labiau padidinti optinio signalo surinkimo efektyvumą, žadinimui–surinkimui galima naudoti ne vieną šviesolaidį. Populiariausias tokio tipo zondas yra ratu išdėstyti surinkimo šviesolaidžiai aplink vieną žadinimo šviesolaidį (2.23 pav.). Surinkimo šviesolaidžiai galiausiai yra sujungiami į vieną šviesolaidį ir gaunamas tradicinis dviejų atšakų bifurkacinis šviesolaidis. Tokio zondo žadinimo šviesolaidžio apšviečiamas plotas persikloja su visų šešių aplink išdėstytų šviesolaidžių surinkimo plotais ir zondo efektyvumas būna beveik šešis kartus didesnis nei dviejų šviesolaidžių zondo. Kai reikia, centrinį šviesolaidį galima naudoti surinkimui, o

žadinimui – aplink jį išsidėsčiusius šviesolaidžius. Taip pat yra galimi įvairūs kiti tokio tipo zondo variantai – šviesolaidžiai su bukais galais, nuožulniais galais arba mišraus tipo galais, arba įvairių tipų šviesolaidžių deriniai. Reikia atkreipti dėmesį į tai, kad optinės biopsijos aparatuose fluorescencijos žadinimui ir surinkimui naudojant atskirus šviesolaidžius, kelyje iki surinkimo šviesolaidžio fluorescencijos signalas gali būti netikslus. Tai sąlygoja išspinduliuoto fotono kelyje pasitaikantys sugeriantys arba/ir sklaidantys elementai. Kuo didesnis atstumas tarp žadinimo ir surinkimo šviesolaidžių, tuo daugiau bus modifikuotas fluorescencijos signalas.

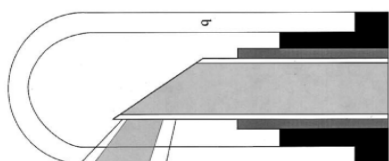
Dar vienas būdas, leidžiantis padidinti apšvietimo bei surinkimo persidengimo plotą – tai šviesolaidinį zondą nuo audinio laikyti tam tikru atstumu, kai šis plotas yra didžiausias. 2.22 paveiksle matyti, kad, tolstant nuo šviesolaidžių antgalių, persidengimo plotas didėja. Praktikoje yra naudojami specialūs šviesolaidžiai su tam tikro storio kvarciniais antgaliais. Kvarcinio antgalio storis ir nulemia, koku atstumu zondas bus nutolęs nuo audinio. Tačiau



2.24 pav. Vieno šviesolaidžio sistema su kvarciniu antgaliu prieš šviesolaidį

tokiu atveju mažėja surinkimo efektyvumas $\frac{1}{d^2}$, kai d yra atstumas nuo zondo iki audinio. Buvo atlikti tokios sistemos tyrimai, kai optinei biopsijai buvo naudojama vieno šviesolaidžio sistema (2.24 pav.). Tyrimai atlikti su įvairių skersmenų šviesolaidžiais. Padidinus šviesolaidžio skersmenį nuo 0,1 mm iki 1 mm, fluorescencijos surinkimas padidėjo daugiau nei 3,5 karto, kai fluorescencija registruota prie pat audinio. Gylis, iš kurio buvo surinkta maždaug 80 % fluorescencijos signalo, priklausomai nuo skersmens, siekė nuo 0,175 mm iki 0,375 mm.

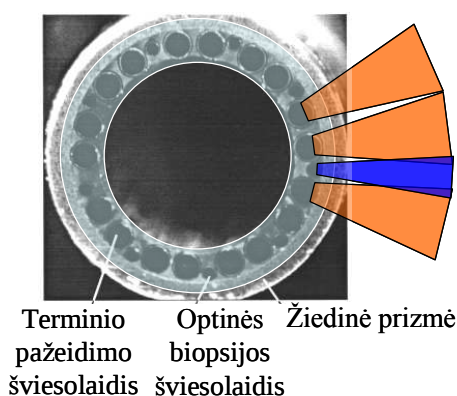
Prieš zondą įdėjus 5 mm kvarcinį antgalį, gylis, iš kurio surinkta 80 % fluorescencijos, padidėjo iki 0,425 mm, kai tuo tarpu užregistruotos fluorescencijos intensyvumas sumažėjo nuo 5 iki 20 kartų (priklusomai nuo šviesolaidžio skersmens). Taigi zondą priglaidus tiesiai prie audinio užregistruojamas didesnis fluorescencijos intensyvumas, tačiau tiriamasis gylis yra mažesnis negu naudojant zondą su papildomu kvarciniu stikliuku.



2.25 pav. Šoninis zondas. Šviesolaidžio antgalis yra uždengtas stikliniu gaubtu

Panašų efektą galima pasiekti ir keičiant šviesolaidžio skaitinę apertūrą, tada nereikia naudoti papildomų kvarcinių antgalių.

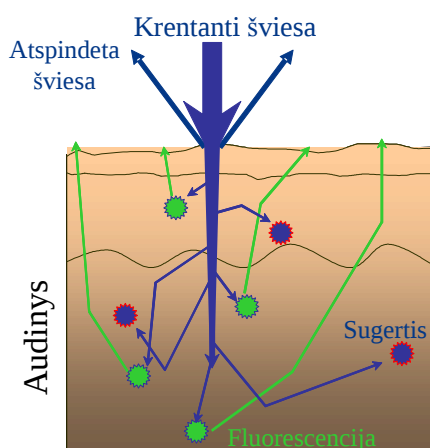
Tam tikrais atvejais labai patogiu naudoti nuožulnaus tipo antgalių zondus. Jie yra ypač patogūs, kai tiriamoji vieta yra šviesolaidžio šone, tada netgi nekraipant šviesolaidžio galima apšviesti bandinį bei užregistruoti jo fluorescenciją. Pavyzdžiui, tiriant kraujagyslių sienelės, gimdos kaklelį ir kt. Tokie zondai vadinami šoniniais zondais (2.25 pav). Šoninių zondų yra įvairių tipų: vieno šviesolaidžio, dviejų šviesolaidžių bei ratu išdėstytų daugelio šviesolaidžių. Fluorescencijos žadinimui bei surinkimui naudojant skirtingus šviesolaidžius, juos reikia suderinti taip, kad jų apšvietimo/surinkimo plotai persidengtų – pasukti juos tam tikru kampu vienas kito atžvilgiu. Kartais, kai naudojama ratu išdėstytų šviesolaidžių sistema, yra naudojami buko tipo šviesolaidžiai ir zondo gale dedama speciali žiedinė prizmė, kuri nukreipia spindulius į šoną. 2.26 paveiksle pavaizduotas zondas, kuriuo atliekami terminiai



2.26 pav. Šoninis zondas. Ratu išdėstytais terminio pažeidimo šviesolaidžiais yra atliekama abliacija, o tarpe jų esančiais, mažesniais, atliekama diagnostika

pažeidimai. Tarpuose tarp abliacijai skirtų šviesolaidžių, yra įterpti diagnostikos šviesolaidžiai, kuriais galima atlikti optinę biopsiją. Taip gaunamas zondas, kuriuo vienu metu visame tiriamos ertmės vidiniame paviršiuje galima ir gydyti, ir stebėti gydymo eigą.

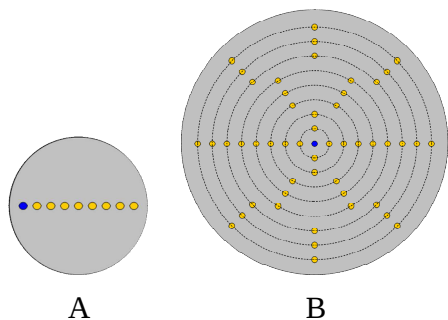
Paprastais bifurkaciniais šviesolaidžiais registruojama fluorescencija yra mišinys iš įvairių sluoksnių ateinančių signalų, kuriuos sukelia sugerta spinduliuotė. Keičiant žadinimo bangos ilgį galima pasiekti didesnę šviesos įsiskverbimo gylį, kol ji bus visiškai sugerta, tačiau dėl specifinių audinio savybių (audinys stipriai sugeria bei sklaido spinduliuotę) didžioji fluorescencijos dalis bus kilusi iš audinio paviršiaus. Tuo tarpu daugelio ligų židiniai arba navikai kartais vystosi giliau audinyje ir klasikiniams fluorescencijos metodais nepavyksta jų aptikti ar nustatyti tikslios buvimo vietos. Remiantis sklaidos teorija, paviršiuje išfluorescuoti fotonai yra veikiami sklaidos ir todėl jie sklinda tiesiai į paviršių – šalia žadinimo šviesolaidžio (2.27 pav.). Tuo tarpu išfluorescuoti fotonai savo kelyje iki paviršiaus sutinka kur kas daugiau sklaidančiųjų dalelių, todėl audinį



2.27 pav. Šviesos spindulių eiga audinyje

nedaug
beveik
giliau
palieka

tam tikru atstumu nuo žadinimo šviesolaidžio. Taigi surinkimo šviesolaidžiui esant šalia žadinimo arba netgi esant keliems surinkimo šviesolaidžiams, bet išdėstytiems tokiu pačiu



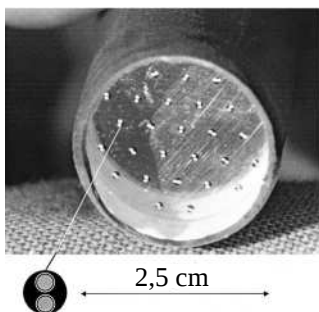
2.28 pav. Šviesolaidiniai zondai: A – daugianuotolinė sistema, sudaryta iš 1 žadinimo ir 8 surinkimo šviesolaidžių, išdėstytų 1–8 mm atstumu; B – padidėjusio jautrumo daugianuotolinė sistema

atstumu, smarkiai išsklaidyti fotonai nėra užregistruojami, taigi ir nėra gaunama informacijos iš giliai esančių sluoksnių. Tačiau, panaudojus tam tikras šviesolaidines sistemas, galinčias užregistruoti įvairiu atstumu nuo žadinančiojo šviesolaidžio išlekiančius fotonus, galima būtų gauti informaciją ir iš gilesnių audinių sluoksnių. Tokia sistema, sudaryta iš vieno fluorescencijos žadinimo šviesolaidžio ir keleto skirtingais atstumais nuo jo išdėstytų surinkimo šviesolaidžių, vadinama daugianuotoline (2.28 pav.).

Dėl tų pačių audinio optinių savybių, įgalinančių registruoti gilesnių sluoksnių fluorescenciją, į

tolimiausius šviesolaidžius, kurie daugiausiai informacijos surenka iš gilesnių sluoksnių, ateina labai mažai fotonų. Todėl buvo sukurta didesnio jautrumo daugianuotolinė sistema, kurioje, tolstant nuo žadinimo šviesolaidžio, surinkimo šviesolaidžių daugėja (2.28 B pav.). 1 ir 2 mm atstumu nuo žadinimo šviesolaidžio esančios registravimo grupės sudarytos iš 4 šviesolaidžių. 3, 4 ir 5 mm atstumais nutolusios registravimo grupės yra sudarytos iš 6 šviesolaidžių, o 6, 7 ir 8 mm atstumais esančios grupės yra sudarytos iš 8 registravimo šviesolaidžių. Taigi, tolstant nuo žadinimo šviesolaidžio, yra daugiau registravimo

šviesolaidžių, todėl užregistruojama ir daugiau fotonų, į paviršių išeinančių toliau nuo žadinimo šviesolaidžio. Būtent ši savybė ir lemia tai, kad toks zondas jautresnis fotonams iš gilesnių sluoksnių.



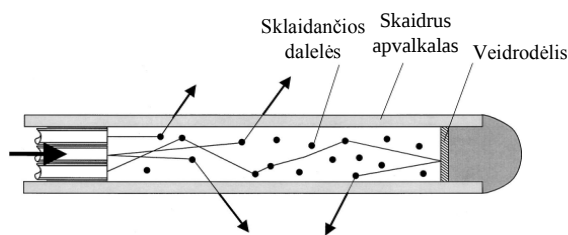
2.29 pav. Optinės biopsijos zondas, kuriame yra integruota 31 žadinimo–surinkimo sistema

Naudojant visus išvardytus šviesolaidinius zondus, informaciją vienu metu galima rinkti tik iš vienos vietos, t. y. tik iš mažo audinio tūrio. Tai yra labai naudinga, kai reikalinga informacija iš tikslios audinio vietos, tačiau dažnai atliekant biomedicininis tyrimus reikia ištirti didelius audinio paviršiaus plotus, kad būtų galima įvertinti pažeidimo laipsnį ar nustatyti pažaidų ribas. Tokiu atveju galima naudoti optinės

biopsijos zondą, kuriame yra integruota keletas žadinimo–surinkimo sistemų. Paveiksle 2.29 pateikiamas optinės biopsijos zondas, kuriame yra integruota 31 žadinimo–surinkimo sistema.

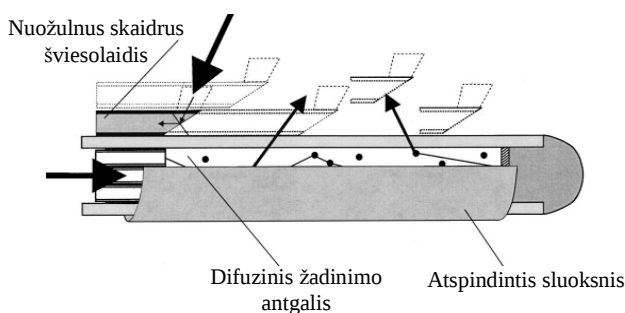
Kiekvieną sistemą sudaro vienas žadinimo ir vienas surinkimo šviesolaidis. Užregistravus šiuo zonu optinius signalus galima sudaryti audinio fluorescencinius „žemėlapius“, pagal kuriuos galima atlikti audinio fluorescencinį vaizdinimą. Šiuo metu yra sukurta sistema iš 120 žadinimo–surinkimo sistemų, tačiau, norint dar labiau padidinti tiriamų vietų skaičių, naudingiau yra naudoti spindulines žadinimo–surinkimo sistemas su audinio skenavimo galimybe.

Šviesolaidžiai labai plačiai naudojami ne tik diagnostikai, bet ir terapijos srityje, todėl labai naudinga derinti diagnostikai skirtus šviesolaidžius su terapiniais zondais. Šiuo metu labai sparčiai populiarėjančiai fotosensibilizuotai navikų terapijai yra naudojami difuziniai šviesolaidžių antgaliai, galintys homogeniškai apšviesti dideles ertmes arba didelius paviršiaus plotus. Tokie antgaliai taip pat gali būti naudojami fluorescencijos žadinimui optinės biopsijos metu. Difuziniai antgaliai yra gaminami į skaidrią terpę (pavyzdžiui, optinius klėjus) įmaišant



2.30 pav. Difuzinis antgalis

buko šviesolaidžio. Antgalio viršūnėje yra įmontuotas vėidrodėlis, kuris atspindi praėjusią (neišsklaidytą į šonus) spinduliuotę atgal į skaidančią aplinką, kur ji yra dar kartą sklaidoma, taip didinamas sklaidymo efektyvumas. Naudojant tokį difuzinį antgalį buvo pagaminta optinės biopsijos sistema, skirta įvairių kanalų tyrimui. Toks zondas vadinamas difuziniu



2.31 pav. Difuzinis diagnostinis antgalis

apšviečiamą paviršių, surinkimo šviesolaidžiai yra išdėstomi per visą sklaidančio antgalio ilgį (2.31 pav.). Taip pat gali būti naudojamas ir vienas surinkimo šviesolaidis, tada reikia, kad būtų galima keisti jo padėtį išilgai difuzinio antgalio. Kadangi ir žadinimo antgalis, ir

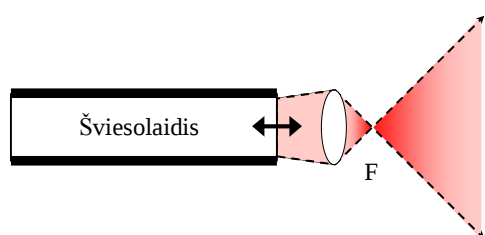
sklaidančių dalelių, tokių kaip titano oksidas (TiO_2) ar aliuminio oksidas (Al_2O_3). Yra galimi tiek lankstūs, tiek kieti difuziniai antgaliai. Toks difuzinis antgalis yra pavaizduotas 2.30 paveiksle. Difuzinis antgalis yra užmaunamas ant standartinio

diagnostiniu zonu. Pats difuzinis antgalis iš vienos pusės buvo padengtas atspindinčiu sluoksniu, kuris apriboja spinduliavimą tik į vieną pusę. Fluorescencijos detektavimui tiriamojo kanalo viduje buvo naudojami šoniniai zondai.

Norint vienu tyrimu iširti visą

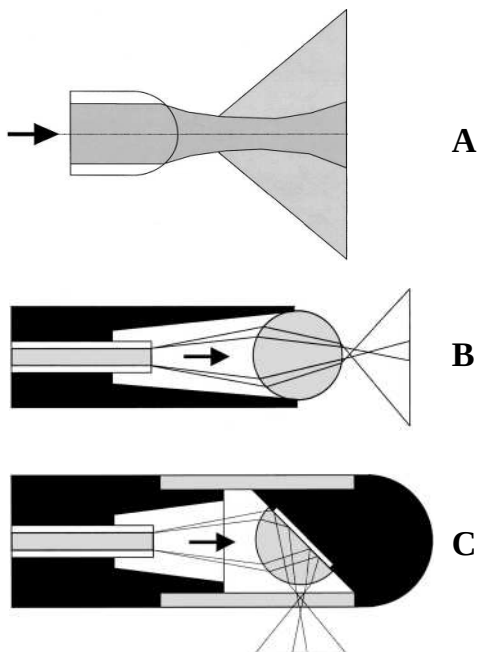
surinkimo šviesolaidžiai turi būti arti vienas kito, tai surinkimo šviesolaidžiai turi nesugerti žadinančiosios spinduliuotės, todėl jie yra gaminami skaidrūs.

Atliekant diagnostiką dažnai pasitaiko atvejų, kai tyrimo metu pirmiausia reikia apšviesti didelį plotą, o norint pažiūrėti detaliau reikia sufokusuoti spindulį į konkrečią įtartą vietą ir tik joje atlikti optinę biopsiją. Tokiu atveju reikia dviejų tipų skirtingų charakteristikų optinių zondu. Tačiau kaip tai įgyvendinti, jeigu tyrimas atliekamas naudojant vidaus tyrimo prietaisus su vienu kanalu šviesolaidžio įvedimui? Taigi, ar gali prietaisas, kai yra tik vienas šviesolaidis, tikti abiem atvejams: pirmiausia – apšviesti didelį plotą ir vėliau, išsirinkus



2.32 pav. Išėjusi iš šviesolaidžio spinduliuotė taške F yra fokusuojama, o paskui skečiasi

reikiamą vietą, visą šviesą sufokusuoti į vieną tašką ir jame atlikti optinę biopsiją? Pasirodo, galima. Šiam tikslui ir buvo sukonstruoti fokusuojamieji antgaliai. Tokio antgalio esmė ta, kad iš šviesolaidžio išėjusi spinduliuotė yra fokusuojama, ir tam tikru atstumu nuo šviesolaidžio yra taškas F, vadinamas židiniu, kuriame intensyvumas yra didžiausias. Iš optikos žinoma, kad spinduliai už

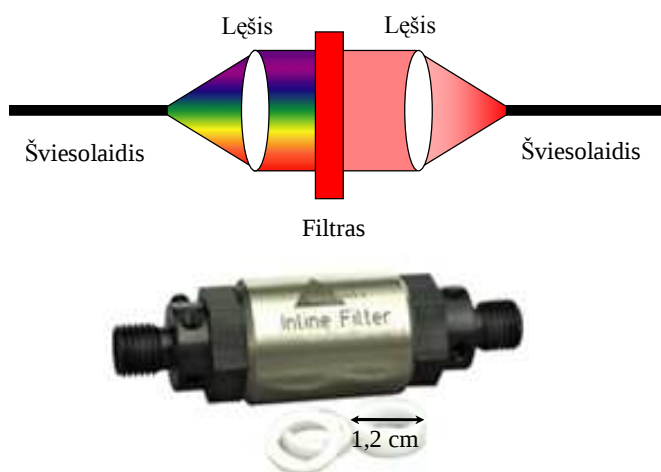


2.33 pav. A – šviesolaidis suapvalintu galu; B – šviesolaidis su sferine linze; C – šviesolaidis su pusiau sferine linze šoniniam apšvietimui

fokuso plečiasi, todėl didėja apšvietimo plotas (2.32 pav.). Taigi, jei reikia apšviesti mažą plotelį, šviesolaidis nuo audinio atitraukiamas tiek, kad tiriamoji vieta būtų taške F. Šiame taške spinduliuotė yra fokusuota, todėl ir intensyvumas yra labai didelis, ir tai dažniausiai labai pagerina optinės biopsijos signalą. Be to, jei reikia apšviesti didelį plotą, tereikia šviesolaidį atitraukti dar toliau nuo audinio, kol bus apšviestas reikiamas plotas arba kol spinduliuotės intensyvumas visame plote dar bus pakankamas. Praktiškai toks šviesolaidis yra taikomas keliais būdais. Pirmas būdas: suapvalinant šviesolaidžio galą – tai atitinka pusiau sferinio lęšio pridėjimą prie šviesolaidžio galo (2.33 pav.). Tokio šviesolaidžio maksimalus intensyvumas taške F yra maždaug 3 kartus didesnis nei šviesolaidžio viduje. Zondas optinei biopsijai yra gaminamas iš vieno šviesolaidžio. Tokio zondo tiriamoji sritis yra

mažesnė nei šviesolaidžio skersmuo, o tinkamas surinkimo kampas didesnis nei paties šviesolaidžio, kurį nulemia skaitinė apertūra. Antras būdas – šviesolaidžio gale yra dedamas sferinis lęšis (2.33 B pav.). Sferos dažniausiai yra gaminamos iš safyro. Tokio šviesolaidžio maksimalus intensyvumas fokuso taške yra daugiau nei 5 kartus didesnis negu pačiame šviesolaidyje. Tačiau didinant šviesolaidžio skersmenį dėl sferinės aberacijos vyks defokusavimas ir intensyvumas fokuso taške sumažės. Tokio tipo šviesolaidis taip pat gali būti gaminamas ir šoniniam apšvietimui (2.33 C pav.).

2.3.2.2. Filtrai. Dar viena esminė šviesolaidinio optinės biopsijos prietaiso dalis yra filtrinė spektrinės sudėties modifikavimo sistema. Šios sistemos esmė – apytikriai filtruoti šviesos spektrinę sudėtį, dažniausiai tai yra leisti arba sulaikyti tam tikros spalvos šviesą. Tinkamo bangos ilgio (spalvos) šviesa apšviestas audinys duos optinį atsaką – fluorescenciją, kuri jau bus kitos spalvos nei žadinimo spinduliuotė, ir jei šis spalvinis skirtumas yra pakankamai didelis, pavyzdžiui, jei žadinimui naudojama mėlyna šviesa, o fluorescencija matoma žalios arba raudonos spalvos, tai filtrinis spektrų atskyrimas bus gana efektyvus. Paprastoje optinėje biopsijoje tokios spektrinės sudėties modifikavimo sistemos visiškai pakanka. Tai yra labai paprasta sistema, kurią sudaro filtrų laikiklis bei pora lęšių



2.34 pav. Filtrinė spektrų modifikavimo sistema. Viršuje pavaizduota spinduliuotės sklaidimo schema, apačioje – reali šviesolaidinė sistema INLINE-FH (Ocean Optics)

spinduliuotės fokusavimui. Filtrinės spektrų modifikavimo sistemos schema pateikta 2.34 paveiksle. Kadangi ši sistema yra naudojama šviesolaidinėje sistemoje, tai ji turi būti tinkama jungimui su šviesolaidžiais bei atitikti tam tikrus reikalavimus, t. y. filtravimas turi būti atliekamas minimaliais intensyvumo nuostoliais. Būtent dėl to ir yra naudojami lęšiai. Sistemos veikimo principas labai paprastas: iš

šviesolaidžio išėjusi spinduliuotė skečiasi tam tikru kampų, kurį apibrėžia šviesolaidžio skaitinė apertūra. Tam tikru atstumu nuo šviesolaidžio pastatytas glaudžiamasis lęšis iš besiskeičiančio pluošto suformuoja lygiagretų pluoštą. Tada lygiagretaus pluošto kelyje yra dedamas filtras. Filtrą perėjęs pluoštas išlieka lygiagretus, o jo kelyje įdėtas dar vienas glaudžiamasis lęšis vėl sufokusuoja spinduliuotę ir ji vėl yra suvedama į šviesolaidį.

Kaip jau minėta anksčiau, filtrai taip pat yra naudojami ir spindulinėse sistemose. Jais yra kompensuojamas monochromatorių netobulumas – savybė praleisti spinduliuotę už pasirinkto bangos ilgio srities. Kai tiriamojo objekto spektrinės savybės yra apytikriai žinomos, registruojamas intensyvumas yra didesnis būtent naudojant filtrus, o ne monochromatorius. Taip yra todėl, kad monochromatoriuose, siekiant tiksliai „išgryninti“ spalvas, intensyvumas prarandamas.

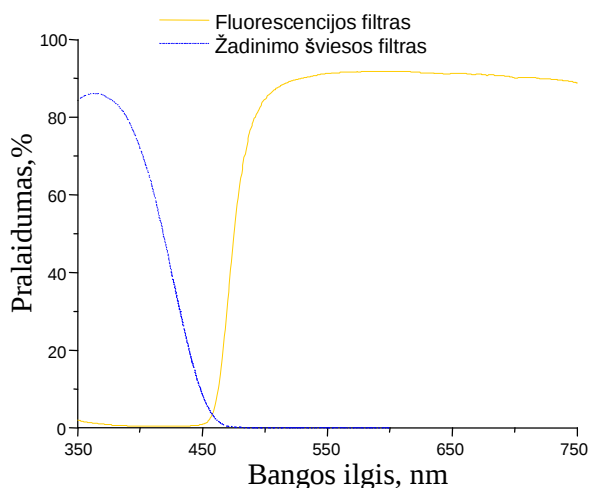
Pagal tai, kokią spektrinę sritį praleidžia ar sulaiko, filtrai gali būti skirstomi į juostinio pralaidumo (*bandpass*) filtrus, kurie praleidžia tik tam tikros spektrinės srities spinduliuotę, nukirtimo (*cut-off*) filtrus, kurie praleidžia spinduliuotę tik iki tam tikros srities, bei atkirtimo (*long-pass*) filtrus, kurie praleidžia spinduliuotę tik nuo tam tikros spektrinės srities. Dauguma juostinio pralaidumo filtrų taip pat praleidžia ir ilgesnių bangų spinduliuotę, todėl kartais tenka sudaryti kelių filtrų derinį, kuris eliminuotų nepageidaujamą spinduliuotę. Atkirtimo filtrai labai dažnai yra naudojami išsklaidytai žadinančiai spinduliuotei sulaikyti ir tiriamojo audinio fluorescencijai praleisti. Naudojant filtrus reikia turėti galvoje, kad kai kurie iš jų gali patys fluorescuoti apšvietus juos ultravioletine šviesa.

Dar vieno tipo filtrai, kurių paskirtis yra praleisti tik labai siauros spektrinės srities spinduliuotę ir kurie nepraleidžia ilgesnių bangų – vadinami interferenciniais filtrais. Šiems filtrams būdinga pralaidumo juosta, kurios plotis apytiksliai 10–20 nm, o didžiausias pralaidumas yra maždaug 20–30 % (pastaruoju metu atsirado filtrų, kurių maksimalus pralaidumas siekia 80 %).

Atskira filtrų rūšis yra intensyvumo mažinimo filtrai. Tai filtrai, kurių pralaidumas plačioje spektrinėje srityje yra nedidelis. Jie yra skirti iš šviesos šaltinio sklindančios spinduliuotės intensyvumo sumažinimui, jei dėl kokių nors priežasčių jis yra per didelis ir nėra galimybės jo sumažinti kitais metodais.

Reikėtų paminėti ir šilumą absorbuojančius filtrus. Dauguma šviesos šaltinių, o ypač lempos, išspinduliuoja labai daug šilumos (infraraudonosios spinduliuotės), kurią reikia sulaikyti siekiant išvengti šiluminių pažeidimų. Šilumos filtrai yra gaminami iš grūdinto stiklo, kuris sugeria infraraudonąją spinduliuotę, o praleidžia ultravioletinę ir regimąją šviesą.

Šviesolaidinėje optinės biopsijos aparatūroje naudojamos filtrinės sistemos yra dviejų tipų – tai žadinimo spinduliuotės filtravimo sistema ir emisijos signalo (fluorescencijos) filtravimo sistema. Jos skiriasi savo pralaidumo charakteristikomis. Pirmoji sistema skirta išrinkti tinkamą žadinančiosios spinduliuotės bangos ilgį (jei naudojami plataus spektro šviesos šaltiniai, pavyzdžiui, lempos), o antroji sistema skirta nufiltruoti į surinkimo šviesolaidį patekusią žadinančiąją spinduliuotę. Kitaip tariant, šių sistemų pralaidumo



2.35 pav. Optinėje biopsijoje naudojamų filtrinių sistemų charakteristikos. Žadinimo sistema skirta praleisti 405 nm spinduliutei, o emisijos sistema – nepraleisti 405 nm spinduliuotės ir praleisti ilgesnių bangų spinduliuotę

charakteristikos turi nepersidengti – tos spektrinės srities, kurią praleidžia pirmoji sistema, antroji sistema turi nepraleisti. Optinėje biopsijoje naudojamų filtrų charakteristikų pavyzdys pateiktas 2.35 paveiksle.

2.4. DETEKTORIAI

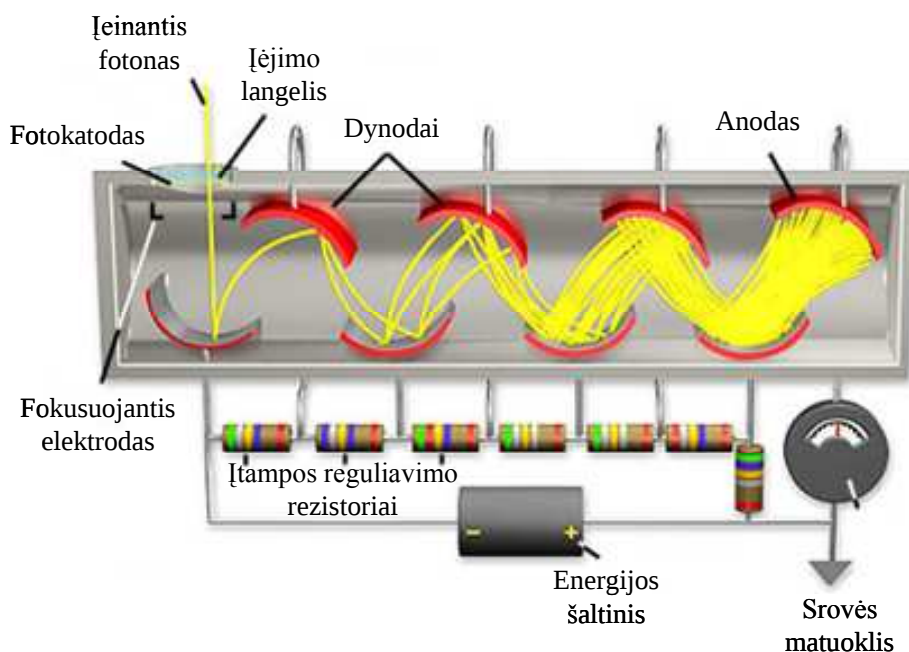
Paskutinis optinės biopsijos sistemos elementas, kuris yra būtinas norint užregistruoti audinių

atsaką, yra detektorius. Tam tikrais atvejais, kai audinio fluorescencija yra labai intensyvi – dažniausiai tai yra pajautrinta (sensibilizuotoji) fluorescencija – ji gali būti matoma ir plika akimi. Taip gali būti atliekama audinių diagnostika – vaizdinimas. Deja, toks būdas yra tinkamas tik tada, kai pažeidimo lygis yra labai didelis arba pažeida jau yra išplitusi, o ankstyvojoje diagnostikoje, kurioje optinės biopsijos perspektyvos yra didžiausios, pažeida turi būti nustatoma kuo anksčiau – t. y. vos keleto ląstelių lygiu. Taigi šio nedidelio ląstelių kiekio optiniam atsakui užregistruoti ir yra būtini jautrūs detektoriai. Detektorius galima suskirstyti į vienkanalius – tokius įrenginius, kurie vienu metu gali registruoti tik vieną optinį signalą, ir daugiakanalius – įrenginius, kurie vienu metu gali registruoti daug (iki kelių tūkstančių) optinių signalų. Labiausiai paplitęs vienkanalis detektorius yra fotodaugintuvas, o daugiakanalis – krūvio kaupimo įrenginys (CCD elementas). Pakalbėsime apie juos plačiau.

2.4.1. Fotodaugintuvai

Taigi, koks tikslas naudoti vienkanalį detektorių, kuriuo tyrimas gali užtrukti net iki kelių minučių, kai daugiakanaliu detektoriumi tai galima atlikti vos per kelias sekundes? Atsakant į šį klausimą, reikia prisiminti, kad dažnai biologinių audinių optinis atsakas – fluorescencija – yra labai silpna, todėl norint ją užregistruoti, šį signalą reikia sustiprinti. Taigi fotodaugintuvai ir yra ypatingi tuo, kad juose yra integruotos stiprinimo grandinės ir jais galima užregistruoti netgi pavienius fotonus. Beveik visuose sudėtinguose optinės biopsijos prietaisuose, kuriuose svarbiausi parametrai yra jautrumas ir tikslumas, kaip detektoriai yra naudojami fotodaugintuvai.

Fotodaugintuvas geriausiai gali būti suprantamas kaip šaltinis srovės, kurios stiprumas priklauso nuo į fotodaugintuvą patenkančios šviesos intensyvumo. Pagrindinės fotodaugintuvo dalys yra šviesai jautrus elementas (fotokatodas) ir stiprinimo sistema (dynodų grandinė). Fotokatodas ir dynodų seka yra įdėti į vakuuminį vamzdelį (2.36 pav.). Fotokatodas yra plona metalinė plokštelė. Atlėkęs fotonas išmuša elektroną iš jos paviršiaus. Fotoelektronų generavimo efektyvumas priklauso nuo bangos ilgio λ (šviesos spalvos). Fotokatodas turi neigiamą potencialą (-1000 – -2000 V), todėl išmuštą fotoelektroną, kurio krūvis taip pat neigiamas, stumia nuo savęs tolyn. Dynodai taip pat turi neigiamą potencialą, bet jis artėja į nulį eidamas grandine. Potencialų skirtumas tarp fotokatodo ir pirmo dynodo dažniausiai yra fiksuotas apie -50 – -200V. Šis skirtumas greitina elektronus link pirmo dynodo. Elektrono susidūrimas su pirmuoju dynodu lemia dar 5–20 elektronų išmušimą, priklausomai nuo įtampos su šiuo dynodu skirtumo. Tai tęsiasi dynodų grandine tol, kol impulsas, kurio dydis priklauso nuo fotodaugintuvo įtampos, pasiekia anodą. Didesnė įtampa lemia didesnę iš kiekvieno dynodo išmuštų elektronų skaičių, o tai savo ruožtu lemia didesnę stiprinimą. Kad stiprinimas fotodaugintuve būtų pastovus būtina tiksliai kontroliuoti įtampą. Įprastam PMT, įtampą padidinus 100V, stiprinimas padidės 3 kartus. Taigi mažas įtampos pokytis lemia ryškų signalo pokytį. Atliekant tyrimus ir siekiant gauti patikimus rezultatus, prijungta aukšta įtampa turi būti pastovi ir nekintanti ilgą laiką, todėl fotodaugintuvams reikia ir sudėtingų valdymo elektronikos blokų.



2.36 pav. Fotodaugintuvo schema. Atlėkęs fotonas iš fotokatodo išmuša fotoelektroną, kuris potencialų skirtumo veikiamas lekia link pirmojo dynodo. Susidūręs su dynodu išmuša dar kelis elektronus, kurie toliau skrieja link antrojo dynodo ir t. t., kol visas elektronų srautas pasiekia anodą. Dynodų įtampos skirtumai yra keičiami rezistoriais

Fotodaugintuvai yra mažatriukšmiai stiprintuvai, t. y. lekiant elektronams fotodaugintuve papildomo triukšmo atsiranda mažai. Dėl to šio tipo detektoriai ir yra plačiai taikomi silpnos šviesos registravimui, tačiau būtent dėl didelio jų jautrumo fotodaugintuvais nerekomenduojama detektuoti itin didelio intensyvumo signalų. Šviečiant dideliu intensyvumu, elektrinis fotokatodo potencialas gali sumažėti dėl ribotos talpos (bus išmušta labai daug fotoelektronų). Tai sumažina įtampos skirtumą tarp fotokatodo ir pirmo dynodo, kuris taip pat sumažina stiprinimą. Be to, besaikis švietimas taip pat gali sugadinti šviesai jautrius fotokatodus, o tai sukelia triukšmų atsiradimą ir stiprinimo sumažėjimą.

Vienas iš svarbiausių fotodaugintuvo parametrų, kuris yra svarbus komplektuojant optinės biopsijos prietaisą – spektrinis atsakas (detektavimo sritis). Tai spektro ruožas, kurį gali registruoti detektorius. Pirmiausia spektrinį atsaką lemia skaidri medžiaga, iš kurios pagamintas fotodaugintuvo įėjimo langelis (langelis turi būti skaidrus pasirinktiems bangos ilgiams). Dažniausiai naudojamas UV spinduliuotę praleidžiantis stiklas, kurio pralaidumas prasideda nuo 200 nm. Beveik visais atvejais tai pakankama pralaidumo sritis, nes dar trumpesnių bangų spinduliuotę intensyviai sugeria atmosferoje esantis deguonis, tad, norint dirbti trumpesnių nei 200 nm bangos ilgių ruože, tenka dirbti vakuume.

Fotodaugintuvo atsaką taip pat nulemia ir cheminė fotokatodo sudėtis. Daugelis fotokatodų yra jautrūs trumpų bangos ilgių spinduliuotei, kurią sulaiko įėjimo langelio medžiaga. Įprastai fotokatodai yra jautrūs UV, mėlynai ir žaliai (300 nm–500 nm) šviesai. Dažniausiai naudojamas bišarminis fotokatodas (sudarytas iš dviejų šarminių metalų), pasižymintis dideliu jautrumu ir maža tamsine srove (mažas triukšmas). Jo trūkumas – staigus jautrumo mažėjimas, kai bangos ilgesnės negu 600 nm. Taigi skirtumai tarp fotokatodo

medžiagų pasidaro labai svarbūs, norint registruoti fluorescenciją ilgesnių nei 600 nm bangų srityje. Pastaruoju metu diagnostikai yra plačiai taikoma raudonoji ir artimoji IR fluorescencija, deja, dirbant šioje srityje bišarminis fotokatodas yra nelabai naudingas. Jautrumas ilgesnių negu 500 nm bangų šviesai padidinamas naudojant daugiašarmius fotokatodus, kurie gana jautrūs 700–800 nm ir ilgesnių bangų šviesai. Raudonai šviesai jautrūs fotodaugintuvai dažniausiai pasižymi ir didesniais triukšmais. Jautrumas ilgesniems bangos ilgiams (IR srityje) gali būti pasiektas naudojant Ag-O-Cs ar S-1 fotokatodus. Tačiau jų kvantinis našumas (fotoelektronų atsiradimas, į fotokatodą atsitrenkus fotonui) yra gana nedidelis, todėl naudojant šiuos detektorius dažnai sunku tikrąjį signalą išskirti iš triukšmų. Dėl šios priežasties, siekiant sumažinti triukšmų, raudonosios ir IR srities fotodaugintuvai dažnai yra papildomai aušinami.

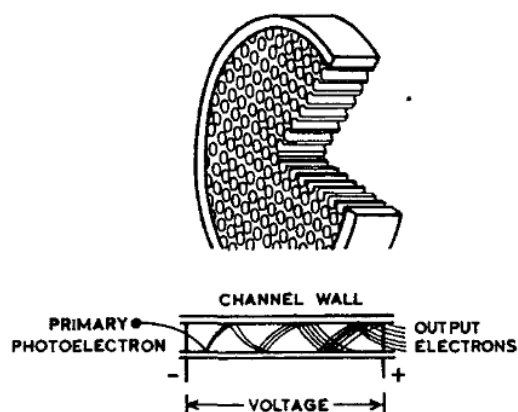
Visiems fotodaugintuvams yra būdinga tai, kad jie nevienodai efektyviai reaguoja į skirtingų bangos ilgių (spalvos) šviesą. Taigi detektoriai drauge su monochromatoriais, kurių efektyvumas taip pat yra nevienodas skirtingų bangos ilgių spinduliuotei, iškraipo tikrąjį fluorescencijos spektrą, kuris turi būti tikslinamas. Daugelis šiuolaikinių prietaisų tokią spektro korekciją atlieka automatiškai.

Dar viena svarbi fotodaugintuvų charakteristika yra jų laikinis atsakas. Tai yra laikas, per kurį fotono išmuštas fotoelektronas ir jo toliau išmušti kiti elektronai pereina visą stiprinimo procesą. Kitaip tariant, po kiek laiko po pirmojo fotono atėjimo detektorius bus pasirengęs „priimti“ kitą fotoną. Toks parametras nėra svarbus atliekant nuostoviosios fluorescencijos matavimus. Tačiau dabartiniuose fotodaugintuvuose šis laikas yra labai trumpas, todėl jie puikiai tinka optinei biopsijai su laikine skyra.

Pagrindinės fotodaugintuvo laikinio atsako skaičiavimo charakteristikos yra šios: perėjimo laikas, stiprėjimo laikas ir laikinis išplitimas. Perėjimo laikas yra laiko intervalas tarp ateinančio į katodą fotono ir pirmo į anodą atlekiančio elektrono, paprastai apie 20–50 ns. Stiprėjimo laikas – laikas, per kurį fotodaugintuvo anodo signalas sustiprėja nuo 10 % iki 90 % didžiausios vertės. Stiprėjimo laikas priklauso nuo perėjimo laiko svyravimų, ir trunka apie vidutinį perėjimo laiką. Fotodaugintuvo laikinė skyra labiausiai priklauso nuo laikinio išplitimo, kuris atsiranda dėl skirtingų elektronų trajektorijų jiems lekiant iš dynodų link anodo. Tai reiškia, kad pirmiausia fotoelektronas gali išlėkti iš skirtingų fotokatodo vietų arba lėkti kita trajektorija. Toliau – iš dynodų išmuštų elektronų trajektorija per fotodaugintuvą taip pat šiek tiek gali skirtis. Laikinis išplitimas gali būti sumažinamas apšviečiant mažą plotą arba pakeičiant dynodų išdėstymą ir formą į tokią, kuri lemtų elektronų kryptį. Šiuo metu labiausiai paplitę detektoriai fluorescencijos su laikine skyra registravimui yra fotodaugintuvai su

mikrokanalų plokštelėmis dynoduose (2.37 pav.). Juose elektronai juda beveik viena trajektorija, todėl jų laikinis išplitimas yra 10 kartų mažesnis nei standartiniuose fotodaugintuvuose. Papildomi elektronai yra išmušami, kai pradinis elektronas lekia pagal įtampos gradientą mikrokanalų plokštelėje ir atsitrenkia į kanalo sienelės. Dėl trumpo elektronų kelio ir apribotos jų krypties šio tipo detektorių yra trumpiausias laikinis atsakas ir jie dažniausiai naudojami atliekant laikinės skyros matavimus. Tačiau stiprinimas paprastai yra mažesnis nei fotodaugintuvų su pavienėmis dynodų grandinėmis, todėl mikrokanaliai fotodaugintuvai galimi su vienos, dviejų ar trijų pakopų mikrokanalų plokštelėmis.

Fotodaugintuvų laikinis atsakas taip pat priklauso nuo paties fotokatodo. Paprastai detektoriaus greitis priklauso nuo į fotokatodą ateinančios spinduliuotės bangos ilgio (spalvos). Ši savybė vadinama spalvos efektu. Akivaizdu, kad išmuštų elektronų energija priklauso nuo bangos ilgio, mat skirtingos spalvos spinduliuotė perneša skirtingą kiekį energijos. Spalvos efektai nesvarbūs nuostoviosios spektroskopijos matavimams. Tačiau spalvos efektas gali būti rimta paklaidos priežastis atliekant fluorescencijos gyvavimo trukmės matavimus.



2.37 pav. Fotodaugintuvas su mikrokanalų plokštelėmis. Papildomi elektronai yra išmušami, kai pradinis elektronas lekia pagal įtampos gradientą mikrokanalu

Siekiant paprastumo ir tvirtumo, įprastus vakuuminius fotodaugintuvus bandoma pakeisti kietais detektoriais – fotodiodais. Jais gaunamas labai greitas atsakas ir jų yra plati detektavimo sritis, tačiau net ir griūtinių fotodiodų stiprinimas tesiekia maždaug 100 kartų, todėl trūkumas, kad negalima kiek norima stiprinti, ir mažas aktyvus plotas riboja jų panaudojimo jautriems matavimams galimybes. Pastaruoju metu pasirodė visiškai naujo tipo

detektorių – hibridinių fotodaugintuvų. Kaip ir įprasti fotodaugintuvai, šie įrenginiai turi fotokatodą, tačiau juose fotoelektronai kietose struktūrose yra stiprinami griūties proceso. Detektoriaus išėjime gaunamas elektrinis impulsas, kuris gali būti toliau stiprinamas. Pačių hibridinių detektorių stiprinimas siekia 2000 kartų, todėl šio tipo detektoriai turėtų būti labai naudingi pavienių fotonų detektavimui.

Taigi iš visų išvardytų fotodaugintuvų savybių aiškėja jų privalumai ir trūkumai. Visų pirma jie šiuo metu yra patys jautriausi detektoriai, gebantys užregistruoti net ir pavienius

fotonus. Kitas jų privalumas – mažas triukšmas, kuris gali būti dar labiau sumažintas papildomai šaldant, ir paskutinis tiek pat svarbus jų privalumas, – nepaprastai trumpas laikinis atsakas, įgalinantis registruoti labai trampus vyksmus ir atlikti įvairiausius laikinius matavimus, taip dar labiau praplečiant optinių diagnostikos metodų galimybes.

Tam tikrais atvejais fotodaugintuvus naudoti nėra tikslinga. Kadangi vienu metu yra registruojamas tik vieno bangos ilgio (arba labai mažo bangos ilgių intervalo) intensyvumas, tai intensyvumų pasiskirstymas plačiu bangos ilgių intervalu (spektras), net ir labai greitais fotodaugintuvais, yra gaunamas gerokai lėčiau nei naudojant daugiakanalius registravimo elementus – CCD detektorius.

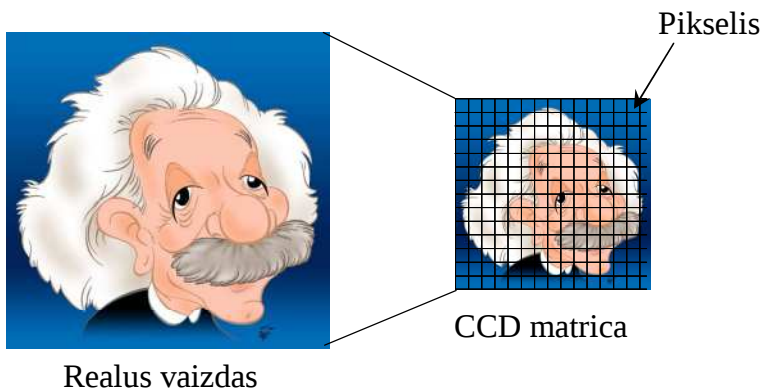
2.4.2. CCD detektoriai

Kaip ir daugelis naujai sukurtų prietaisų bei technologijų, krūvio kaupimo įrenginys (angl. *charge coupled device* – *CCD*) buvo sukurtas visai kitam tikslui. 1960 m. mokslininkai iš Bell Labs laboratorijos sukūrė naują atminties elementą, kurį pirmą kartą praktiškai panaudojo 1970 m. Tačiau tuoj ėmė aiškėti, jog dėl gebėjimo šviesą paversti elektriniu signalu šis išradimas kur kas naudingiau gali būti panaudotas vaizdų fiksavimui. CCD – tai yra mažų, maždaug 10 – 50 μm dydžio, detektorių (pikselių), išdėstytų tam tikrame plote arba vienoje eilutėje, rinkinys. Pavadinimas CCD kilo iš to, kad vienoje zonoje (pikselyje) sukauptas krūvis yra perduodamas (arba sukaupiamas) šalia esančiai zonai. Iš esmės tai apibūdina duomenų perdavimą/nuskaitymą iš CCD matricos.

Vaizdinimas krūvio kaupimo įrenginiu susideda iš trijų pakopų:

1. Apšvietimas, kurio metu šviesa yra paverčiama elektronais (tai vyksta kiekviename pikselyje);
2. Krūvio perdavimas iš šviesai jautraus elemento (pikselio) į nuskaitymo įrenginį;
3. Krūvio pavertimas įtampa ir stiprinimas.

Vaizdas yra formuojamas, kai šviesa fotonų pavidalu krinta ant mažyčių šviesai jautrių elementų – pikselių (2.38



pav.). Kiekvienas pikselis gali būti išivaizduojamas kaip mažytis detektorius. Kritusi šviesa inicijuoja elektronų atsiradimą, kurių kiekis tiesiogiai priklauso

2.38 pav. Realus vaizdas yra projektuojamas ant daugybės CCD elementų (pikselių) – CCD matricos. Kuo daugiau pikselių, tuo tolygesnis atrodo vaizdas

nuo šviesos intensyvumo bei apšvietimo laiko. Be to, elektronų generavimo efektyvumas šiek tiek priklauso ir nuo krintančios šviesos bangos ilgio (spalvos). Deja, šioje fotonų vertimo į elektronus grandyje CCD detektoriuose nėra jokio stiprinimo, todėl jais efektyviai gali būti registruojami tik pakankamai intensyvūs signalai. Sukaupiti elektronai (krūvis) kaupiasi vadinamojoje potencinėje duobėje, kuri atsiranda, kai išorinė įtampa yra prijungiama prie pikselio elektrodų. Taigi galima įsivaizduoti, kad po kiekvienu pikseliu yra „duobė“, kurioje susirenka elektronai, ir jų skaičius proporcingas kritusios šviesos intensyvumui bei apšvietimo trukmei. Pikseliai yra sujungti į krūvio perdavimo šeimas, kuriose panaudojant potencines duobes kiekvieno pikselio krūvis yra gabenamas į nuskaitymo įrenginį. Dabartiniuose CCD krūvio gabenimo kanalai yra integruoti pačiame CCD įrenginyje. Nuskaitytus kiekviename pikselioje susikaupusį krūvį, jis yra paverčiamas į intensyvumą ir šitaip yra suformuojamas vaizdas.

Optinės biopsijos detektoriuose yra naudojami linijiniai CCD. Tai yra viena eile išdėstyti krūvio kaupimo įrenginiai. Kiekvienas šviesai jautrus elementas sudarytas iš p-n sandūrą turinčio fotodiodo. Krūvis, kuris atsiranda fotoelektrinės konversijos metu, kaupiasi kaip vidinis elemento krūvis ir yra perduodamas į postūmio registrą (angl. *shift register*). Juo krūvis eina iki nuskaitymo įrenginio ir paeiliui yra nuskaitytos visų pikselių vertės. Pagal tai, kaip vertės nuskaitytos, linijiniai CCD yra skirstomi į:

- I tipo – vieno kanalo ir vieno išėjimo;
- II tipo – dviejų kanalų ir vieno išėjimo;
- III tipo – dviejų kanalų ir dviejų išėjimų.

Kai nėra svarbus informacijos nuskaitymo greitis, naudojami I arba II tipo linijiniai detektoriai, o registruojant greitus procesus naudojami III tipo detektoriai, kuriuose nuskaityma dviem lygiagrečiais kanalais.

Pagrindiniai optinei biopsijai naudojamų linijinių CCD detektorių parametrai yra šviesai jautrių elementų (pikselių) skaičius, nuo kurio priklauso skiriama geba, jautrumas ir detektavimo sritis, kitaip dar vadinama spektriniu atsaku. Šiuo metu naudojamų CCD detektorių detektavimo sritis apima 200 nm–1100 nm spektrinį ruožą.

Spinduliuotei patekus į registravimo įrenginį, difrakcinės gardelės išskleista spinduliuotė krinta ant linijinio detektoriaus ir vienu metu yra registruojamas visų bangos ilgių (spalvų) spinduliuotės intensyvumas. Taigi didžiausias CCD detektorių privalumas yra tas, kad vienu metu yra registruojamas platus spektras. Dažniausiai platesnis nei yra audinio optinis atsakas; taigi optinė biopsija yra atliekama beveik akimirksniu. Nors CCD ir yra labai

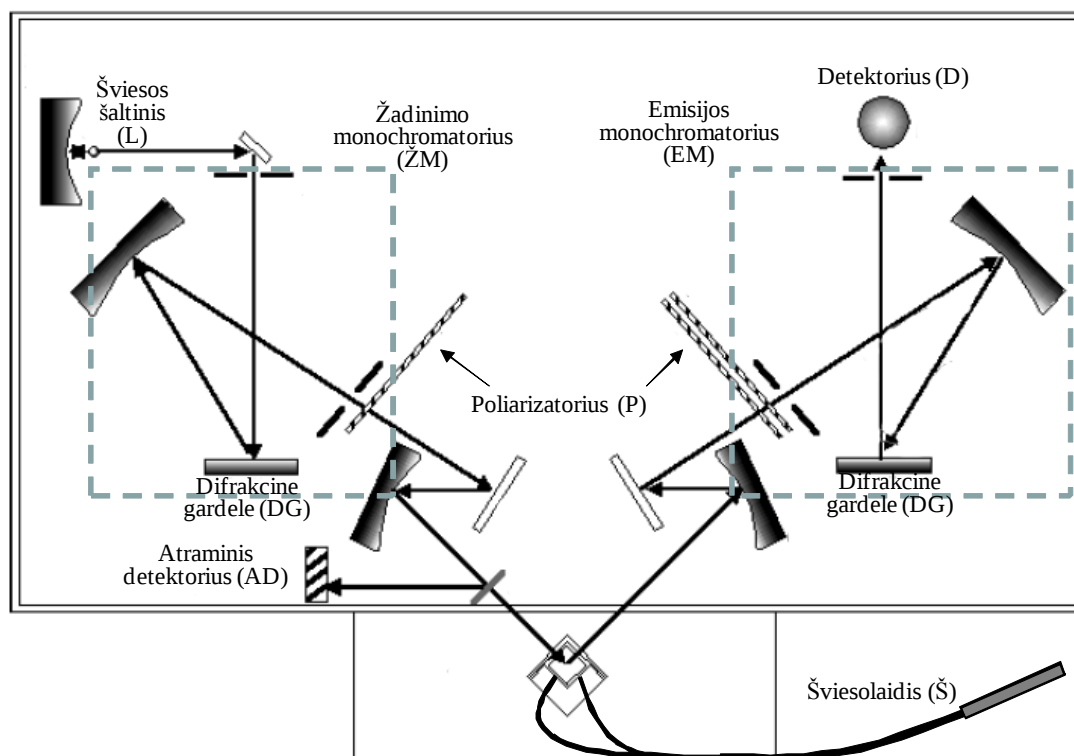
patogūs naudoti signalų registravimui nuostoviojoje optinėje biopsijoje, tačiau jų laikinis atsakas yra per lėtas laikinės skyros matavimams.

2.5. OPTINĖS BIOPSIJOS PRIETAISAI

Optinės biopsijos prietaise yra visos aptartosios dalys – šviesos šaltinis, žadinimo–surinkimo sistema, spinduliuotės spektrinės sudėties modifikavimo sistema bei detektorius. Pats prietaisas, žinoma, yra sudarytas iš daug daugiau detalių, kurios reikalingos visoms išvardytoms dalims sujungti į vieną visumą. Kadangi optinėje biopsijoje labai svarbi diagnostinio prietaiso dalis yra žadinimo – surinkimo sistema, tai prietaisai gali būti skirstomi pagal šios sistemos tipą. Pateiksime keletą konkrečių optinės biopsijos prietaisų pavyzdžių.

2.5.1. Spindulinis optinės biopsijos prietaisas

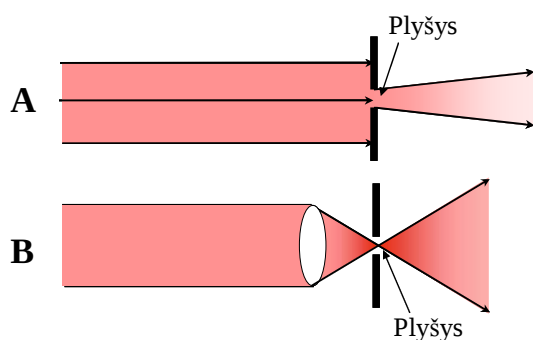
Optinės biopsijos prietaisas yra tuo sudėtingesnis, kuo daugiau jame yra dėmenų,



2.39 pav. Perkin Elmer fluorescencinis spektrometras, pritaikytas optinei biopsijai

galinčių veikti spektrų parametrus. Visi prietaiso elementai yra skirti atlikti tam tikrai funkcijai – pasitelkiant juos yra atliekami atitinkami matavimai. Stengiamasi informaciją gauti

kuo paprastesniu būdu, todėl dažniausiai optinė diagnostika atliekama panaudojant kuo mažiau papildomų elementų. Sudėtingas optinės biopsijos prietaisas remiasi spinduline žadinimo–surinkimo sistema. Dažnai visa sistema apsiriboja klasikiniu fluorescencijos spektrometru bei papildomomis žadinimo–surinkimo sistemomis (2.39 pav.). Būtina visų optinių diagnostikos sistemų dalis yra šviesos šaltinis (L). Kadangi tokio tipo prietaisai yra



2.40 pav. A – nefokusuotai spinduliuotei einant pro plyšį pereina tik nedidelė jos dalis, todėl smarkiai mažėja intensyvumas; B – kai fokusas yra ties plyšiu, fokusuota spinduliuotė pereina visa ir intensyvumas neprarandamas

plačiai taikomi, šiam tikslui naudojamos lempos. Dažniausiai tai yra ksenono lempos, užtikrinančios gerą fluorescencijos sužadinimą UV srityje. Lempos spinduliuotė yra fokusuojama į žadinimo monochromatoriaus (ŽM) įėjimo plyšį. Fokusavimas užtikrina, kad beveik visa spinduliuotė praeis pro plyšį ir pateks į monochromatorių, t. y. nebus prarastas spinduliuotės intensyvumas (2.40 pav.). Žadinimo monochromatoriuje šviesa krinta į difrakcinę gardelę (DG) ir yra išskaidoma į spektrą. Monochromatoriaus išėjime taip pat

yra plyšys, vadinamas išėjimo plyšiu, pro kurį praeina tik siaura spektro dalis. Kuri spektro dalis pereis, galima pasirinkti sukant difrakcinę gardelę. Šiuolaikiniuose prietaisuose difrakcinę gardelę galima sukti didžiuliu tikslumu net iki 80 nm/s greičiu su. Siekiant pakoreguoti skiriamąją gebą arba padidinti jautrumą, plyšių plotis gali būti keičiamas. Tad iš monochromatoriaus išėjusi šviesa yra fluorescencijos žadinimui reikiamo bangos ilgio. Vienas iš reikalavimų atliekant fluorescencinius matavimus yra žadinančiosios spinduliuotės pastovumas. Jei dėl kokių nors priežasčių per tyrimą šviesos intensyvumas svyruos arba pakis, tai atsispindės ir fluorescencijos spektre, tačiau nustatyti, ar optinis signalas susilpnėjo dėl kokių nors audinio savybių, ar dėl prietaiso ypatybių, labai sunku. Todėl, prieš pasiekiant žadinančiąją spinduliuotę tiriamąją vietą, yra matuojamas jos intensyvumas. Tam reikalui naudojamas atraminis detektorius (AD). Siekiant išvengti pašalinės šviesos, kuri gali atsirasti monochromatoriuje dėl aukštesnės eilės difrakcijos, žadinančiosios spinduliuotės kelyje papildomai gali būti dedami filtrai (F). Kadangi pašalinė šviesa dažniausiai būna kitos spektrinės srities nei žadinančioji spinduliuotė, tai jos atskyrimui visiškai pakanka gana apytikrio spektrinės srities modifikavimo metodo. Taip pat, priklausomai nuo tyrimo tikslo, spinduliuotės kelyje gali būti dedamas poliarizatorius (P). Įprastiniuose spektrometruose žadinimo šviesa patenka į bandinių skyrelį, tačiau tokiu atveju galima atlikti tik *ex vivo*

bandinių optinę biopsiją, todėl, kad būtų galima atlikti tyrimus *in vivo*, tokiuose prietaisuose būtina modifikuoti žadinimo–surinkimo sistemą. Dažniausiai tam yra naudojami šviesolaidiniai priedai (Š). Dėl to į bandinių skyrelį yra dedamas specialus priedas, kuris iš monochromatoriaus ateinančią spinduliuotę sufokusuoja į žadinimo šviesolaidį, o iš surinkimo šviesolaidžio ateinančią fluorescenciją perduoda į įprastą prietaiso detektavimo sistemą. Detektavimo sistema prasideda nuo fluorescencijos filtro (F), kuriuo atliekamas apytikris spinduliuotės spektrinės srities modifikavimas, bei surinkimo poliarizatoriaus – analizatoriaus (jei atliekami poliarizaciniai matavimai). Toliau spinduliuotė pro įėjimo plyšį patenka į emisijos monochromatorių (EM) (kaip ir žadinimo monochromatoriaus plyšio plotis gali būti keičiamas), kuriame surinkta spinduliuotė difrakcine gardele yra išskaidoma į spektrą. Iš emisijos monochromatoriaus spinduliuotė yra fokusuojama į išėjimo plyšį. Kuri spektrinė sritis išeis iš monochromatoriaus, taip pat yra parenkama sukant difrakcinę gardele. Tokioje – monochromatoriaus – sistemoje vienu metu yra registruojamas tik vienos, labai siauros spektrinės srities intensyvumas, o norint sužadinti visą spektrą, reikia registruoti visų difrakcine gardele išskirtų spektrinių sričių intensyvumus.

Paskutinis registravimo sistemos elementas yra detektorius (D). Dažniausiai tokiose sistemose yra naudojami jautrūs, tačiau negreiti detektoriai (čia reikia atskirti detektorius, skirtus fluorescencijos su laikine skyra matavimams).

Aptartuose prietaisuose yra naudojama tik vieno tipo lempa ir vienas detektorius, todėl jų taikymas yra apribotas tik tam tikra spektrine sritimi, pavyzdžiui, ultravioletine (UV) ir regimosios šviesos (VIS), arba regimosios šviesos ir artimąja infraraudonąja (NIR), arba tik infraraudonąja (IR). Norint tiksliau ištirti įtartą vietą, kartais tenka atlikti kelių tipų optinę biopsiją, todėl būtų labai patogu, jei visus tyrimus būtų galima atlikti tuo pačiu prietaisu.

Tam tikslui yra naudojamas modulinis spektrometras (2.41 pav.). Tai yra plačiausių galimybių pats sudėtingiausias spektrų registravimo įrenginys. Jei anksčiau aprašytame prietaise viskas yra surinkta viename korpuse, tai šiuo atveju kiekviena dalis, pavyzdžiui, lempa, monochromatorius ir t. t., yra atskiri moduliai. Visas prietaisas yra surenkamas iš tokių modulių. Natūralu, kad esant reikalui šiuos modulius galima lengvai keisti, tačiau modulinio spektrometro esmė ta, kad būtų galima sukonstruoti prietaisą sujungiant tiek modulių, kiek reikia, ir dirbant nebereiktų nieko keisti.

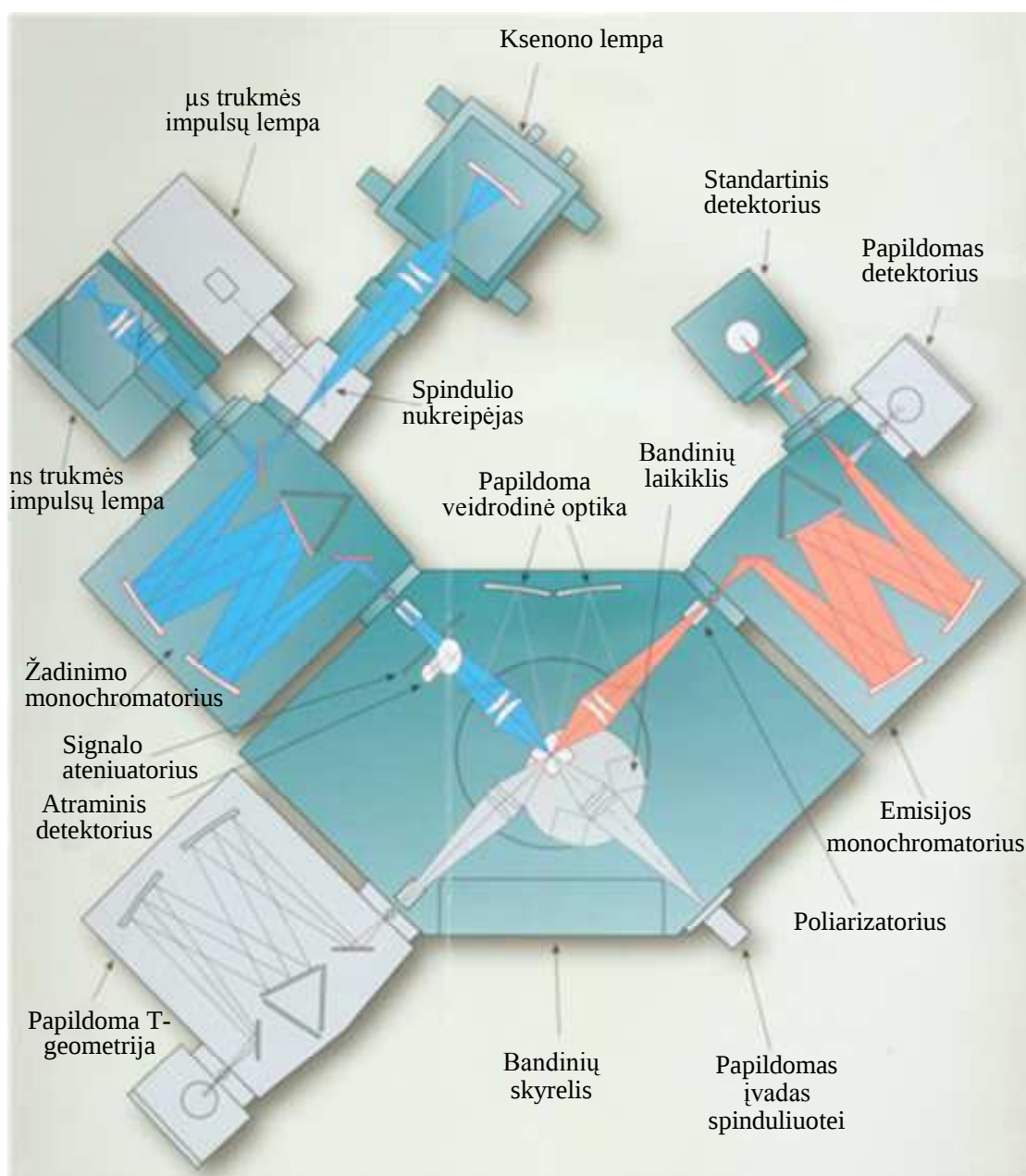
Svarbiausioji visų spektrometrų dalis yra šviesos šaltinis. Kad būtų galima atlikti įvairių tipų optinę biopsiją, reikalingas šviesos šaltinis, spinduliuojantis šviesą nuo ultravioletinės iki infraraudonosios spektrinės srities. Kadangi vieno šviesos šaltinio, kuris tolygiai spinduliuotų tokioje plačioje srityje, nėra, naudojamos kelių tipų lempos. Čia taip pat

puikiai tinka ksenono lempa, kuri gali būti naudojama tiek UV, tiek VIS, tiek ir NIR spektrinei sričiai. Tam tikrais atvejais ksenono lempa gali būti naudojama netgi IR sričiai, tačiau jos emituojamas spektras nėra tolygus. IR sričiai labiau tinkamos kvarco–volframo halogeninės lempos. Abiejų tipų lempas galima prijungti prie spektrometro ir atliekant atitinkamą užduotį pasirinkti vienos arba kitos lempos spinduliuotę. Šios lempos – tai nuostoviosios optinės biopsijos šviesos šaltiniai. Taip pat galima prijungti ir šviesos šaltinius, skirtus optinei biopsijai su laikine skyra. Pirmiausia – tai impulsinė ksenono lempa, kurios impulso trukmė siekia kelias nanosekundes, tačiau tam tikrais atvejais tokia trukmė yra per ilga. Todėl papildomai reikia itin trumpų impulsų (kurių trukmė pikosekundžių eilės) šviesos šaltinių. Tam yra naudojami impulsiniai lazeriai, kurie taip pat yra prijungiami prie spektrometro per specialų lazerinės spinduliuotės įvadą. Tačiau, jei atliekant optinės biopsijos su laikine skyra tyrimus reikėtų pakeisti žadinimo bangos ilgį, reikėtų pakeisti lazerį. Ši procedūra yra labai paprasta ir užtrunka vos kelias minutes. Štai čia ir pasireiškia neginčijamas lempų privalumas – galimybė pasirinkti žadinimo bangos ilgį iš plataus jų emituojamo spektro. Visiems plataus spektro šviesos šaltiniams reikalinga spektrinės sudėties modifikavimo sistema. Taigi visos lempos yra jungiamos taip, kad padedant įvairioms optinėms sistemoms (lęšiams, veidrodžiams ir kt.) jų spinduliuotės būtų suvedamos į kitą modulį – monochromatorių. Svarbiausioji monochromatoriaus dalis, kuria šviesa yra išskaidoma į spektrą, yra difrakcinė gardelė, o pagrindinės monochromatorių apibūdinančios charakteristikos yra dispersija (arba išbarstymas), pralaidumo efektyvumas ir pašalinės šviesos kiekis. Moduliniame spektrometre monochromatorius yra kaip atskiras prietaisas, todėl juo šiuos reikalavimus galima išpildyti geriausiai. Dispersiją, arba kaip stipriai bus išskirtos šviesos spalvos, nulemia tiek pati gardelė, tiek monochromatoriaus matmenys. Kadangi tai yra atskiras modulis, jis gali būti daromas tiek mažas, tiek ir didelis. Pralaidumas kiekvienam bangos ilgiui yra nevienodas, tai nulemia, kuriai spektrinei sričiai yra optimizuoti difrakcinės gardelės režiai. Taigi, dirbant skirtingose spektrinėse srityse (UV, VIS, NIR ar IR), reikėtų prietaiso su keliomis skirtingomis gardelėmis. Aptariamo prietaiso monochromatoriuje galima įmontuoti tris skirtingas gardeles ir vėliau pasirinkti tinkamą pagal spektrinę sritį, kurioje numatoma dirbti. Šitaip yra išlaikomas didelis monochromatoriaus pralaidumas plačiu spektriniu ruožu.

Paskutinis parametras, kuriuo apibūdinamas monochromatorius, yra šviesos kiekis už pasirinktos spektrinės srities (spalvos) ribų. Norint sumažinti pašalinės šviesos kiekį, reikėtų išskirtą tam tikros spalvos spinduliuotę dar kartą leisti per monochromatorių. Moduliniame

spektrometre ir tai gali būti padaryta sujungiant du atskirus monochromatorius. Be to, monochromatoriai turi įėjimo ir išėjimo plyšius, kurių pločiai gali būti keičiami.

Kita modulinio spektrometro dalis – bandinių skyrius, kuris optinei biopsijai nėra svarbus, nes tyrimai atliekami tik su išpjautais bandiniais. Tačiau jame yra svarbūs kai kurie optiniai komponentai. Tai poliarizatorius, kuriuo yra poliarizuojama spinduliuotė, kai atliekami poliarizaciniai matavimai, ir intensyvumo reguliatorius, kuriuo galima keisti į audinį krintančios žadinančiosios spinduliuotės intensyvumą. Bandinių skyriuje taip pat yra įmontuotas spinduliuotės intensyvumo detektorius, kuris registruoja bet kokius žadinančiosios spinduliuotės svyravimus ir yra atitinkamai modifikuojamas fluorescencijos spektras. Kaip ir



2.41 pav. Edinburgh Instruments spektrometras FL920, naudojamas įvairių rūšių optinei biopsijai

anksčiau aptartame prietaise, norint jį padaryti tinkamą optinei biopsijai, reikia modifikuoti žadinimo–surinkimo sistemą, taigi į bandinio vietą yra dedama speciali fokusavimo sistema, kuri spinduliuotę suveda į šviesolaidinę žadinimo–surinkimo sistemą. Bandinių skyriuje yra dar vienas įvadas šviesos šaltiniui, t. y. būdas aplenkiant monochromatorių. Jis yra skirtas lazeriniams šviesos šaltiniams, kurių spinduliuotė yra monochromatinė.

Surinktas fluorescencijos signalas toliau tęsia kelionę į detektorių. Emisijos atšaka yra labai panaši į žadinimo atšaką: taip pat yra poliarizatorius, kuris šioje atšakoje yra vadinamas analizatoriumi, viengubas arba dvigubas monochromatorius ir detektoriai. Monochromatoriuose yra įmontuotos kitokios nei žadinimo atšakoje difrakcinės gardelės, nes fluorescencija sukelia kitoje nei žadinimo spinduliuotė spektrinėje srityje. Detektorių skaičių lemia tai, kokioje spektro srityje ir kokio tipo tyrimas yra atliekamas. Bendru atveju galima skirti tris detektorius – vienas UV–VIS ruožui, kitas NIR ir IR spektro sričiai ir trečias, labai greitas – fluorescencijai su laikine skiriamąja geba. Šie greiti detektoriai taip pat yra skirtingi skirtingoms spektro sritims.

Taigi, norint atlikti optinę biopsiją tiek nuostoviąja spektroskopija, tiek su laikine skyra ir plačioje spektro srityje, reikia keturių detektorių. Jei yra pasirenkamas greitis detektorius, juo galima registruoti ir lėtus vyksmus, todėl dažnai pakanka tik dviejų detektorių. Tačiau galima prijungti visus keturis detektorius ir neatliekant jokių pakeitimų prietaise registruoti įvairių tipų spektrus.

2.5.2 Šviesolaidinis optinės biopsijos prietaisas

Optinė biopsija taikoma dažnai apsiribojant vienu ar keliais fluorescencijos metodais, todėl sudėtingos sistemos naudojimas ne visada pasiteisina. Ypač dėl to, kad dirbant su išvardytais prietaisais reikia turėti daug fizikinių žinių ir patirties. Sudėtingos sistemos paprastai yra naudojamos pavieniams, ypač sudėtingiems tyrimams atlikti, o per kasdienes tyrimus optinė biopsija dažniausiai yra atliekama šviesolaidiniais prietaisais. Tokie prietaisai turi neginčijamą privalumą – tai mobilūs diagnostikos aparatai, kuriuose yra minimalius komponentų skaičius, t. y. tik būtinos optinei biopsijai atlikti dalys. Visi komponentai yra specifiniai, nes jie sujungiami šviesolaidžiais.

Aptarsime visas šviesolaidinio prietaiso dalis, pradėdami šviesos šaltiniu.

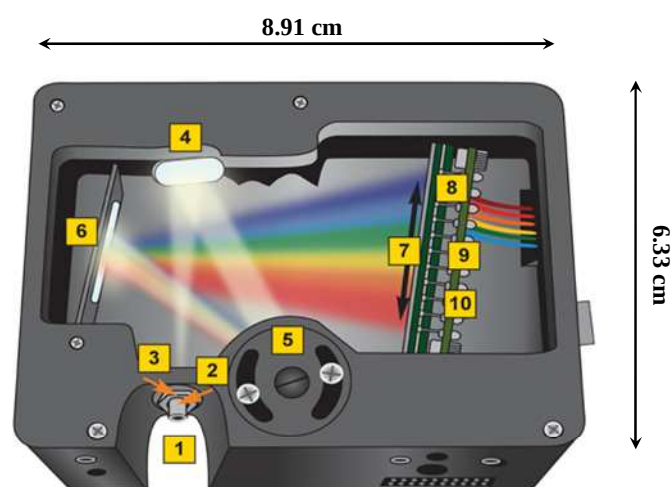
Dažniausiai fluorescencijos žadinimui yra naudojamas šviesą emituojantis diodas



2.42 pav. Šviesolaidinis šviesos šaltinis LS-450 (Ocean Optics)

(LED). Jis yra įtvirtinamas specialiai parengtame korpuse, kuriame yra visi reikalingi optiniai ir mechaniniai elementai šviesolaidžio prijungimui prie šviesos šaltinio. Paveiksle 2.42 pavaizduotas optinei biopsijai naudojamas šviesos šaltinis. Tai yra vieno bangos ilgio šviesos šaltinis, nors jo emituojamos spinduliuotės spektro plotis siekia 10–15 nm. Jo viduje įmontuotas 5 mm skersmens šviesos diodas, kurį galima pakeisti kito bangos ilgio šviesos diodu. Visi optinės biopsijos aparatūros elementai (šviesos šaltinis, spektrometras, spektrinės sudėties modifikavimo sistema) turi standartines jungtis, per kurias galima prijungti šviesolaidžius. Dažniausiai naudojama SMA 905 tipo jungtis. Prie šio šviesos šaltinio tiesiogiai jungiamas žadinimo šviesolaidis, kuriuo spinduliuotė nuvedama iki audinio. Kartais žadinančios spinduliuotės kelyje yra įmontuojama spektrinės sudėties modifikavimo sistema, užtikrinanti žadinančios spinduliuotės spektro siaurumą. Naudojant LED'us tai nėra būtina, nebent norima „nupjauti“ ilgabangį LED spinduliuojamos juostos kraštą, kad jis nepersidengtų audinio fluorescencijos juosta.

Fluorescencijos žadinimo–surinkimo sistemos pasirinkimas priklauso nuo tiriamos vietos bei keliamų tikslų. Dažniausiai tai būna bifurkacinė šviesolaidinė sistema su įvairių tipų antgaliais. Siekiant sumažinti šviesos intensyvumo nuostolius, šviesolaidinės žadinimo–surinkimo sistemos yra gaminamos su stacionariais antgaliais, todėl, norint atlikti kito tipo tyrimą, reikia keisti visą žadinimo–surinkimo sistemą (bifurkacinį šviesolaidį). Tam tikrais atvejais gali būti naudojami užmaunami vienkartiniai sterilūs (plastikiniai, stikliniai ir kt.) antgaliai. Audinio optinis atsakas – fluorescencija – surinkimo atšaka eina į detektorius. Čia būtinai yra reikalinga spinduliuotės spektrinės sudėties modifikavimo sistema, kurioje yra nufiltruojama žadinančioji spinduliuotė. Iš šios sistemos nufiltruotas optinis signalas eina į



2.43 pav. USB2000+ (*Ocean Optics*) šviesolaidinis spektrų registravimo įrenginys

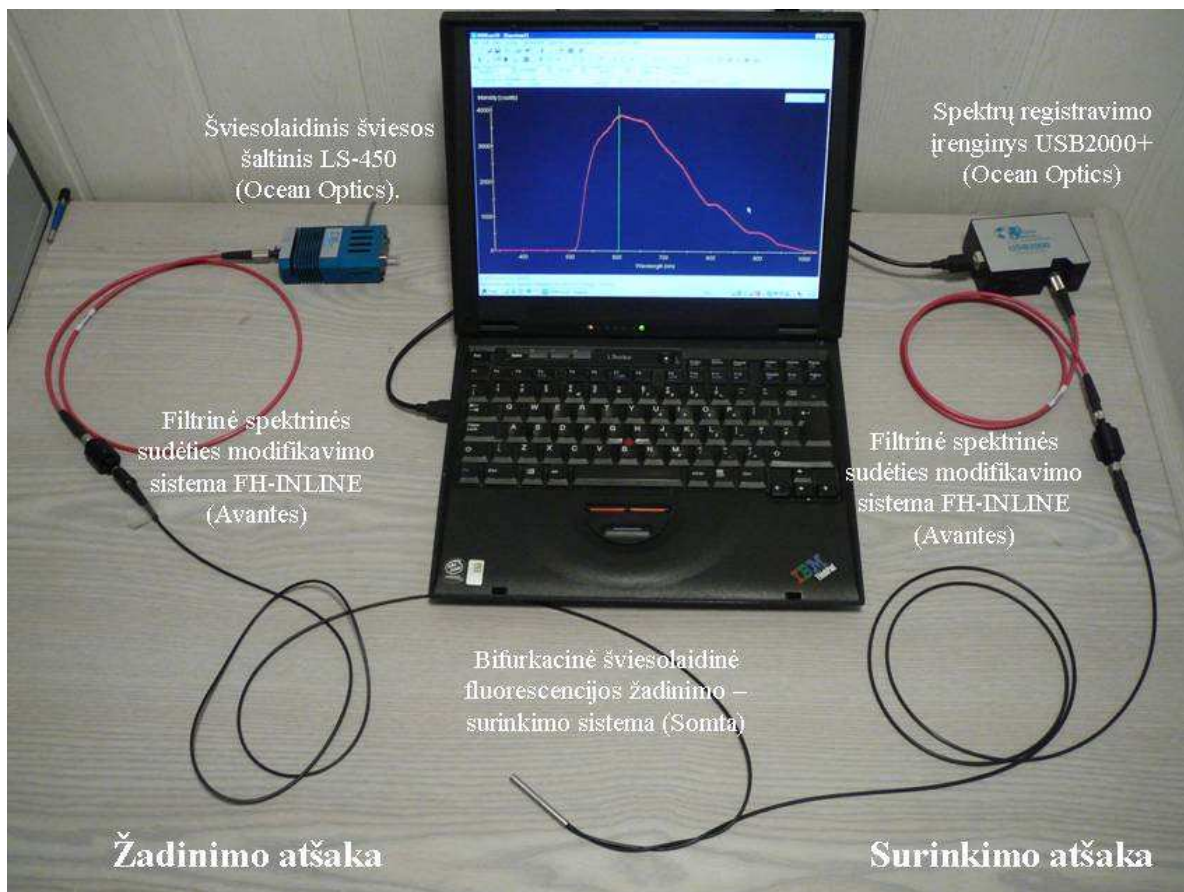
spektrų registravimo įrenginį. Šviesolaidiniame optinės biopsijos prietaise nėra spinduliuotės išskaidymo į spalvas įrenginio – monochromatoriaus, tačiau, norint užregistruoti spektrą, jis yra būtinas. Taigi, kaip tai atliekama? Šviesolaidiniame prietaise visi detektavimui reikalingi komponentai yra spektrų registravimo įrenginyje. Paveiksle

2.43 pavaizduotas USB2000+ (*Ocean Optics*) spektrų registravimo įrenginys. Spinduliuotė iš šviesolaidžio per SMA 905 jungtį (1) patenka į prietaisą. Šviesos srautas įėjime yra apribojamas specialaus plyšio (2), kurio plotis gali būti nuo kelių mikronų iki kelių šimtų mikronų. Nuo šio plyšio priklauso skiriamoji geba. Kuo siauresnis plyšys, tuo ji geresnė, tačiau tuo mažiau šviesos patenka į spektrų registravimo įrenginį, todėl mažėja prietaiso jautrumas. Daugeliu atvejų biologinio objekto fluorescencija yra silpna, todėl dažnai yra pasirenkamas didesnis plyšys (200–400 μm) sumažinant prietaiso skiriamąją gebą. Kartais, kai naudojami ploni šviesolaidžiai (200 μm), plyšio galima ir nemontuoti, mat paties šviesolaidžio skersmuo yra toks kaip plyšio plotis. Jeigu prietaisas bus naudojamas išskirtinai tik vienam tikslui, tada galima tiesiog į įėjimą įtaisyti žadinančiosios spinduliuotės nepraleidžiantį fluorescencijos filtrą (3). Tokiu atveju fluorescencijos surinkimo atšakai bus nereikalinga spektrinės sudėties modifikavimo sistema. Toliau spinduliuotė besiskėsdama sklinda iki sferinio veidrodžio (4), kuris suformuoja lygiagretų pluoštą. Atsispindėjusi (jau lygiagrečiu pluoštu) šviesa krinta į difrakcinę gardelę (5). Čia vyksta spinduliuotės išskaidymas. Kaip minėta, difrakcinės gardelės paskirtis ir yra išskaidyti spinduliuotę į spalvas (bangos ilgius).

Renkantis spektrų registravimo įrenginį reikia nuspręsti, kurioje spektrinėje srityje bus registruojami spektrai, nes pagal tai reikia pasirinkti difrakcinę gardelę. Taip pat reikia pasirinkti ir rėžių skaičių gardelėje, nes nuo to priklauso skiriamoji geba. Šiuo atveju didesnis rėžių skaičius lems geresnę skiriamąją gebą, tačiau tokia gardelė bus galima registruoti siauresnį bangos ilgių diapazoną. Pavyzdžiui, jei įėjime esame pasirinkę 200 μm pločio plyšį ir gardelę, kurioje yra 1200 rėžių/mm, tai jos skiriamoji geba bus $\sim 1,5$ nm ir ja bus galima registruoti ~ 220 nm pločio spektrą (pavyzdžiui, nuo 400 nm iki 620 nm). Atitinkamai pasirinkus gardelę, kurioje yra 600 rėžių/mm, turėsime ~ 4 nm skiriamąją gebą ir galėsime registruoti ~ 500 nm pločio spektrą. Difrakcinės gardelės į spalvas išskaidyta spinduliuotė toliau sklinda link veidrodžio (6) ir nuo jo atsispindėjusi krinta į detektorių (10) – CCD elementą. Šiuo atveju detektorių galima įsivaizduoti kaip daugybę mažų eilute išdėstytų detektoriukų. Viena CCD elemente gali būti 102, 256, 1024, 2048 arba 3648 registravimo elementai (detektoriukai). Išskleista spinduliuotė krinta ant visų registravimo elementų ir vienu metu yra užregistruojamas platus spektras. Taigi išryškėja dar vienas šviesolaidinės optinės biopsijos sistemos privalumas, palyginus ją su sudėtingais spinduliniais prietaisais, kuriuose vienu metu yra registruojamas tik vienas bangos ilgis. Šiuo atveju optinei biopsijai atlikti užtenka 1–3 sekundžių. Deja, jeigu tiriamoji vieta fluorescuoja labai silpnai, tokiais

detektoriais dažniausiai nepavyksta užfiksuoti signalo. Registravimo elementų skaičius detektoriuje nulemia skiriamąją gebą. Kuo daugiau detektoriaus elementų, tuo geresnė skiriamoji geba, tačiau nukenčia jautrumas. Atitinkamai detektorius su mažesniu skaičiumi registravimo elementų pasižymi didesniu jautrumu ir prastesne skiriamąja geba. Tad renkantis prietaisą reikia nuspręsti, kurie prietaiso parametrai yra svarbesni. Kadangi patys registravimo elementai yra labai maži, tai tik dalis krintančios šviesos bus užregistruojama. Siekiant padidinti registravimo efektyvumą, priešais CCD elementą gali būti montuojamas specialus cilindrinis lęšis (7), kuris krintančią spinduliuotę sufokusuoja į registravimo elementą – taip yra užregistruojama beveik visa atėjusi spinduliuotė. Taip pat prieš detektorių gali būti montuojamas papildomas filtras (8), skirtas aukštesnių difrakcijos eilių šviesos, atsirandančios dėl difrakcinės gardelės ypatybių, eliminavimui. Aukštesnių difrakcijos eilių šviesa pasižymi tuo, kad antros eilės mėlyna spalva yra maždaug toje vietoje, kur pirmos eilės yra raudona spalva. Kadangi mus domina tik pirmos difrakcijos eilės šviesa, tai aukštesnių eilių šviesą reikia nufiltruoti.

Paskutinis parametras, kurį reikėtų apsvarstyti renkantis šviesolaidinės optinės biopsijos sistemos spektrų registravimo įrenginį, yra detektoriaus įėjimo langelis (9). Skirtumas yra toks: jei spektrai bus registruojami, UV srityje yra naudojamas kvarcinis langelis, jei ne – paprasto stiklo.



2.44 pav. Šviesolaidinė optinės biopsijos sistema. Kairėje pusėje yra fluorescencijos žadinimo atšaka, sudaryta iš šviesos šaltinio, filtrinės spektrinės sudėties modifikavimo sistemos bei bifurkacinės šviesolaidinės sistemos žadinimo atšakos; dešinėje pusėje yra fluorescencijos surinkimo atšaka, sudaryta iš bifurkacinės šviesolaidinės sistemos surinkimo atšakos, filtrinės spektrinės sudėties modifikavimo sistemos ir spektrų registravimo įrenginio

Taigi nesudėtingiems optinės biopsijos taikymams labai patogi yra nedidelė, paprasta, mobili šviesolaidinė sistema (2.44 pav.). Tai ypač pravartu, kai reikia atlikti optinę biopsiją nevaikščiojantiems arba sunkiai vaikščiojantiems pacientams. Turint tokį mobilų prietaisą, kuris nesunkiai gali būti nugabentas iš vienos vietos į kitą, smarkiai prasiplečia optinės biopsijos taikymo galimybės – ankstyvoji įtartinų vietų diagnostika gali būti atliekama net ir lankant pacientus namuose. Šviesolaidinė sistema taip pat labai patogi registruojant sensibilizuotąją fluorescenciją, kai registruojamo signalo intensyvumas yra gana didelis, tačiau kai, signalo intensyvumas yra labai mažas ir reikia itin jautrių detektorių, tenka grįžti prie sudėtingų stacionarių prietaisų.

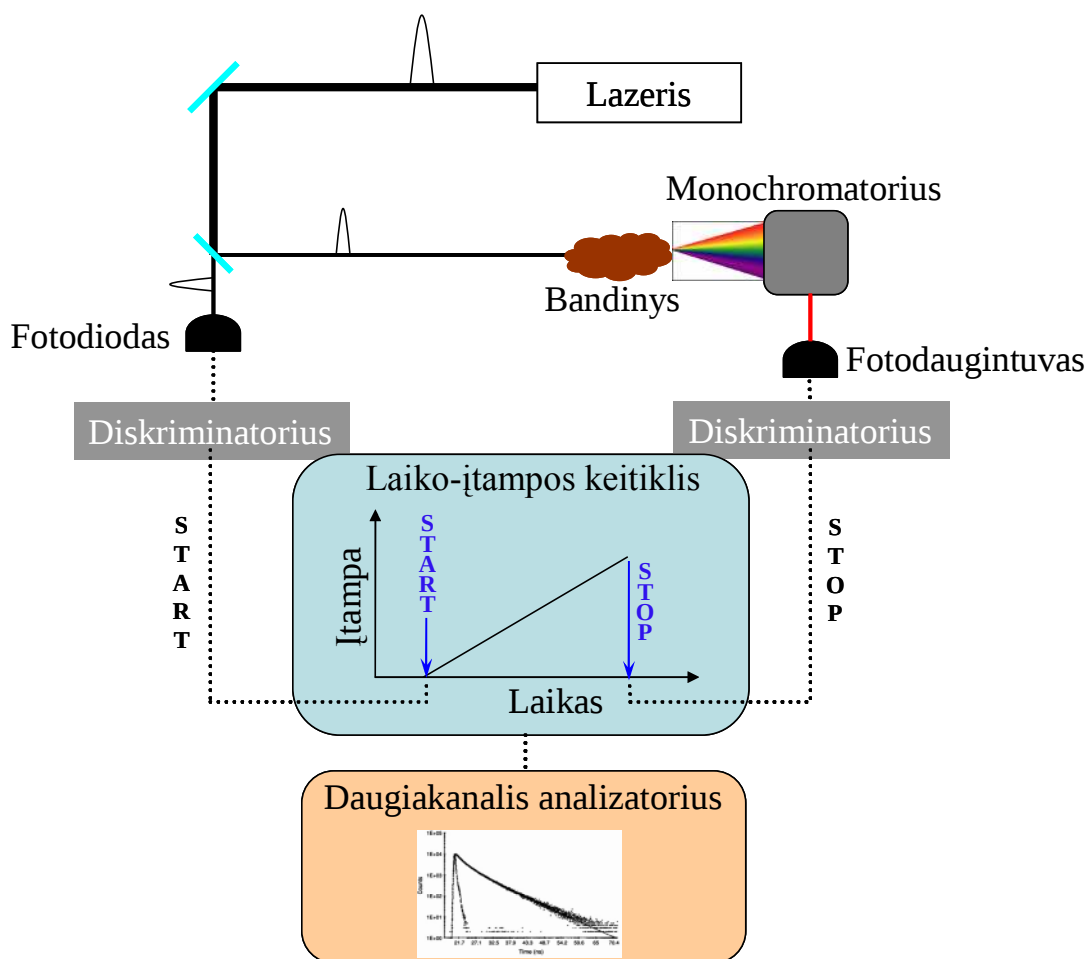
2.6. Optinė biopsija su laikine skiriamąja geba

Atskira optinės biopsijos sritis yra diagnostika su laikine skyra. Biologiniame objekte už optinį atsaką yra atsakingos kelios molekulės – fluoroforai, tad atskirti jas nuostoviosios optinės biopsijos metodais yra labai sunku, nes jų fluorescencijos spektrai dengia vieni kitus. Tačiau kiekviena iš fluorescuojančių molekulių turi tik jai būdingą švytėjimo trukmę,

t. y. viena molekulė gali fluorescuoti truputį ilgiau už kitą. Taigi, užregistravus bendrą švytėjimo trukmę, matematiniais metodais galima įvertinti, kiek skirtingų tipų molekulių (kiekvienas tipas turi būdingą švytėjimo trukmę) sukėlė fluorescencijos spektrą.

Įprasta biologinių objektų fluorescencijos trukmė yra nanosekundžių eilės, todėl jai užregistruoti reikia atitinkamos sistemos ir metodikos. Optinei biopsijai su laikine skyra dažniausiai yra naudojami dviejų tipų metodai – laikiniai, arba impulsiniai, ir dažniniai. Dirbant laikiniais (impulsiniais) metodais audinys yra apšviečiamas žadinančios spinduliuotės impulsu (blyksniu). Impulso trukmė turi būti kuo trumpesnė, t. y. daug trumpesnė už tiriamųjų molekulių fluorescencijos trukmę. Registruojamas švytėjimo intensyvumo mažėjimas (gesimas) laikui bėgant ir iš gauto grafiko duomenų skaičiuojama fluorescencijos gesimo trukmė τ . Gesimo trukmė suprantama kaip laikas, per kurį švytėjimo intensyvumas nuo maksimalios vertės (pradiniu laiko momentu $t = 0$) sumažėjo $1/e$ karto. Atliekant šiuos matavimus fluorescencija dažniausiai yra registruojama pro poliarizatorių, orientuotą $54,7^\circ$ kampą nuo vertikalios ašies. Taip daroma siekiant atsiriboti nuo molekulių judėjimo (persiorientavimo, sukimosi) ir anizotropijos poveikio fluorescencijos gesimui. Alternatyvūs metodai – dažniniai arba fazės moduliavimo. Šiuo atveju bandinys yra apšviečiamas moduliuto intensyvumo žadinančiąja spinduliuote, t. y. šviesos intensyvumas keičiamas nuo maksimalaus iki tam tikro minimalaus. Toks intensyvumo keitimas atliekamas daug kartų ir labai greitai (vienas intensyvumo sumažinimas ir padidinimas užtrunka keletą nanosekundžių). Tokia moduliuta šviesa sužadinta molekulė atsakys taip pat – jos fluorescencija bus tai labai stipri, tai labai silpna. Užregistravę abi spinduliuotes (žadinančiąją ir fluorescenciją), pastebėsime, kad maksimalus fluorescencijos intensyvumas registruojamas truputį vėliau nei maksimalus žadinančiosios spinduliuotės intensyvumas. Kitaip tariant, maksimalus fluorescencijos intensyvumas atsiranda truputį vėliau nei žadinančiosios spinduliuotės. Taip yra todėl, kad sužadinta molekulė ne iš karto duoda optinį atsaką. Šitas laiko skirtumas tarp maksimalių intensyvumų yra užregistruojamas kaip fazių poslinkis, kuriuo remiantis skaičiuojama molekulės švytėjimo gesimo trukmė.

Šiuo metu fluorescencijos gyvavimo trukmių matavimams dažniausiai yra naudojami impulsiniai metodai. Iš visų impulsinių metodų plačiausiai taikomas per laiką koreliuotų



2.45 pav. Per laiką koreliuotų pavienių fotonų skaičiavimo eksperimento schema: lazerio impulsas padalijamas į dvi dalis, kurių viena paleidžia laiko–įtampos keitiklį, o kita sužadina bandinį. Keitiklis ima kaupti įtampą, o ją sustabdo bandinio molekulės išspinduliuotas fluorescencijos fotonas, kurį užregistruoja fotodaugintuvas. Trukmę tarp į fotodiodą atėjusio impulso ir fotodaugintuvu užregistruoto fotono atitinkanti įtampos vertė įrašoma daugiakanaliu analizatoriumi. Atlikus eksperimentą daug kartų, gaunamas laikinis fluorescencijos trukmės pasiskirstymas (fluorescencijos gesimo kinetika)

pavienių fotonų skaičiavimas (angl. *time correlated single photon counting* TCSPC). Aptarsime jį plačiau ir susipažinsime su fluorescencijos gyvavimo trukmių registravimo aparatūra. Principinė TCSPC schema pavaizduota 2.45 paveiksle. Tyrimas prasideda žadinimo impulso generavimu. Didelio pasikartojimo dažnio lazeris siunčia ultratrumpuosius impulsus į bandinį. Dalis lazerio impulso šviesos atskeliama pluošto dalikliu ir kreipiama į fotodiodą, kuris generuoja elektroninį impulsą. Šis impulsas toliau patenka į diskriminatorių, kuris iš diodo impulso generuoja skaitmeninį elektroninį impulsą, vadinamą „starto“ impulsu. „Starto“

impulsas patenka į vadinamąjį laiko–įtampos keitiklį ir jį paleidžia. Laiko–įtampos keitiklis yra prietaisas, išskiriantis įtampą, proporcingą laiko tarpui tarp dviejų elektroninių signalų („start“ ir „stop“). „Stop“ signalas atsiranda tada, kai bandinys išspinduliuoja fluorescencijos fotoną. Jį užregistruoja jautrus fotodaugintuvas, kurio išėjimo signalas irgi pereina diskriminatorių ir patenka į laiko–įtampos keitiklį. Atėjęs signalas, kuris sustabdo įtampos kilimą, vadinamas „stop“ signalu. Taip laiko–įtampos keitiklyje atsiranda įtampa, proporcinga laiko tarpui tarp „starto“ ir „stop“ fotonų pasirodymo, arba, paprasčiau tariant, trukmei tarp bandinio sužadavimo ir fotono išspinduliavimo. Ši įtampa užrašoma daugiakanaliame analizatoriuje, kuriame naudojant analoginį–skaitmeninį keitiklį ji yra pakeičiama į laiką. Čia reikėtų priminti, kad audinyje esančios to paties tipo molekulės fluorescencijos fotoną išspinduliuos nebūtinai tuo pačiu metu. Priklausomai nuo daugybės veiksnių, viena molekulė jį išfluorescuos po 1 ns, o kita to paties tipo molekulė gali fluorescuoti net po 5 ns ir dar vėliau. Kiek molekulių fluorescavo po 1 ns, 2 ns ir t. t., skaičiuoja daugiakanalis analizatorius. Šis analizatorius – tai elektroninis prietaisas, kuris paskirsto įtampas (kurios atitinka tam tikras trukmes) į kanalus pagal jų vertę, pavyzdžiui, įtampos nuo 0 iki 0,1 V (kurios atitinka 1 ns trukmę) pakliūva į pirmąjį kanalą, nuo 0,1 iki 0,2 V (atitinka 2 ns trukmę) – į antrąjį ir t. t. Kiekvienas kanalas turi su juo susietą skaitiklį, kurio vertė padidinama vienetu, jei į jį pakliūva įtampa. Taip registruojama fluorescencijos gesimo histograma: kanalai, kurie atitinka dažniausias fluorescencijos sulaikymo trukmes, sukaupia didžiausias vertes (jų skaitikliai suveikia dažnai), o rečiausias vertes atitinkantys kanalai „pamato“ vos keletą fotonų. Paprastai matavimas vyksta tol, kol kuriame nors kanale yra suskaičiuojama 10 000 fotonų.

Šis elektroninis metodas labai patogus, kai žadinimui naudojami didelio impulsų pasikartojimo dažnio lazeriai. Molekulę sužadinus lazerio impulsu, po tam tikro laiko tarpo Δt ji išspinduliuos fotoną. Jei pavyktų pamatuoti Δt daugelį kartų, gautos vertės pasiskirstytų pagal tikimybę, jog molekulė išspinduliuos fotoną tam tikru laiko momentu. Tai ir atliekama per laiką koreliuotų pavienių fotonų skaičiavimo eksperimentą.

TCSPC metodas – elektroninis metodas, taigi pagrindinis jo trūkumas – nelabai gera laikinė skyra. Pažymėkime, kad ją riboja ne detektorių (fotodiodo, fotodaugintuvo) atsako laikas: diskriminatoriai registruoja ne patį atsaką, bet generuoja sinchronizacijos impulsą tada, kai detektoriaus įtampa pasiekia tam tikrą procentą maksimalios įtampos. taigi, net jei diodo atsakas į lazerio impulsą užtrunka kelias mikrosekundes, jei tik jo forma tobulai pasikartoja tarp skirtingų impulsų, paklaidos nebus ir bus galima registruoti nanosekundžių ir pikosekundžių trukmės vyksmus. Paklaidas sąlygoja vadinamasis „tirtėjimo“ (angl. *jitter*)

triukšmas, t. y. detektoriaus atsako formos kitimas nuo impulso iki impulso. Praktikoje TCSPC metodika leidžia pasiekti apie 50 ps laikinę skyrą. Kaip dar vieną trūkumą, galima paminėti tai, jog metodas yra iš esmės vienspalvis: vienu metu registruojamas fluorescencijos gesimas ties vienu bangos ilgiu, o norint registruoti platų spektrą, reikia matuoti daugelį bangos ilgių paeiliui.

Tačiau TCSPC metodika turi svarbių privalumų: jai nereikia didelių lazerio intensyvumų (netgi priešingai – impulsų energijos negali būti per didelės, nes visas metodas grindžiamas prielaida, kad iš kiekvieno impulso bandinys išspinduliuoja tik vieną fluorescencijos fotoną, kurį registruoja detektorius), beveik visai nesvarbus lazerio stabilumas (t. y. net jei lazerio impulsų energijos svyruoja labai smarkiai, pavyzdžiui, du kartus). Kadangi metodas yra kaupiamasis, galima skaičiuoti fotonus tol, kol signalo–triukšmo santykis pasieks norimą ribą ir iš gautų duomenų bus galima gana tiksliai nusakyti gyvavimo trukmės. Be to, šis metodas yra pigus, palyginti su kitais laiko skyros fluorescencijos metodais. Jis ypač išpopuliarėjo, kai atsirado diodiniai lazeriai, galintys generuoti apie 100 ps trukmės impulsus.