

3. BIOLOGINIŲ AUDINIŲ OPTINĖ BIOPSIJA

Optinė biopsija – tai optinė diagnostinė technologija, apimanti daugybę diagnostikos rūšių, galimų taikyti įvairiems tikslams, kurių svarbiausieji yra: diagnozuoti ligą, nustatyti tikslią vietą, iš kur imti mėginį, ir matuoti fiziologinius parametrus. Svarbiausios optinės biopsijos technologijos dažniausiai grindžiamos tokiais fizikiniais reiškiniais: savitąja fluorescencija, sensibilizuota fluorescencija, Ramano spektroskopija, elastine sklaida, konfokaline mikroskopija, optine koherentine tomografija ir kt. Technologijos nuolatos vystomos ir tobulinamos, jų taikymo sritys plečiasi. Viena iš plačiausiai šiuo metu klinikinėje praktikoje naudojamų yra savitąja fluorescencija grįsta optinė biopsija. Ji taikoma vėžio ligų ir ikivėžinių audinių pokyčių diagnostikai, aterosklerozinių plokštelių formavimosi kraujagyslėse tyrimui, širdies ritmo sutrikimus sukeliančių priežasčių širdies audiniuose nustatymui, dantų ėduonies formavimosi kontrolei.

3.1. Savitąja fluorescencija grįsta optinė biopsija vėžio diagnostikai

Ši optinės biopsijos rūšis remiasi tiriamųjų audinių endogeninių fluoroforų optiniu sužadinimu ir jų fluorescencijos stebėjimu, nes vėžio pažeistų audinių savitosios fluorescencijos spektrai skiriasi nuo sveikų audinių (Alfano ir kt., 1984; Alfano ir kt., 1987; Bottioli ir kt., 1995). Kadangi ląstelėse vykstant ligos sukeltiems pokyčiams kokybiškai ir kiekybiškai kinta ir endogeninių fluoroforų būklė, registruojant audinių savitosios fluorescencijos spektrus, galima aptikti navikinius darinius. Dažniausiai navikinių darinių diagnozavimas ir tikslus naviko ribų nustatymas susijęs su svarbiausiųjų endogeninių fluoroforų – aminorūgščių (triptofano, tirozino), struktūrinių baltymų (kolageno, elastino), ląstelių kvėpavimo grandinės dalyvių (NADH, flavinų) pokyčiais. Fluorescuoja tik redukuota nikotinamidadenindinukleotido forma (NADH), tad ligos sukeltų oksiduotos–redukuotos formų koncentracijų pokyčius galima identifikuoti registruojant NADH fluorescencijos intensyvumo kitimą.

Endogeninių fluoroforų spektrinės savybės priklauso nuo jų lokalizacijos audinių struktūroje ir dalyvavimo ląstelių medžiagų apykaitoje, todėl, taikant savitąja audinių fluorescencija grįstus diagnostinius metodus, reikia atsižvelgti į tokius parametrus:

- endogeninių fluoroforų koncentraciją;
- kiekvieno atskiro fluoroforo fluorescencijos spektrą;
- fluoroforų pasiskirstymą audinyje, nes skirtinguose audinio sluoksniuose (epitelyje, gleivinėje, pogleivyje ir raumenyje) yra skirtinga endogeninių fluoroforų sudėtis ir koncentracijos;
- fluoroforų oksidacinę–redukcinę būklę;
- audinio pH vertę ir deguonies koncentraciją, nes nuo jų priklauso fluorescencijos kvantinis našumas ir spektro forma;
- audinių morfologiją, nes, pavyzdžiui, navikui augant, storėjantis epitelio sluoksnis dėl fluorescencijos reabsorbcijos silpnina fluorescenciją;
- kraujotaką tiriamame audinyje, nes nefluorescuojantis, bet šviesą sugeriantis hemoglobinas gali sugerti ir dalį endogeninių fluoroforų spinduliuojamos fluorescencijos ir iškreipti tikrąjį fluorescencijos spektro vaizdą.

Labai svarbu tinkamai parinkti fluorescencijos žadinimo ir registravimo bangų ilgius. Aromatinės aminorūgštys sužadinamos tik UV raudono šviesa, kitus fluoroforus galima žadinti regimosios šviesos raudono spinduliuote.

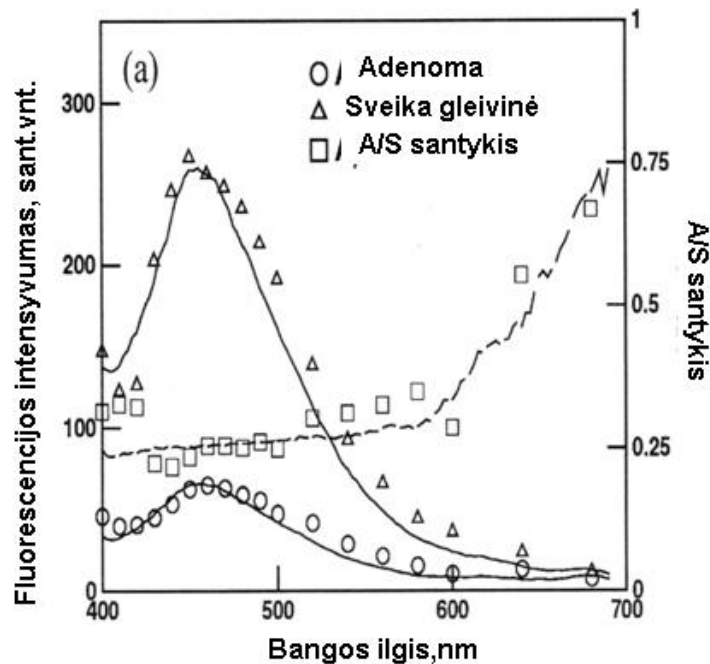
Prieš kelis dešimtmečius pradėti pirmieji optinės biopsijos moksliniai tyrinėjimai teikė vilčių galimai navikų diagnostikai ir skatino tolesnius navikinių audinių savitosios fluorescencijos tyrimus *in vitro* ir *in vivo*. Fluorescencinė diagnostika imta taikyti beveik visų organų navikams aptikti.

3.1.1. Virškinimo trakto organų vėžys

Atlikti virškinimo trakto organų optinę biopsiją yra sudėtingas uždavinys, nes ji komplikuoja įvairios aplinkybės, sukeliančios audinių savitosios fluorescencijos pokyčius. Tai gali būti lėtinės nepiktybinės ligos (pavyzdžiui, Barretto stemplės displazija), taip pat užteršimas maisto liekanomis ar gleivėmis; fluorescencijos matavimus taip pat sunkina didelis ir labai judrus organų paviršius.

Gana sėkmingai savitą fluorescenciją grįžta optinė biopsija gali būti taikoma diagnozuojant gleivinės displaziją. Displazija yra patologinė ikivėžinė audinio būklė. Ji dažniausiai vystosi tuščiavidurių organų (virškinimo trakto, gerklų, šlapimo pūslės, gimdos kaklelio, bronchų) paviršiaus gleivinėse. Kadangi tokie pirminiai ankstyvos vėžio

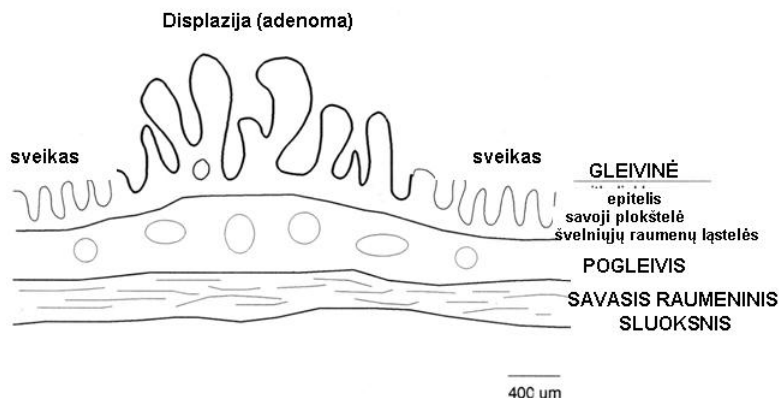
stadijos sukelti pokyčiai plika akimi yra nematomi, ieškoma patikimų juos aptikti padedančių instrumentinių metodų. Tyrinėjant sveikų ir displazijos pažeistų gleivinių fluorescencines savybes, nustatyta, kad jos yra skirtingos. Gaubtinės žarnos displazija – adenoma – yra ankstyvoji stadija, iš kurios išsivysto įvairios žarnyno vėžio rūšys. Matuojant audinių fluorescenciją į kolonoskopą įdėtas šviesolaidis siekė įtariamą vietą. Fluorescencija buvo žadinama silpnu 370 nm bangos ilgio lazerio spinduliuotės 1 ns trukmės impulsu, o registruojama 400–700 nm spektriniame ruože. Trumpesnių bangų spektro ruože sveiko audinio fluorescencijos intensyvumas yra didesnis negu displazijos pažeisto, tačiau ilgesnių bangų srityje adenoma fluorescuoja intensyviau negu sveikas audinys (3.1 pav.) (Zonios ir kt., 1998).



3.1 pav. Žarnos audinio savitosios fluorescencijos spektras ir diagnostinio algoritmo sprendimo rezultatai. Adaptuota pagal (Zonios ir kt., 1998)

Audinio fluorescencija susijusi su jo biochemine sudėtimi ir struktūra. Prasidėjus displazijai vyksta šių parametrų pokyčiai, o dėl jų kinta audinio optinės savybės – šviesos sugertis, sklaida ir, žinoma, fluorescencijos charakteristikos. Šitie pokyčiai gali būti panaudoti diagnostikos tikslams. Tam reikia žinoti įvairių fluorescuojančių mikrostruktūrų spektrus, tų mikrostruktūrų išsidėstymą audinyje, taip pat audinio sugerties ir sklaidos savybes. Taigi, jei galima pagal atskirų mikrostruktūrų savybes sumodeliuoti spektrus, tai turėtų būti galimas ir atvirkščias vyksmas – pamatavus *in vivo* spektrus gauti informaciją apie audinio fluorescencijos pokyčius ir su jais susijusias patologijas. Tad audinių optinės savybės patologui gali suteikti kiekybinės histologinės informacijos ir padėti kuo tiksliau nustatyti diagnozę.

Metodas buvo taikytas tiriant gaubiamosios žarnos adenomą (Zonios ir kt., 1998). Trumpai aptarsime žarnos morfologiją. Žarnos sieną sudaro trys pagrindiniai sluoksniai: gleivinė, pogleivio sluoksnis ir savasis raumeninis žarnos sluoksnis (*muscularis propria*) (3.2 pav.). Bendras šių sluoksnių storis paprastai būna apie 5 mm. Kadangi fluorescencijos žadinimui naudojama šviesa įsiskverbia į audinius tik maždaug iki pusės milimetro, informacija bus gaunama tik iš dviejų viršutinių sluoksnių – gleivinės ir pogleivio. Gleivinės sluoksnio paviršius yra dantytas, sudarytas iš „kriptų“ – siaurų pailgų cilindrinę struktūrų, padengtų epitelio ląstelėmis. Jas palaiko gleivinės savoji plokštelė (*lamina propria*), sudaryta iš daug kolageno turinčio jungiamojo audinio. Pogleivio sluoksnį sudaro tankesnis kolageno turintis jungiamasis audinys, kuriame nėra epitelio ląstelių. Gleivinę ir pogleivį skiria plonas švelniųjų raumenų ląstelių sluoksnis (*muscularis mucosa*).



3.2 pav. Žarnos gleivinės displazijos (adenomos) skerspjūvis

Sveikos gleivinės storis yra maždaug 450 μm . Pradėjus vystytis displazijai, tvarkinga kriptų struktūra suyra, ima kisti jų forma ir dydis. Kriptos pradeda nekontroliuojamai daugintis ir perauga jungiamąjį audinį. Be to, kadangi didėja deguonies poreikis, ima formotis naujų mikrokraujagyslių tinklas. Gleivinės displazija gali būti dviejų formų – polipų ir plokščia. Ir viena, ir kita forma priskiriama adenomai. Kriptų ląstelės dažniausiai ima proliferuoti į viršų (vertikaliai) ir užauga net kelių milimetrų skersmens ataugos (3.2 pav.). Polipinė adenoma tiesiog „pakimba” į pilvo ertmę. Plokščialąstelinės adenomos pažaidos plinta į šonus. Abi formos, nors vystosi skirtingai, histologiškai yra identiškos. Plokščialąstelinę adenomą vizualiai atskirti nuo sveikos gleivinės yra labai sunku, tad aptikti ją endoskopinės apžiūros metu beveik neįmanoma.

Tiriant audinių mikrostruktūrų fluorescenciją nustatyta, kad gleivinėje silpnai fluorescavo kolagenas ir eozinofilai, o pogleivio sluoksnyje kolagenas fluorescavo gana intensyviai (Zonios ir kt., 1998). Be to, buvo pastebėta, kad displazijos pažeistų kriptų epitelio ląstelės, kitaip nei sveikų kriptų, fluorescavo. Šis reiškinys aiškinamas ne iki galo vykstančia hemo sinteze hiperaktyviose proliferuojančiose ląstelėse. Gautieji rezultatai leido sukurti supaprastintą žarnos fluorescencijos vaizdą, kuriame visas audinys laikomas elastinės sklaidos matrica, į kurią įspraustos fluorescuojančios mikrostruktūros.

Kiekvienos mikrostruktūros fluorescencijos spektrai ($\phi_i(\lambda)$) buvo pamatuoti mikrofluorimetriškai. Tad nuspėjamas klinikinis spektras $F(\lambda)$ buvo gautas susumavus visų fluorescuojančių struktūrų įnašą į bendrą fluorescenciją:

$$F(\lambda) = \sum \int \phi_i(\lambda) D_i(z) T(\lambda, z) dz \quad (3.1)$$

čia: $D_i(z)$ – kiekvienos mikrostruktūros (i) pasiskirstymas audinio gylyje z ; $T(\lambda, z)$ – apskaičiuota pernašos funkcija, parodanti dėl sugerties ir sklaidos žadinimo šviesos ir grįžtančios fluorescencijos silpnėjimą ties tam tikru bangos ilgiu (λ) ir tam tikrame audinio gylyje (z).

Tokiomis sąlygomis sumodeliuoti spektrai puikiai sutapo su pamatuotų klinikinių sveikų ir adenomos pažeistų audinių bandinių spektrų vidurkais (3.1 pav.). Šis modelis leido apibrėžti keturis faktorius, su kuriais susiję pastebėti spektriniai pokyčiai:

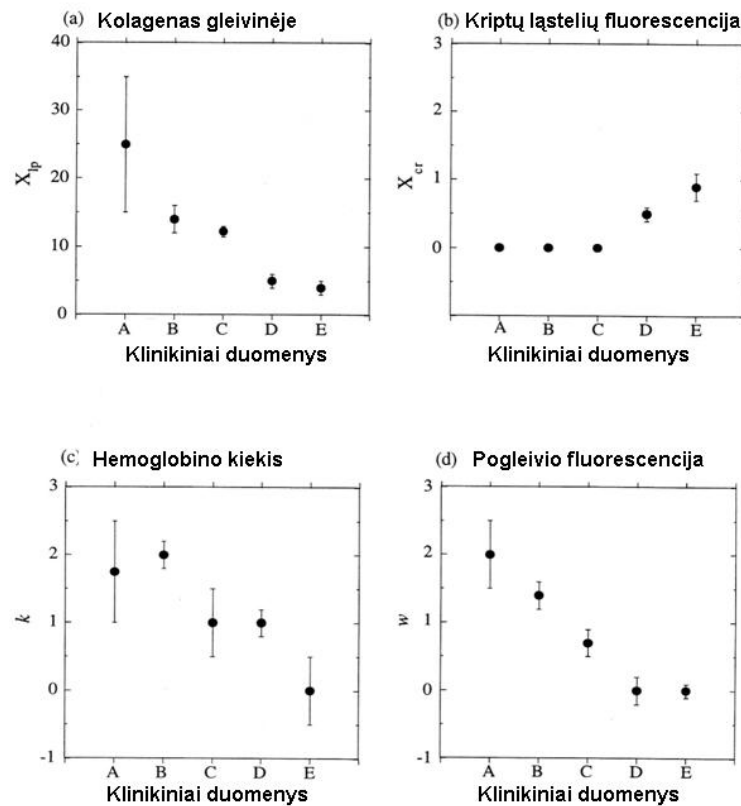
- būdinga displazijos kriptų epitelio ląstelių fluorescencija;
- dėl kriptų sankaupos sumažėjusi gleivinės kolageno fluorescencija;
- dėl padidėjusios hemoglobino sugerties sumažėjusi adenomos fluorescencija;
- pogleivio sluoksnio įnašas į fluorescenciją, kai matuojama sveiko ir naviko pažeisto audinio fluorescencija (naviko paveiktas sustorėjęs epitelio sluoksnis silpnina pogleivio fluorescencijos intensyvumą).

Visi šie veiksniai susiję su audinio histologinėmis savybėmis. Sėkmingas spektrų modeliavimas atveria naujas galimybes – iš realiai pamatuotų fluorescencijos spektrų gauti histologinę informaciją.

Pagal sukurtą modelį (3.1) lygtis buvo modifikuota panaudojant kitus parametrus, tiesiogiai susijusius su audinių histologinėmis savybėmis: χ_{CR} atspindi epitelinių displastinių ląstelių fluorescencijos intensyvumą ir nusako kriptų epitelinių ląstelių išsigimimo laipsnį; χ_{LP} atspindi gleivinės fluorescenciją ir nusako gleivinės kriptų tūrį; k susijęs su hemoglobino sugertimi ir informuoja apie mikrovaskuliarizacijos išplitimą; w susijęs su pogleivio fluorescencijos įnašu ir nusako gleivinės sluoksnio storį.

Modelis pritaikomas individualiems spektrams nustatant geriausiai tinkančias keturių parametrų vertes. Pateikiamas pavyzdys, kaip sukurtasis modelis buvo pritaikytas penkiems konkrečioms (A–E) tyrimo atvejams (Zonios ir kt., 1998). Iš tiriamų audinių buvo ir sveikų, ir adenomos pažeistų (3.3 pav.).

Paveiksle 3.3 a parodytas dydis x_{LP} , atitinkantis kolageno kiekį gleivinėje. Autorių atliktų matavimų rezultatų apibendrinimas rodo, kad sveikų žarnų audinio šio dydžio vidurkis yra apie 11, o adenomos audinio – apie 6. Taigi bandiniai A, B ir C patenka į sveikųjų grupę, o D ir E – į adenomos pažeistų. Sumažėjęs kolageno kiekis šiuose mėginiuose, matyt, susijęs su tuo, kad displazijos kriptų epitelinės ląstelės užima gleivinėje didesnę tūrį, palyginti su sveika gleivine. Patologijos požįriu tai vertinama dėl adenominių pokyčių atsiradusių kriptų išsidėstymo pakitimu. Bandinių A, B ir C kriptų epitelinės ląstelės ne fluorescuoja, o bandinių D ir E – fluorescuoja (3.3 pav. b). Tai taip pat sutampa su ankstesniame pavyzdyje pateiktais rezultatais.



3.3 pav. Histologiniai parametrai, gauti iš penkių tyrimo pavyzdžių, taikant sukurtąjį modelį. Adaptuota pagal (Zonios ir kt., 1998)

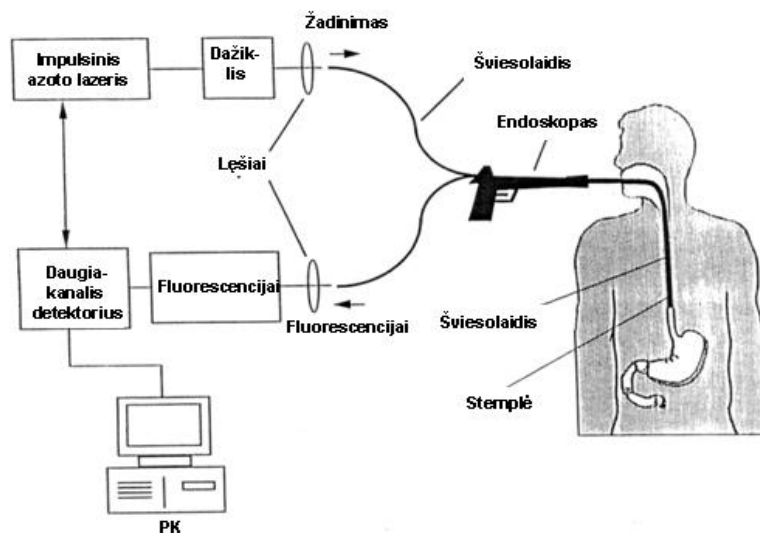
Dėl hemoglobino sugerties didėjantis šviesos silpninimas dėsningai mažėja nuo bandinio A iki E. Tai rodo, kad labiausiai vaskuliarizuotas yra bandinys E (3.3 pav. c).

Paveiksle 3.3 d matyti parametro w mažėjimas bandiniuose nuo A iki E, t. y. sveikame audinyje pogleivio sluoksnio įnašas į fluorescenciją yra didesnis; storėjant gleivinės sluoksniui, pogleivio įtaka fluorescencijai mažėja.

Tokie pradiniai klinikinių tyrimų rezultatai teikia vilčių, kad iš fluorescencijos spektrų gauti duomenys gali būti panaudoti audinio histopatologinei būklei nustatyti neimant bandinio. Taigi – tai vienas iš optinės biopsijos pavyzdžių.

Optinės biopsijos galimybių taikymo stemplės vėžio ir displazijos diagnostikai studija buvo vykdyta tiriant 100 pacientų. Atlikus per 500 matavimų ir pritaikius skirtuminių fluorescencijos spektrų normavimą, gauti rezultatai puikiai sutapo su histopatologinių tyrimų duomenimis (Vo-Dinh ir kt., 1998; Panjehpour ir kt., 1996).

Matavimams naudota aparatūra pavaizduota 3.4 paveiksle). Audinių savitoji fluorescencija buvo žadinama impulsiniu azoto lazeriu kaupinamo dažų lazerio 410 nm bangos ilgio spinduliuote. Šviesa į stemplę buvo nukreipiama per į endoskopą 5d4t1 bifurkacinį šviesolaidį, kurio žadinimo atšaką sudarė septynios, o emisijos – dvylika 200 μm skersmens skaidulų. Detektoriumi buvo fotodiodinė liniuotė su spektrografu.



3.4 pav. Stemplės savitosios fluorescencijos *in vivo* matavimų aparatūros schema

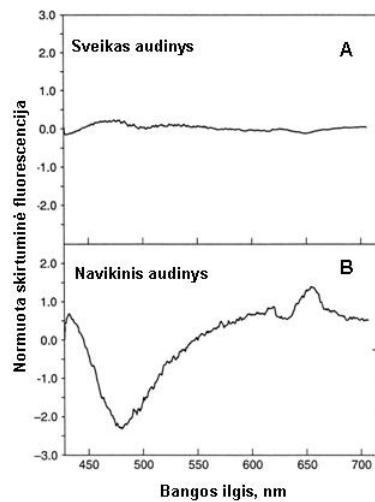
^viesolaidžio antgalis švelniai lietė tiriamojo audinio paviršių. Sistemos programa leido matuoti audinio fluorescenciją po kiekvieno lazerio impulso; duomenys buvo kaupiami kompiuterio bazėje. Kiekvieno tiriamojo audinio taško matavimas truko maždaug 0,6 s.

Sveikų ir piktybinių pakitimų paliestų audinių fluorescencijos spektruose tam tikruose spektriniuose ruožuose yra skirtumų. Bendras dėsningumas toks, kad ligos pažeistų audinių fluorescencijos intensyvumas mažesnis nei sveikų audinių, tačiau juo pasikliauti ne visada galima, nes didelę įtaką daro įvairūs kiti aplinkos parametrai: kraujotaka, hemoglobino sugertis, audinio paviršiaus morfologija, atstumas tarp audinio paviršiaus ir šviesolaidžio antgalio.

Daugelio įvairių studijų autoriai taip pat nustatė, kad navikinių audinių savitosios fluorescencijos intensyvumas beveik visada yra mažesnis už sveikų audinių, nepriklausomai nuo to, kokie yra audiniai. Šis reiškinys pastebėtas raumenyse (Ankerst ir kt., 1984; Svanberg ir kt., 1986), smegenų parenchimoje (Andersson-Engels ir kt., 1989), burnos gleivinėje (Andersson-Engels ir kt., 1990), gimdos kaklelyje (Lohmann ir kt., 1989; Glassman ir kt., 1992), bronchuose (Hung ir kt., 1991).

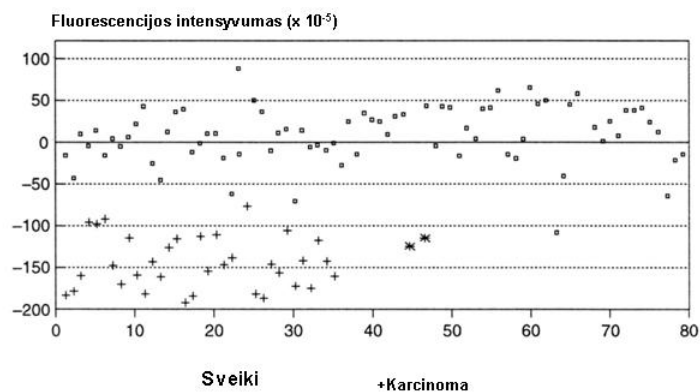
Norint geriau išryškinti nedidelius, bet esminius sveiko ir piktybinio darinio pažeisto audinio spektrų skirtumus, buvo sukurta spektrų apdorojimo technologija, daranti diagnostiką tikslesnę (Vo-Dinh ir kt., 1998). Technologija pagrįsta spektrų normavimu. Kiekvienas pamatuotas fluorescencijos spektras normuojamas į integruotą viso spektro intensyvumą, tad jis tampa nepriklausomas nuo intensyvumo. Kitas svarbus tokio normavimo dalykas – jis išryškina smulkias silpno fluorescencijos intensyvumo spektro detales. Tai ypač svarbu matuojant piktybinių pažaidų paliestų audinių spektrus, kurių fluorescencija yra labai silpna. Po normavimo sveikų ir ligos pažeistų audinių spektrų skirtumai yra daug labiau pastebimi.

Sveikos stemplės gleivinės ir stemplės adenokarcinomos normuoti fluorescencijos spektrai pateikiami 3.5 paveiksle. Navikinio audinio spektre (B) atsiradęs fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas ties 470–480 nm rodo, kad pažeistame audinyje nebėra šios srities šviesą emituojančių fluoroforų. Ši „negatyvi“ fluorescencijos juosta yra svarbus piktybinių pažaidų diagnostikos kriterijus.



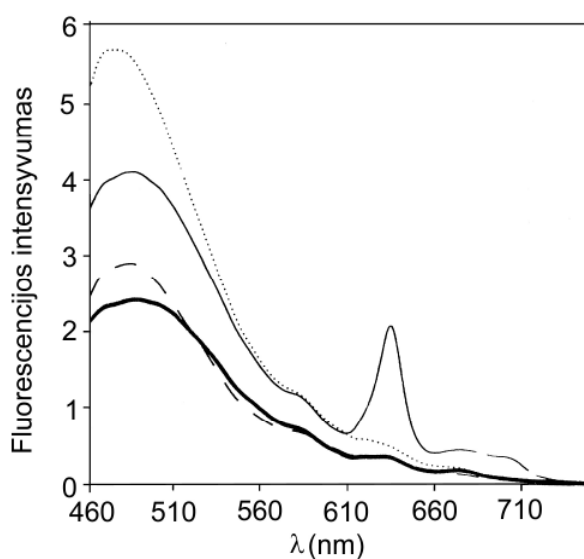
3.5 pav. Sveikos stemplės gleivinės ir stemplės adenokarcinomos normuoti skirtuminiai fluorescencijos spektrai. Adaptuota pagal (Vo-Dinh ir kt., 1998)

Kadangi normuoti sveikų audinių fluorescencijos spektrai buvo labai panašios formos, sukurtas sveikų audinių „bazinis“ spektras – normuotų sveikų audinių fluorescencijos spektrų vidurkis. Tolesniuose matavimuose su šiuo baziniu spektru buvo lyginami visi kitų audinių spektrai. Vėliau rezultatai buvo patvirtinami histopatologiniais tyrimais. Gauti duomenys pateikiami 3.6 paveiksle. Audinių klasifikavimas į sveikus ir karcinomos pažeistus pagal skirtuminę normuotą fluorescenciją puikiai sutampa su histologiniais rezultatais (sutapimas viršija 98 %) (Vo-Dinh ir kt., 1998).



3.6 pav. Skirtuminės normuotos fluorescencijos (ties 480 nm) ir klinikinių rezultatų priklausomybė. Pagal histologinių tyrimų duomenis audiniai skirstyti į sveikus (•) ir karcinomą (+). Ženklu (*) pažymėti audiniai pradžioje klasifikuoti kaip sveiki, vėliau – kaip vėžiniai. Adaptuota pagal (Vo-Dinh ir kt., 1998)

Sukurta nemažai ir kitų įvairių algoritmų, tinkamų taikyti darant žarnyno audinių savitosios fluorescencijos spektrų analizę (Kapadia ir kt., 1990; Schomacker ir kt., 1992), remiantis fluoroforų sudėtimi ir audinių sluoksnių sukeltu šviesos silpninimu, modeliuoti savitosios fluorescencijos spektrai (Romer ir kt., 1995; Fiarman ir kt., 1995). Vėlesnių stadijų navikuose aptinkama raudona porfirinų fluorescencija, kurios priežastis gali būti didesnė porfirinų koncentracija navikiniuose audiniuose arba jų sankaupa ant audinio



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

paviršiaus dėl bakterijų veiklos (Bottiroli ir kt., 1995). Sveikų ir adenomos bei karcinomos pažeistų žarnų audinių mėginių savitosios fluorescencijos spektrų vidurkiai pateikiami 3.7 paveiksle (Marchesini ir kt., 1992). Karcinomos audinių spektre matyti endogeniniams porfirinams būdinga fluorescencijos juosta ties 635 nm.

Barretto metaplazijoms atskirti nuo navikinių darinių buvo pasitelkti

fluorescenciniai endoskopiniai matavimai (Bourg-Heckly ir kt., 2000). Žadinant fluorescenciją 330 nm bangos ilgio šviesa, Barretto metaplazijos pažeistos stemplės gleivinės savitosios fluorescencijos intensyvumas yra mažesnis negu sveikos, bet spektro forma išlieka nepakitusi, tačiau spektro formos pokyčiai būdingi vėlyvosios stadijos displazijai ir gleivinės karcinomai. Siekiant toliau analizuoti duomenis, buvo taikomi savitosios fluorescencijos intensyvumų ties 390 nm ir 450 nm (kolageno ir NADH), 550 nm ir 450 nm (flavinų ir NADH) bei 390 nm ir 550 nm (kolagenų ir flavinų) santykiai. Pažaidų tipo nustatymo jautrumas buvo 86 %, o specifiškumas – 95 %.

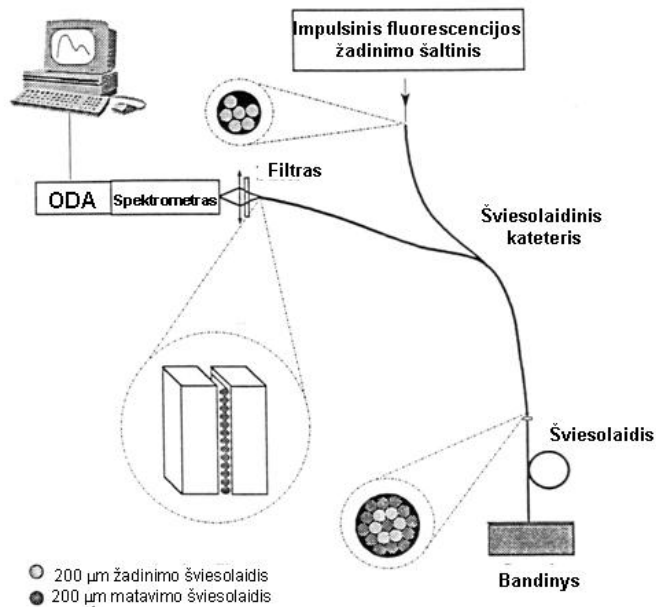
Apibendrinant galima teigti, kad savitąją fluorescenciją grįstos žarnyno vėžio optinės biopsijos yra tokie bendrieji dėsningumai: prasidėję piktybiniai pokyčiai pasireiškia žarnų gleivinės sustorėjimu ir dėl to silpnėja pogleivyje esančio kolageno fluorescencijos intensyvumas; naviką maitinantis sutankėjęs mikrokraujagyslių tinklas dėl didesnės hemoglobino sugerties sukelia iš gilesnių audinių sluoksnių sklaidžiamos fluorescencijos spektro netikslumus 500–600 nm srityje; dėl vėlesnių stadijų navikams būdingos endogeninių porfirinų fluorescencijos padidėja gleivinės savitoji fluorescencija raudonojoje spektro srityje.

3.1.2. Šlapimo pūslės vėžys

Dažniausiai šlapimo pūslės navikai yra paviršiniai, išsidėstę pūslės gleivinėje ir pogleivio sluoksnyje. Daugelis jų yra papildiniai egzofitai, augantys į pūslės vidų; jie gana nesunkiai aptinkami apžiūrint endoskopiškai. Be papildinių egzofitinių darinių, šlapimo pūslėje gali būti plokščių neoplazijų, displazijų ar karcinomų *in situ* (CIS). Ikiinvazinį vėžį – karcinomą *in situ* – diagnozuoti įprastos cistoskopinės apžiūros metu yra labai sunku, nes šios plokščios šlapimo pūslės sienos pažaidos baltoje šviesoje beveik neįmanoma pastebėti. Dariniai jau gali būti susiformavę tose pūslės srityse, kurios dar atrodo visiškai sveikos. Tad laiku aptikti CIS ar kitus neoplazinius darinius yra labai svarbu, nes nuo to priklauso tolesnis ligos vystymasis ir gydymo sėkmė.

Savitąją fluorescenciją grįsta optinė biopsija buvo taikyta ieškant vėžio pažeistų sveikų ar šlapimo pūslės gleivinės uždegimo vietų spektrinių skirtumų (Anidjar ir kt., 1998). Fluorescencija žadinta trijų bangos ilgių (480 nm, 337 nm ir 308 nm) šviesa. Matavimo aparatūros schema pateikta 3.8 paveiksle. Iš viso tirti 25 asmenys (19 vyrų ir

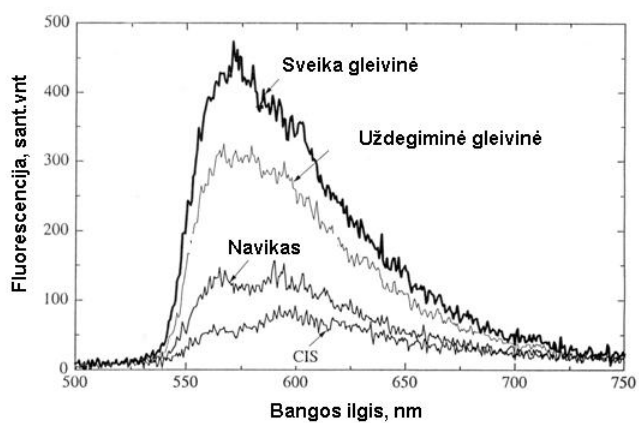
6 moterys), tirtų vietų fluorescenciniai duomenys lyginti su histologinių tyrimų rezultatais. Fluorescencijos spektrai matuoti 25 sveikai atrodančių šlapimo pūslės gleivinės vietų, 15 įtartinais atrodančių paraudusių vietų ir 26 plika akimi matomų navikų (16 papildinių ir 10 plokščių navikų). Penki CIS atvejai taip pat buvo tirti savitosios fluorescencijos spektroskopijos metodu – trys atvejai aptikti sveikai



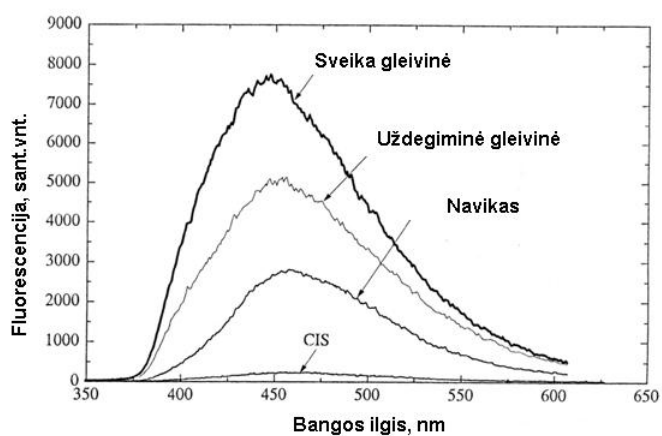
3.8 pav. Šlapimo pūslės audinių fluorescencijos *in vivo* matavimo schema

atrodančioje gleivinėje, kiti du – įtartinais atrodančiose paraudusiose vietose. Šlapimo pūslės gleivinės įvairių vietų savitosios fluorescencijos spektrai, matuoti žadinant fluorescenciją trimis skirtingais bangų ilgiais, pateikti 3.9–3.11 paveiksluose

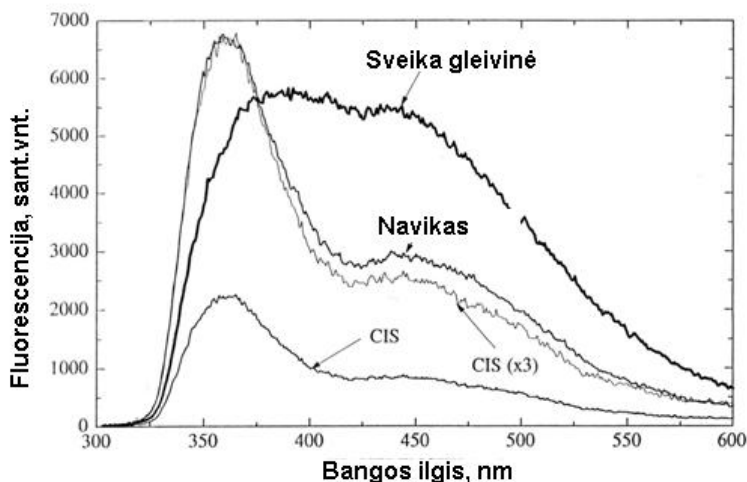
Pamatuoti, žadinant fluorescenciją dažų lazerio 480 nm bangos ilgio spinduliuote, sveikos, įtartinais atrodančios (paraudusios dėl nespecifinio uždegimo) gleivinės vietos, vizualiai aptikto naviko ir CIS fluorescencijos spektrai yra panašios formos, turintys vieną ryškesnę juostą su smaile ties maždaug 580 nm. Visų pažeistų vietų fluorescencijos intensyvumas buvo mažesnis negu sveikos gleivinės (3.9 pav.). Taigi, lyginant fluorescencijos intensyvumus, būtų galima atskirti sveiką gleivinę nuo uždegimo ir nuo naviko pažeistos, tačiau vertinti sunkiau todėl, kad, žadinant 480 nm bangos ilgio šviesa, fluorescencijos intensyvumas yra labai silpnas.



3.9 pav. Šlapimo pūslės sveikos, nespecifinės uždegiminės gleivinės, naviko ir CIS pažeistos vietos savitosios fluorescencijos spektrai *in vivo* ($\lambda_{\text{žad.}}=480$ nm)



3.10 pav. Šlapimo pūslės sveikos, nespecifinės uždegiminės gleivinės, naviko ir CIS pažeistos vietos savitosios fluorescencijos spektrai *in vivo* ($\lambda_{\text{žad.}}=337$ nm)



3.11 pav. Šlapimo pūslės sveikos gleivinės, naviko ir CIS pažeistos vietos savitosios fluorescencijos spektrai *in vivo* ($\lambda_{\text{žad.}}=308$ nm)

Gerokai didesnis fluorescencijos intensyvumas gautas matuojant savitąją fluorescenciją, sužadintą azoto dujų lazerio skleidžiama 337 nm ilgio spinduliuote (3.10 pav.). Visų matuotų vietų savitosios fluorescencijos spektrai taip pat yra beveik identiškos formos su smaile ties maždaug 450 nm. Audinių fluorescencijos intensyvumas mažėja nuo sveikos gleivinės iki CIS.

Paveiksle 3.11 pateikti sveikos gleivinės, cistoskopijos metu matomo navikinio darinio ir CIS savitosios fluorescencijos spektrai, gauti žadinant 308 nm bangos ilgio XeCl eksimerinio lazerio spinduliuote. Sveikos gleivinės spektrą sudaro plati juosta su neryškiomis smailėmis ties 380 ir 440 nm. Visų navikinių darinių spektrai, neatsižvelgiant į jų išsivystymo stadiją, labai skiriasi nuo sveikos gleivinės spektro. Jiems būdingos dvi gana ryškios fluorescencijos juostos su smailėmis ties 360 ir 440 nm. Ypač ryški pirmoji smailė. Visoms kreivėms būdinga įduba ties 420 nm. CIS fluorescencijos intensyvumas labai mažas.

In vivo pamatuotų šlapimo pūslės sveikos ir naviko pažeistos gleivinės savitosios fluorescencijos spektrų skirtumai gali būti priskiriami skirtingų fluoroforų raiškiai. Žadinant 480 nm spinduliuote gautos plačios fluorescencijos juostos ties 580 nm greičiausiai yra oksiduotų flavoproteinų fluorescencija. Daug mažesnis navikinių darinių fluorescencijos intensyvumas rodo, kad juose yra mažesnė oksiduotų flavoproteinų

koncentracija. Tokie duomenys sutampa su senokai atliktais tyrimais, kuriais nustatyta, kad dėl sumažėjusio deguonies kiekio navikuose būna mažesnė oksiduoto riboflavino koncentracija (Pollack ir kt., 1942).

Fluorescenciją žadinant 337 nm bangos ilgio spinduliuote, visuose spektruose (3.10 pav.) išryškėjusi fluorescencijos juosta ties 450 nm priskiriama NADH (NADH fluorescencijos žadinimui 337 nm bangos ilgio šviesa yra optimali (Chance ir kt., 1962)). Tiek žadinant 480 nm, tiek 337 nm spinduliuote gautas fluorescencijos intensyvumo mažėjimas, susijęs su sumažėjusiomis oksiduotų flavoproteinų ir NADH koncentracijomis navikiniuose dariniuose, leidžia daryti išvadą, kad šlapimo pūslės navikiniuose dariniuose yra pakitę oksidaciniai–redukciniai medžiagų apykaitos vyksmai (Pollack ir kt., 1942).

Nors NADH žadinti tinkamiausia yra 337 nm šviesa, 308 nm bangos ilgio šviesos privalumas tas, kad ji sužadina ir kitus fluoroforus, emituojančius kitoje spektro srityje. Pavyzdžiui, sveikos šlapimo pūslės gleivinės plačiame fluorescencijos spektre yra ir neryški smailė ties 380 nm (3.11 pav.). Šios smailės tiesiogiai priskirti baltymų sudėtyje esančiam triptofanui (Trp) negalima, nes jo emisijos smailė yra maždaug ties 350 nm. Tad greičiausiai čia fluorescuoja kolagenas, kurio fluorescencijos smailė yra ties 390 nm (kai $\lambda_{\text{žad}} = 335$ nm) (Schomacker ir kt., 1992). Sveikoje šlapimo pūslės gleivinėje matyt fluorescuoja gleivinės savojoje plokštelėje (*lamina propria*) esančios kolageno skaidulos.

Visų navikinių darinių, neatsižvelgiant į jų vystymosi stadiją, fluorescencijos spektrai, matuoti žadinant 308 nm spinduliuote, aiškiai skiriasi nuo sveikos gleivinės spektrų ir yra pastumti jų atžvilgiu į trumpųjų bangų pusę su smaile ties 360 nm, kuri galėtų būti priskiriama Trp. Ryškus fluorescencijos intensyvumo mažėjimas ilgesniųjų bangų pusėje liudija, kad kolageno įnašas į fluorescenciją smarkiai mažėja. Tai atsitinka todėl, kad gleivinės savųjų plokštelių emisiją ekranuoja dėl navikinių darinių sustorėjęs urotelio sluoksnis.

Tiesioginį fluorescencijos intensyvumą matuoti sunkiau dėl įvairių aplinkos veiksnių, tad patogiau yra rezultatus vertinti pagal intensyvumų ties tam tikrais bangų ilgiais santykį: $R = I_{360}/I_{440}$. Tokiu atveju abiem intensyvumų matavimams vienodą poveikį daro matavimo sąlygų parametrai. Kitas privalumas yra tas, kad hemoglobino sugerties koeficientai ties 360 nm ir 440 nm yra beveik vienodi, o sklaidos koeficientai

šiam spektro ruože beveik nekinta (Das ir kt., 1993). Tad santykio skirtumai atsiranda dėl skirtingų audiniuose esančių endogeninių fluoroforų (Trp, NADH) fluorescencijos kvantinių našumų skirtumų. Taigi fluorescencijos intensyvumų ties dviem bangos ilgiais santykis ($R = I_{360}/I_{440}$) žadinant fluorescenciją ties 308 nm gali būti sėkmingai taikomas šlapimo pūslės navikams diagnozuoti.

3.1.3. Gimdos kaklelio vėžys

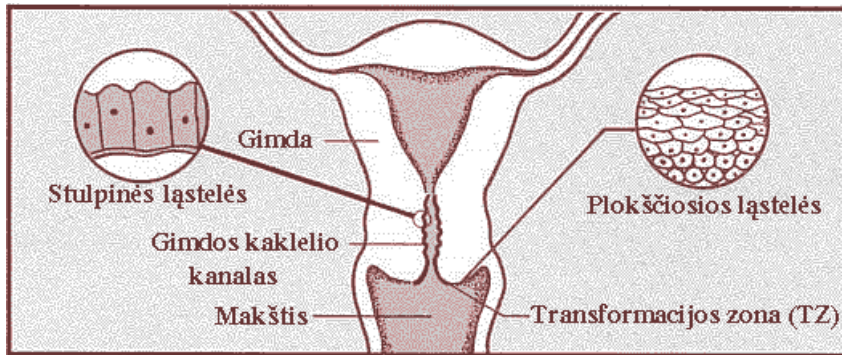
Gimdos kaklelio vėžys šiuo metu pasaulyje yra antra pagal dažnumą (po krūties vėžio) moterų onkologinė liga ir trečia pagal mirštamumą. Per metus pasaulyje šia liga susergera apie 16, o miršta 9 iš 100 000 moterų. Kasmet pasaulyje diagnozuojama apie 450 000 naujų gimdos kaklelio vėžio atvejų. Rizika susirgti gimdos kaklelio vėžiu didesnė sulaukus 30 metų, o daugiausiai serga 45–55 metų amžiaus moterys.

Gimdos kaklelio vėžio atsiradimo priežastis nėra visiškai aiški, bet, manoma, kad didžiausią reikšmę turi žmogaus papilomos virusas (ŽPV). Nustatyta apie 150 ŽPV tipų, tačiau gimdos kaklelio vėžį dažniausiai sukelia 16 ir 18 tipų virusai. Į gimdos kaklelio epitelį patekusio viruso DNR pakeičia ląstelės genomą ir paleidžia onkoproteinus, kurie yra svarbūs normaliai ląstelei transformuojantis į vėžinę.

Gimdos kaklelio vėžio diagnozė nustatoma po kruopštaus klinikinio ištyrimo, remiantis simptomais ir atliktų tyrimų rezultatais. Gimdos kaklelio vėžio nėra specifinių šios ligos simptomų. Vėlesnėse ligos stadijose simptomų atsiranda: skausmas pilvo apačioje; gausus kraujavimas iš makšties; kraujavimas iš šlapimo pūslės ir šlapinimosi sutrikimai; kraujavimas iš tiesiosios žarnos; svorio kritimas. Diagnozė patvirtinama apžiūrint kolposkopiškai, paėmus citologinį tepinėlį, atlikus histologinį biopsijos mėginio ištyrimą. Tai tyrimai, kurie trunka gana daug laiko ir jiems atlikti reikia nemažai sąnaudų. Optinės biopsijos metodas galėtų daug padėti ir supaprastinti apžiūros procedūras bei mažinti sąnaudas.

Vienas dažniausių gimdos kaklelio pakitimų yra neoplazija – sutrikęs epitelio augimas ir vystymasis. Gimdos kaklelio kanalo gleivinės paviršius dengtas vienasluoksniu stulpiniu epitelium, o į makštį išsikišusi kaklelio dalis apdengta daugiasluoksniu neragėjančiu epitelium. Daugiasluoksnis plokščiasis epitelis pereina į vienasluoksnį stulpinį kaklelio gleivinės epitelį. Riba, kur susilieja šie du epitelio tipai,

vadinama jungtimi. Senstant stulpinės ląstelės virsta plokščiosiomis ląstelėmis, jungtis kyla link gimdos kaklelio kanalo. Ši vieta vadinama transformacijos zona (TZ) (3.12 pav.) ir laikoma, kad 90–95 % atvejų gimdos kaklelio vėžys vystosi šioje zonoje.



3.12 pav. Gimdos kaklelio bei makšties epitelio struktūra

Gimdos kaklelio intraepitelinė neoplazija (CIN – *cervical intraepithelial neoplasia*) – tai ikivėžiniai epitelio pokyčiai, nuo kurių prasideda invazinis vėžys. Šie pokyčiai klasifikuojami pagal tai, kiek nediferencijuotų ląstelių yra sluoksnyje nuo savosios plokštelės iki epitelio paviršiaus. Jei jos užima visą epitelio sluoksnio storį nuo savosios plokštelės iki paviršiaus, pažaida klasifikuojama kaip karcinoma *in situ* (CIS – *carcinoma in situ*). Jei nediferencijuotos ląstelės per pamatinę membraną skverbiasi į stromą ar net pasiekia limftakius, pažaida vadinama invaziniu vėžiu.

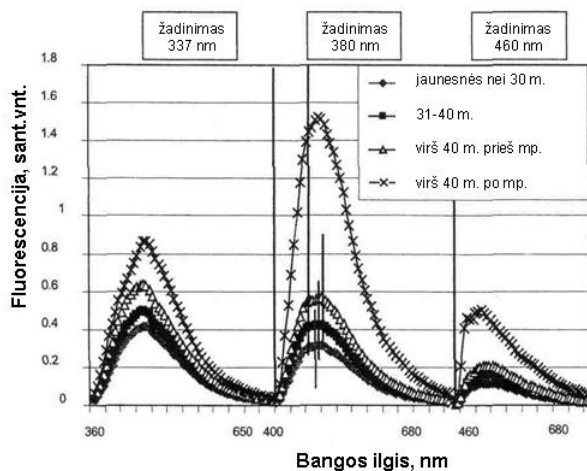
Pap (Papanicolaou) tyrimas leidžia įtarti pirminį ar metastazinį vėžį. Tepinėlis imamas ir profilaktiniais tikslais, ir įtariant ikinavikinius pakitimus. Tačiau Pap tyrimo vidurkinis jautrumas yra 58 %, o specifiškumas – 69 %. Intraepitelinė neoplazija vystosi keletą metų, kol atsiranda vėžį, tad kelioms moterims, nors ir kasmet būna atliekami tyrimai, vėžiniai pokyčiai laiku nebūna diagnozuojami. Kolposkopinės apžiūros vidurkinis jautrumas yra 96 %, specifiškumas – 48 %. Šie rodikliai liudija, kad beveik visos pažaidos yra aptinkamos, tačiau ne itin didelis specifiškumas reiškia, kad tenka atlikti daug nebūtinų biopsijų. Gana prieštaringas yra ankstyvų stadijų pažaidų identifikavimas ir gydymas, nes nežinia, kurios pažaidos išsivystys į vėžį, o kurios vėl bus normalios būklės. Optinės diagnostinės technologijos kaip tik ir galėtų čia pagelbėti. Optinė biopsija – tai priemonė, įgalinanti apžiūrėti visą epitelio tūrį *in situ* ir suteikti informacijos apie audinių biocheminę ir morfologinę būklę.

Gimdos kaklelio audinių fluoroforai. Gimdos kaklelio audiniuose aptinkami daugelis iš endogeninių fluoroforų. Tai ląstelių energijos gamybos procesuose dalyvaujantys piridino nukleotidai ir flavinai, pagrindinis elektronų akceptorius nikotinamidadenindinukleotidas, kurio redukuotoji forma NADH gerai fluorescuoja. Kitas svarbus elektronų akceptorius yra flavinadenindinukleotidas, kurio oksiduotoji forma FAD fluorescuoja. Daugelio tyrėjų pastebėtas dėsniumas, kad navikinių audinių fluorescencijos intensyvumas 500 nm spektrinėje srityje (žadinant artimojo UV ruožo šviesa) yra mažesnis negu sveikų, aiškinamas oksiduotos flavinų formos ir NADH kiekio sumažėjimu navikiniuose audiniuose. Kita grupė fluoroforų – aromatinės aminorūgšties triptofanas, tirozinas ir fenilalaninas. Intensyviausiai iš visų trijų aminorūgščių fluorescuoja triptofanas. Kai žadinimo šviesos bangos ilgis didesnis negu 295 nm, sužadinamos tik triptofano molekulės. Jei žadinama šviesa nuo 280 iki 295 nm, sužadinamos tirozino ir triptofano molekulės, tačiau dėl energijos pernašos iš tirozino į triptofaną vyrauja triptofano fluorescencija. Žadinant trumpesnėmis nei 280 nm bangomis, sužadinamos visų trijų aromatinių aminorūgščių molekulės, tačiau fenilalanino fluorescencijos kvantinis našumas, palyginti su triptofano ir tirozino, yra labai mažas.

Gimdos kaklelio audiniuose fluorescuoja ir struktūriniai baltymai kolagenas ir elastinas, kurių fluorescencijos intensyvumas susijęs su skersiniais ryšiais, kurie intensyviausiai fluorescuoja ties 400 nm.

Kaip gimdos kaklelio fluoroforai susiję su amžiumi? Sukūrus specifinį gyvo gimdos kaklelio audinio kultūros fluorescencijos matavimo metodą, buvo tirta, kaip fluorescenciją veikia pacientės amžius (Brookner ir kt., 2000) ar displazija (Drezek ir kt., 2001). Paimtų mėginių fluorescenciniai mikroskopiniai vaizdai buvo gauti praėjus 1,5–5 val. po biopsijos, o vėliau mėginiai analizuoti histopatologiškai. Iš 31 pacientės paimtų kolposkopiškai apžiūrint sveikai atrodžiusių audinių mėginių vaizdai buvo suskirstyti į tris grupes pagal epitelio ir stromos fluorescencijos intensyvumų santykį: (1) mėginiai, kurių epitelio fluorescencija daug intensyvesnė negu stromos; (2) mėginiai, kurių epitelio ir stromos fluorescencijos intensyvumai beveik vienodi ir (3) mėginiai, kurių epitelis fluorescuoja silpnai, o stroma – intensyviai. Rezultatai rodo, kad yra labai aiški gimdos kaklelio audinio fluorescencijos vaizdo ir pacientės amžiaus koreliacija (Brookner ir kt., 2000): kuo moteris vyresnė, tuo silpniau fluorescuoja epitelis ir intensyviau fluorescuoja

stroma. Histologiniai tyrimai parodė, kad stromoje yra daug kolageno. Kadangi kolageno fluorescencija susijusi su skersinių ryšių kiekiu, o jų audiniuose su amžiumi daugėja, tokia koreliacija yra biologiškai pagrįsta. Be to, tos pačios studijos duomenimis, su amžiumi plonėja gimdos kaklelio epitelio sluoksnio storis (Brookner ir kt., 2000). Tai paaiškina ir didesnę *in vivo* matuojamų vyresnio amžiaus moterų gimdos kaklelio audinių savitosios fluorescencijos intensyvumą (3.13 pav.). Žadinant fluorescenciją trijų bangos ilgių (337, 380 ir 460 nm) šviesa, vyresnio amžiaus ir pomenopauzės periodo moterų gimdos kaklelio audinių savitoji fluorescencija yra intensyviausia. Tokių matavimų metu į epitelį krintanti žadinimo šviesa turi prasiskverbti pro jį ir pasiekti stromą. Plonėjantis vyresnio amžiaus moterų epitelio sluoksnis sudaro geresnes sąlygas skverbti šviesai į stromą ir žadinti kolageną.



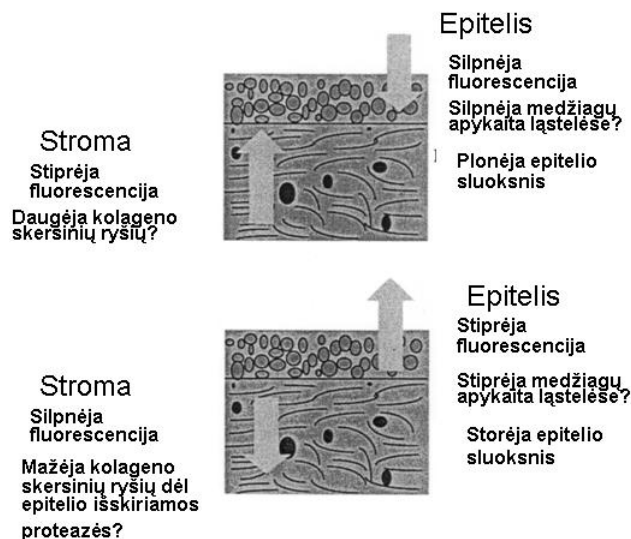
3.13 pav. Įvairaus amžiaus pacienčių gimdos kaklelio audinių savitosios fluorescencijos spektrai, pamatuoti žadinant fluorescenciją ties 337, 380 ir 460 nm. Adaptuota pagal (Brookner ir kt., 2000)

Tos pačios studijos metu buvo matuota dviejų gimdos vėžio ląstelių kultūrų (HeLa ir SiHa), žmogaus papilomos viruso infekuotų ląstelių (TCL-1) ir sveikų gimdos kaklelio ląstelių (CrEC-Ec) suspensijų fluorescencijos žadinimo–emisijos matricos (Brookner ir kt., 2000). Keturių fluorescencijos smailės priskiriamos trimis fluoroforams: triptofanui, NADH ir FAD. Didžiausio intensyvumo smailė ties 300 nm, gaunama žadinant 290 nm ilgio šviesa, priskiriama triptofanui. Kita smailė ties 370 nm ($\lambda_{\text{žad.}}=440$ nm) priklauso NADH ir FAD, o smailė ties 530 nm ($\lambda_{\text{žad.}}=370$ ir $\lambda_{\text{žad.}}=450$) – FAD. Triptofano

fluorescencija du kartus intensyvesnė negu NADH, kuris savo ruožtu fluorescuoja 4–7 kartus intensyviau už FAD.

Kita studija buvo skirta tyrimams, kaip fluoroforų fluorescencijos intensyvumas kinta vystantis displazijai (Drezek ir kt., 2001). Displazijos vietoje epitelio fluorescencijos intensyvumas didesnis negu sveiko audinio, o stromos fluorescencijos intensyvumas akivaizdžiai sumažėja. Norint įsitikinti, kokie metaboliniai pokyčiai turi įtakos fluorescencijos intensyvumų kitimui, buvo tirta audinių oksidacinė–redukcinė būklė. Epitelio ląstelių fluorescencijos intensyvumo padidėjimas priskiriamas dėl suintensyvėjusio metabolizmo padidėjusiam NADH kiekiui ir dėl to intensyvesnei jo fluorescencijai žadinant 380 nm ilgio šviesa. Pakitusios epitelio ląstelės gali sąveikauti su stromos kolagenu ir ardyti kolageno skersinius ryšius, o dėl to mažėja stromos fluorescencijos intensyvumas.

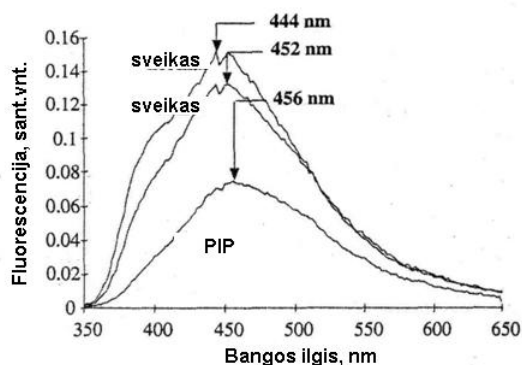
Apibendrinti dviejų aptartų studijų rezultatai, parodantys, kaip kinta gimdos kaklelio audinių fluorescencija su moters amžiumi ir vystantis displazijai, pateikti 3.14 paveiksle.



3.14 pav. Gimdos kaklelio audinių fluorescencijos pokyčiai, vykstantys dėl amžiaus (viršutinis pav.) ir vystantis displazijai (apatinis pav.) Adaptuota pagal (Richards-Kortum ir kt., 2003)

Gimdos kaklelio audinių fluorescencijos matavimai. Biologinių audinių, kuriuose yra daug fluoroforų, fluorescencijos intensyvumas ir spektro forma priklauso nuo fluorescencijos žadinimo ir registravimo bangos ilgių. Spektrai gali būti matuojami tiesiogiai arba panaudojant atitinkamus algoritmus. Fluorescencijos spektrai registruojami reikiamu bangų ilgių intervalu žadinant fluorescenciją vieno bangos ilgio šviesa. Fluorescencijos žadinimo spektrai matuojami registruojant fluorescenciją ties vienu bangos ilgiu, o žadinama plataus intervalo bangos ilgių šviesa. Iš daugelio fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrų matavimų duomenų sudaromos žadinimo–emisijos matricos (EEM, angl. *excitation–emission matrix*), kuriose matoma fluorescencijos intensyvumo priklausomybė nuo fluorescencijos žadinimo ir registravimo bangos ilgio. Tokios matricos suteikia visą informaciją apie matuojamo objekto fluorescenciją kitaip nei atskiri fluorescencijos matavimai, nes vienu bangos ilgiu negalima sužadinti visų fluoroforų.

Siekiant šį matavimo metodą pritaikyti gimdos kaklelio audinių fluorescencijos matavimui *in vivo*, pirmiausia buvo ieškoma, kokių bangos ilgių šviesa sužadinti diagnozavimui naudingiausias fluoroforus. Atlikus iš 18 pacienčių gimdos kaklelių sveikų ir įtartinų vietų paimtų mėginių EEM matavimus, nustatyta, kad didžiausi sveikų ir pažeistų audinių fluorescencijos spektrų skirtumai gaunami, kai žadinama ties 340, 380 ir 460 nm. Ypač tinkamas yra 340 nm bangos ilgis. Remiantis šiais rezultatais, buvo sukonstruota matavimo sistema, įgalinanti matuoti fluorescenciją *in vivo* žadinant 337 nm šviesa (Ramanujam ir kt., 1994). Vystantis displazijai, mažėja fluorescencijos intensyvumas ir juostos smailė pasislenka į ilgabangę spektro pusę (3.15 pav.).



3.15 pav. Sveikų gimdos kaklelio audinių ir plokščiakąstelinės intraepitelinės pažaidos (PIP) fluorescencinio spektrai

Bandant įsitikinti, ar žadinant fluorescenciją ties kitais bangų ilgiais bus gauta daugiau diagnostinio vertingos informacijos, matavimo aparatu buvo patobulinta taip, kad EEM būtų gaunama žadinant fluorescenciją ties 337, 380 ir 460 nm. Studijos, kurioje dalyvavo 40 moterų, rezultatai parodė, kad, norint gauti patikimus diagnostinius duomenis, įgalinančius nustatyti plokščiakąstelines intraepitelines pažaidas ir įvertinti jų stadijas, būtina matuoti ties trimis bangos ilgiais sužadintą fluorescenciją (Ramanujam ir kt., 1996).

Iš gautų rezultatų matyti, kad optinė biopsija labai padėtų nustatyti ankstyvas gimdos kaklelio neoplazijas. Tačiau, kad šis metodas būtų plačiai įdiegtas į klinikinę praktiką, reikia išspręsti ne vieną sudėtingą uždavinį. Pirmiausia reikia sukurti aparatūrą, kuri leistų optiškai patikrinti visą gimdos kaklelio epitelį ir būtų jautri ir specifiška. Taip pat būtina kuo nuodugniau išnagrinėti biologinių gimdos kaklelio audinių pokyčių sąsajas su optinių spektrų pokyčiais. Pavyzdžiui, atradus, kokius optinius pokyčius sukelia žmogaus papildomos virusas, galima būtų daug greičiau identifikuoti įtartinas pažaidas. Taip pat, žinant, kad angiogenezė yra patikimas navikinių pokyčių žymuo, nustatius angiogenezės sukeliamus spektrinius pokyčius ir sukūrus optinę aparatūrą jai identifikuoti, būtų gerokai patobulinta navikinių darinių diagnostika.

3.1.4. Plaučių ir kvėpavimo takų vėžys

Pasaulio sveikatos organizacijos duomenimis, kasmet nuo plaučių vėžio miršta maždaug 860 000 vyrų ir 330 000 moterų. Plaučių vėžys yra viena iš dažniausių mirčių nuo vėžio priežastis.

Laikoma, kad 80–90 % atveju plaučių vėžį sukelia rūkymas. Metusiems rūkyti sulaukus 55 metų lieka didelė rizika susirgti plaučių vėžiu. Maždaug pusė ligonių, kuriems diagnozuojamas plaučių vėžys, yra buvę rūkaliai. Taigi, net ir labai sėkmingai kovojant su rūkymu, plaučių vėžys artimiausius dešimtmečius bus labai rimta sveikatos problema.

Histologiškai skiriami du plaučių vėžio tipai: smulkialąstelinė ir nesmulkialąstelinė karcinoma. Nesmulkialąstelinė karcinoma gali būti skirstoma į plokščialąstelinę, stambialąstelinę ir adenokarcinomą. Plokščialąstelinė ir smulkialąstelinė karcinoma dažniausiai pasitaiko centriniuose kvėpavimo takuose, o adenokarcinoma – periferinėse bronchiolėse ir alveolėse. Adenokarcinoma dažniausiai serga moterys ir nerūkantieji.

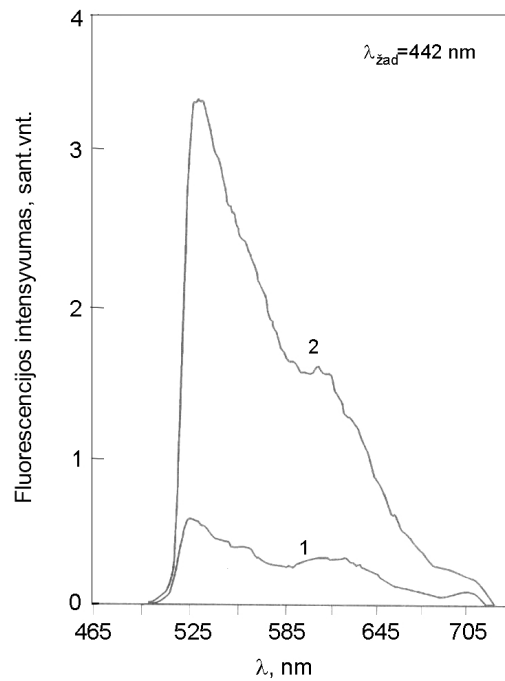
Iš nesmulkialąstelinė karcinoma susirgusių ligonių penkerius metus išgyvena apie 14 %, o iš smulkialąstelinė karcinoma – 5 % pacientų. Ilgiausiai išgyvena tie, kuriems diagnozuojamas ankstyvųjų stadijų vėžys, kurį dar galima sėkmingai išoperuoti. Deja, dažniausiai diagnozuojamas jau neoperuotinas vėlyvųjų (III arba IV) stadijų vėžys. Taigi šiuo metu ypač svarbu sukurti patikimus diagnostinius metodus, įgalinančius aptikti ir lokalizuoti ankstyvos stadijos nepradėjusį plisti plaučių vėžį.

Optiniai diagnostikos metodai ypač tinkami plaučių navikams aptikti, nes dėl plaučių audinių specifiškumo šviesos sugertis ir sklaida plaučiuose yra daug mažesnė negu kituose organuose. Ankstyvi ikinavikiniai pokyčiai ar ankstyvosios vėžio stadijos sunkiai aptinkami tradicine baltos šviesos bronchoskopija. Tokių pokyčių aptikimo tikimybė fluorescenciniais diagnostikos metodais daug didesnė.

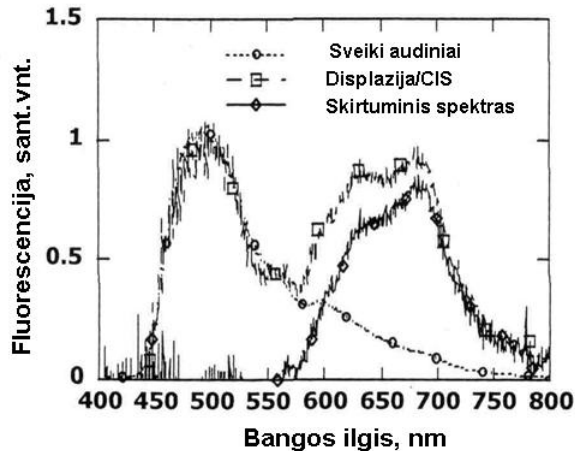
Bronchų ir bronchų navikų (vėlyvosios stadijos displazijos, karcinomos *in situ*, invazinio naviko) savitoji fluorescencija *in vivo* buvo tirta žadinimui naudojant 405 nm, 442 nm bei 488 nm šviesą (Hung ir kt., 1991). Spektrams būdingos dvi smailės ties 520 nm ir 595 nm, o fluorescencijos intensyvumas nuosekliai mažėja pereinant nuo displazijos į karcinomą *in situ* bei į invazinio naviko stadiją (3.16 pav).

Šveicarijoje tirti 48 ligoniai, kuriems jau buvo nustatytas arba įtariamas plaučių vėžys (Zellweger ir kt., 2001 a; Zellweger ir kt., 2001 b). Bronchoskopijos metu matuoti sveikų ir metaplazijos ar displazijos (CIS) pažeistų audinių savitosios fluorescencijos spektrai žadinimui naudojant 350–480 nm ruožo šviesą. Iš įtartinų vietų paimtos biopsinės medžiagos histologinių tyrimų duomenys lyginti su fluorescencijos matavimų rezultatais. Apibendrinus

tyrimo rezultatus konstatuota, kad ikinavikinių ir navikinių audinių fluorescencijos intensyvumas yra daug mažesnis negu sveikų audinių, ypač žaliojoje spektro srityje, o žadinimui geriausiai tinka 405 nm ilgio šviesa (Zellweger ir kt., 2001a). Žadinant šio bangos ilgio šviesa pasiekiamas optimalus jautrumas, nes galima atskirti sveikus audinius nuo ikinavikinių pažaidų ir optimalus specifiškumas, nes galima atskirti uždegiminius, hiperplazijos ar metaplazijos pažeistus audinius nuo ikivėžinių pažaidų. Sveiko ir uždegimo pažeisto audinio spektrų forma panaši, tačiau ikinavikinių pažaidų spektro forma yra kitokia (3.17 pav.).



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



3.17 pav. Normuoti sveikų ir ikivėžinių pokyčių pakenktų žmogaus bronchų gleivinės savitosios fluorescencijos spektrai *in vivo* ($\lambda_{\text{ad.}}=405 \text{ nm}$) ir jų skirtumas. Adaptuota pagal (Wagnieres ir kt., 2003)

Daugelis autorių, tyrę plaučių ir kvėpavimo takų vėžio fluorescencinę diagnostiką, pastebėjo daug mažesnio intensyvumo naviko pažeistų audinių savitąją fluorescenciją ir aiškina ją su liga susijusiais biocheminiais ir struktūriniais pokyčiais: NADH ir flavinų oksidacine–redukcine būseną, struktūrinių baltymų kiekybiniais pasikeitimais, epitelio sluoksnio sustorėjimu ar kraujagyslių tankio padidėjimu (Keith ir kt., 2000; Pitts ir kt., 2001; Zellweger ir kt., 2001 a).

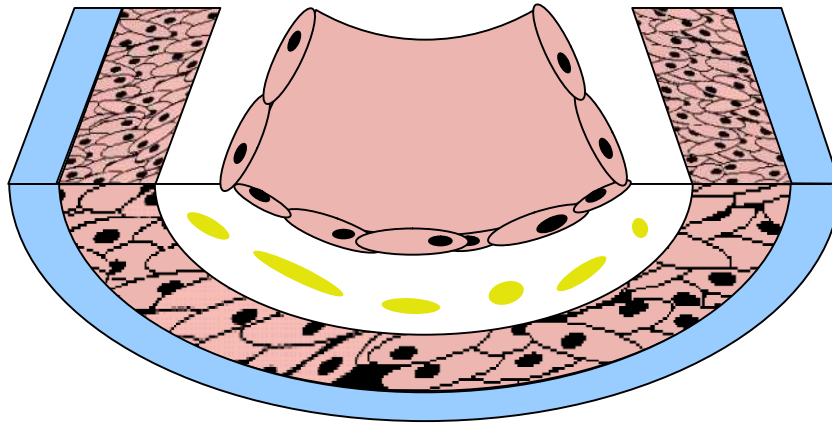
3.2. ATEROSKLEROZINIŲ PAŽAIDŲ FLUORESCENCINĖ DIAGNOSTIKA

3.2.1. Arterijų sienelių patologija

Ateroskleroziniai kraujagyslių pažeidimai tapo svarbiausia ligų ir mirčių priežastimi visame pasaulyje. Pagrindinis aterosklerozinio proceso taikiny yra endotelis. Vystantis kraujagyslių endotelio pažaidoms, pakinta tiek vainikinės, tiek periferinės arterijos. Anksčiausiai pažeidžiama aorta, kiek vėliau – vainikinės, kojų bei smegenų arterijos. Kiekviena pažaidos lokalizacija sukelia būdingų reiškinių ir pasireiškia įvairiomis ligomis. Pagrindinius aterosklerozės ūminius sindromus sudaro širdies ir

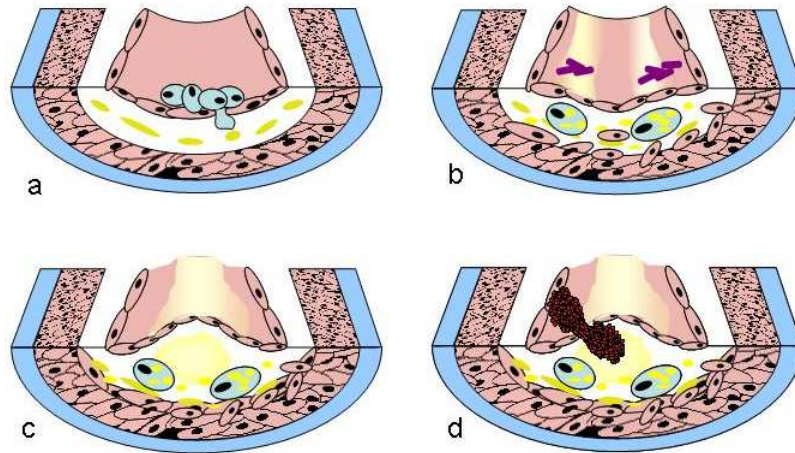
kraujagyslių sistemos ligos, iš kurių dažniausia – išeminė širdies liga, ūminiai išeminiai sindromai ir galvos smegenų insultas (Kozlovaitė, 2002).

Taigi aterosklerozė yra nepastebimai prasidedanti ir tyliai besivystanti lėtinė arterijų sienelių liga. Jos metu arterijų sienelėse trinka medžiagų apykaita ir atsiranda ląstelių pažaidos. Šiuos pokyčius sukelia įvairūs patologiniai vyksmai: uždegimas, jo plitimas, degeneracija, nekrozė, kalcinozė ir trombozė (Falk ir kt., 1995; Shah, 1996; Sary ir kt., 1995).



3.18 pav. Sveikos arterijos sienelė

Arterijų sienelėje yra trys sluoksniai: vidinis (intima), sudarytas iš vieno endotelinių ląstelių sluoksnio, vidurinis (medija), sudarytas iš lygiųjų raumenų ir elastinių skaidulų ir išorinis (adventicija), sudarytas iš jungiamojo audinio elastinių ir kolageninių skaidulų (3.18 pav). Vidinį sluoksnį sudaro endotelio ląstelės, esančios ant savosios plokštelės. Vidurinio sluoksnio lygiųjų raumenų skaidulose yra elastino, kolageno ir proteoglikano. Dėl jų įtakos arterijos sienelės išlaiko elastingumą ir vazomotorinę funkciją. Netaisyklingose išorinio sluoksnio jungiamojo audinio skaidulose perivaskuliniai išsidėstę fibroblastai ir kolagenas (Kozlovaitė, 2002).



3.19 pav. Aterosklerozinių plokštelių susidarymas kraujagyslių endotelyje: a – riebalai pro pažeistą endotelį prasiskverbia į intimą; b – susidaro lipidinis ruoželis, lygiųjų raumenų ląstelės proliferuoja ir migruoja; c – susidaro skaidulinė plokštelė; d – komplikauta plokštelė: įplyšęs skaidulinis stogelis ir susidaręs trombas

Aterosklerozė – lėtinė arterijų sienelės liga, skatinanti aterosklerozinių plokštelių (ateromų) susidarymą joje. Formuojantis aterosklerozinėms pažaidoms pirmiausia pažeidžiamas vidinis arterijų dangalas – endotelis. Viduriniajame sluoksnyje atsiranda antrinių pokyčių. Vidinį arterijų sluoksnį sudaro neskaidulinis jungiamasis audinys, lygiųjų raumenų ląstelės, elastinės skaidulos (elastinas ir mikrofibriliniai komponentai) ir kolagenas. Svarbiausi arterijų sienelių fibrilinių baltymų komponentai yra kolagenas ir elastinas, kurie yra ir pagrindiniai sveikų arterijų endogeniniai fluoroforai. Šių baltymų kiekio santykis priklauso nuo kraujagyslės tipo, rūšies ir arterijos sienelės sluoksnio. Aortoje paprastai būna apie 20 % kolageno ir 50 % elastino; smulkesnėse arterijose – apie 40 % kolageno ir 20 % elastino. Senstant aortoje mažėja elastino, daugėja kolageno ir vidiniame arterijos sienelės sluoksnyje ima kauptis lipidai (daugiausia cholesterolis ir jo esteriai).

Aterosklerozinių plokštelių susidarymas kraujagyslių vidiniame sluoksnyje susijęs su cholesterolio koncentracijos didėjimu kraujyje. Aterogeniškiausi yra mažo tankio lipoproteinai (MTL), turintys gana daug cholesterolio. Didelio tankio lipoproteinai (DTL) taip pat turi daug cholesterolio, tačiau jie neturi įtakos susidarant aterosklerozinėms plokštelėms. Lipoproteinai įgauna aterogeninių savybių, kai įvyksta jų peroksidacija ir susidaro peroksidų modifikuoti lipoproteinai (Praškevičius ir kt., 2003). Šis procesas dažniausiai vyksta arterijų sienelėse, kur susidariusius modifikuotus MTL atakuoja makrofagai. Jie sukaupia daug cholesterolio ir jo esterų, patys virsdami vadinamosiomis „putotomis“ ląstelėmis, kurios dėl jose esančio didelio cholesterolio kiekio žūva, iš jų išsiskiria laisvasis cholesterolis ir ima kauptis vidinėje arterijų sienelėje (3.19 pav.). Cholesterolis yra netirpi kristalinė medžiaga, jos neskaido fermentai. Dėl to vidiniame sluoksnyje besikaupiantis cholesterolis žaloja arterijų sienelių lygiuosius raumenis ir inicijuoja trombocitų agregaciją. Trombocitai ir makrofagai išskiria augimo faktorius, skatinančius lygiųjų raumenų proliferaciją. Pažeistos ląstelės gamina jungiamojo audinio baltymus – kolageną, elastiną ir glikozaminoglikanus. Aplink cholesterolį „riebalinę dėmę“, ima formuotis skaidulinė kapsulė, kurioje kaupiasi įvairios ląstelės ir medžiagos, iš kraujo jungiasi kalcio jonai (Ca^{2+}) – susidaro aterosklerozinė plokštelė (3.19 pav.). Didėjanti plokštelė siaurina arteriją ir trukdo tekėti kraujui. Kraujagyslės praranda elastiškumą, tampa trapios ir gali plyšti. Aterosklerozinės plokštelės pažeidžia gyvybiškai svarbias kraujagysles – arterijas, kuriomis kraujas neša organizmo audiniams deguonį ir maisto medžiagas.

Taigi biocheminę aterosklerozinių plokštelių sudėtį sudaro keturi svarbiausieji komponentai (Falk ir kt., 1995; Shah, 1996; Sary ir kt., 1995; Fuster, 1996; Felton ir kt., 1997):

- ląstelės (makrofagai, lygiųjų raumenų ląstelės ir limfocitai);
- tarpląstelinis dangalas (kolageno ir elastino skaidulos, proteoglikanai);
- viduląstelinės ir tarpląstelinės lipidų sandėliai;
- kalcio sandėliai.

Aterosklerozinių pažeidimų klasifikacija grindžiama jų biochemine sudėtimi ir komponentų struktūra. Pagal Pasaulio sveikatos organizacijos ekspertų rekomendaciją skiriami tokie ateroskleroziniai arterijos intimos pažeidimai: lipidiniai ruoželiai arba

dėmelės, fibrozinės plokštelės, komplikotos plokštelės, arba komplikuoti pažeidimai, ir kalcinozė. Pastarieji trys apibendrinami kaip „iškilieji pažeidimai” (3.1 lentelė) (Stalioraitytė ir kt., 2001).

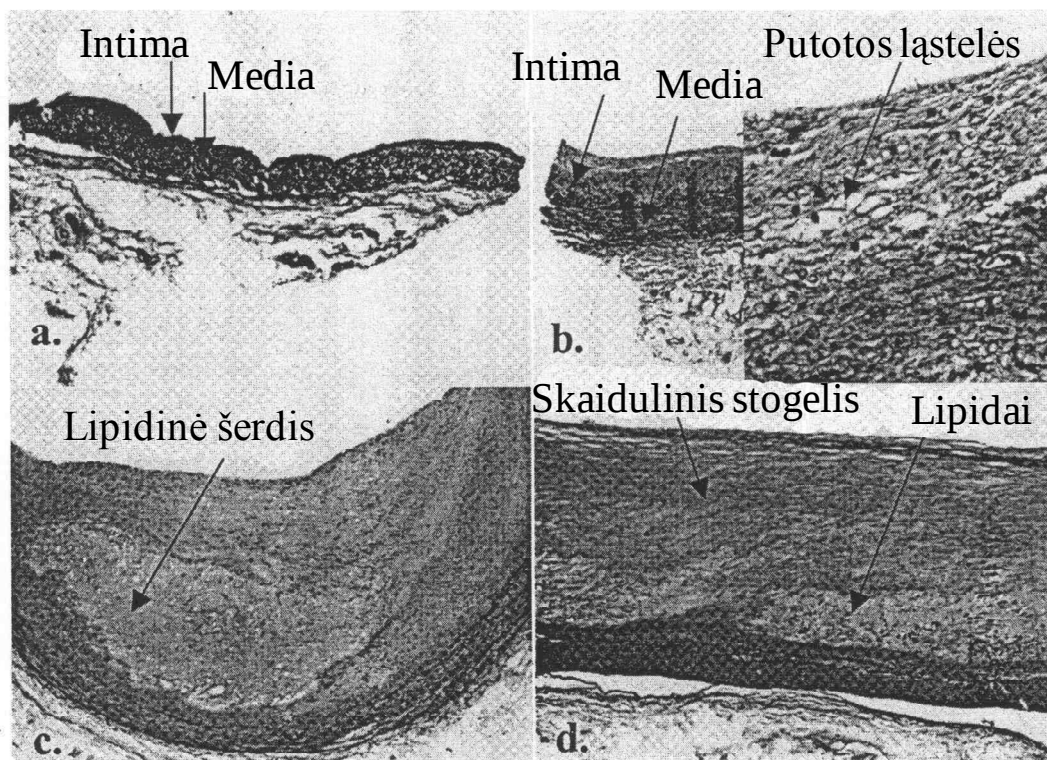
3.1 lentelė. Aterosklerozinių pažeidų apibūdinimas

Pažaida	Apibūdinimas
Lipidinis ruoželis, arba dėmelė	Bet koks intimos pažeidimas, nepereinantis į kitus arterijos sienos sluoksnius
Fibrozinė plokštelė	Standus, blizgantis, blyškiai pilkos spalvos, asimetriškas, plokštelės formos intimos iškilimas, be kraujosruvų, trombozės, išopėjimo ar kalcinozės
Komplikauta plokštelė	Plokštelė, kurioje yra kraujosruva arba trombozė su kalcio nuosėdomis arba be jų
Kalcinozė	Ploteliai, kuriuose yra kalcio nuosėdų, be kraujosruvų, išopėjimų arba trombozės
Iškilieji pažeidimai	Fibrozinės, komplikotos plokštelės ir kalcinozė kartu

Pažeidų lygis skirstomos pradedant nuo minimalių intimos pokyčių ir baigiant sudėtingomis klinikines pasekmes sukeliančiomis pažeidomis (Fuster, 1996). Pirmosios fazės pažeidos apima bepradedančias formuotis ir smulkias pažeidas, kurios pagal morfologinius požymius savo ruožtu skirstomos į tris tipus. Pirmajam ir antrajam tipams priklauso ankstyvos, o trečiajam – tarpinio lygio pažeidos. Pirmojo (I) tipo pažeidoms būdingos mažos izoliuotos makrofagų grupelės, turinčios „putotų” ląstelių. Antrojo (II) tipo pažeidoms būdingas didelis kiekis „putotų” makrofagų ląstelių, besiskverbiančių į artimiausius sluoksnius. Kai yra ankstyvų pažeidų, didžioji dalis lipidų kaupiasi ląstelėse. Trečiojo (III) tipo pažeidoms būdingos lipidų sankaupos tiek „putotose” makrofagų ląstelėse, tiek tarpląstelinėje terpėje. Šio tipo pažeidos yra pereinamosios į pažengusių pažeidų fazes.

Labiau pažengusiai antrajai fazei priskiriamos pažeidos, kuriose jau įvyko struktūrinių pakitimų, intimos atsinaujinimo procesų, storėjimo ir arterijos sienelės deformacijų (IV, V ir VI tipo pažeidos). Ketvirtojo (IV) tipo pažeidos – tai daug susikaupusių lipidų (lipidinės šerdys), dėl to kyla plokštelių atplyšimo pavojus. Penktojo

(V) tipo pažaidos – padaugėję skaidulinio jungiamojo audinio. Kai apie lipidinę šerdį susikaupia naujai susiformavęs skaidulinis audinys, susidaro skaidulinis stogelis, kuris morfologiškai priskiriamas V_a tipui (fibroateroma). Jei penktojo tipo pažaidos kalcinuojasi, jos priskiriamos V_b tipui (kalcinuotos). Kai yra penktojo tipo pažaidų, kraujagyslės praranda elastingumą, jos standėja ir siaurėja. Šeštojo (VI) tipo pažaidos (komplikuotos) susidaro daugiausia dėl ketvirtojo ar penktojo tipo pažaidose susiformavusių plokštelių įplyšimų. Ties įplyšimu formuojasi hematoma arba trombas (krešulys). Paveiksle 3.20 pavaizduotos koronarinės arterijos pažaidos.



3.20 pav. Žmogaus koronarinės arterijos 4 μm storio sluoksnio vaizdai (didinimas $\times 16$): a – sveikai arterijai būdingas labai plonas intimos sluoksnis; b – susidarę lipidiniai ruoželiai, intimos sluoksnis storėja, jame kaupiasi makrofagai (putotos ląstelės); c – lipidinę šerdį gaubia skaidulinis audinys; d – susidariusi aterosklerozinė plokštelė (fibroateroma), sustorėjęs intimos sluoksnis, apie lipidinę šerdį susiformavęs skaidulinis stogelis. Adaptuota pagal (Marcu ir kt., 2003)

3.2.2. Aterosklerozinių pažeidimų klinikinė diagnostika

Ilgą laiką aterosklerozinė plokštelė auga nesukeldama jokių simptomų. Ligos paūmėjimus dažniausiai sukelia prie aterosklerozinės plokštelės įplyšimo susidaręs ir kraujo tėkmę trikdančias krešulys (trombas). Todėl, siekiant sėkmingo aterosklerozės gydymo, nepaprastai svarbu laiku pastebėti ir kiekybiškai įvertinti, kiek toli pažengęs aterosklerozės procesas. Aterosklerozinės plokštelės įplyšimo priežastys ir tikslus mechanizmas nėra visiškai aiškūs. Plokštelių plyšimo mechanizmai daugiausia tirti histopatologiškai, tačiau svarbiausias tokių tyrimų trūkumas tas, kad jie pateikia tarsi tik aterosklerozinės plokštelės „momentinę nuotrauką“ (Felton ir kt., 1997; Vallabhajosula ir Fuster, 1997; Lee ir Libby, 1997).

Pastarųjų metų tyrimai rodo, kad ne anatomicinės priežastys ar stenozės lygis, o pažeidimų biocheminė sudėtis ir morfologija lemia plokštelių nestabilumą. Šie duomenys leidžia spręsti, kiek yra pažengusi liga ir kokia plokštelių plyšimo rizika. Jau nustatyta, kad pavojingiausios yra ne didžiausios ir labiausiai siaurinančios arteriją plokštelės, bet nestabilios, kartais visai nedidelės minkštos, su didele riebaline šerdimi, plokštelės. Tuo tarpu, kai yra pažengusi stenozė, kolageno skaidulomis apaugusios pažeistos, nors ir trukdo tekėti kraujui, stabilizuoja plokšteles (Falk ir kt., 1995; Shah, 1996; Felton ir kt., 1997; Vallabhajosula ir Fuster, 1997; Lee ir Libby, 1997). Kai kurios aterosklerozinių plokštelių struktūrinės savybės, tokios kaip skaidulinio stogelio plonėjimas, mažas kiekis lygiųjų raumenų ląstelių, proteinazių sukeltas kolageno skilimas ir minkštos, daug riebalų turinčios šerdys, susijusios su jų nepatvarumu ir galimais plyšimais. Todėl fibroateromų komponentų tyrimas yra labai svarbus.

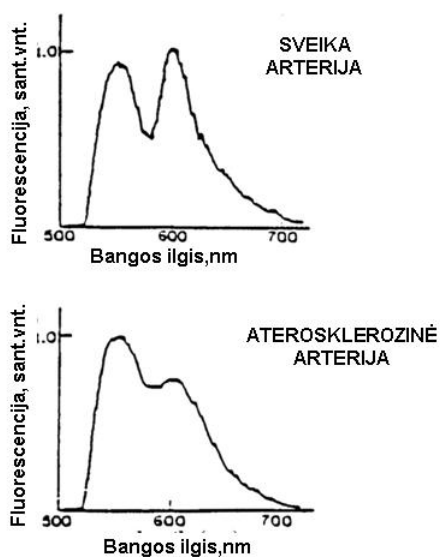
Įprastiniai klinikiniai tyrimai (angiografija, angioskopija, echoskopija) gali padėti įvertinti stenozės lygį, tačiau nesuteikia informacijos apie plokštelių sudėtį. Tam pasitelkiamos kitos įvairios diagnostinės technologijos: magnetinio rezonanso vaizdinimas (Vallabhajosula ir Fuster, 1997; Shinnar ir kt., 1999), IR (Moreno ir kt., 1999), Ramano (Romer ir kt., 1998) ir fluorescencinė spektroskopija (Christov ir kt., 2000; Marcu ir kt., 2001 a). Optinės spektroskopijos metodai pagrįsti tuo, kad ligai progresuojant vykstantys aterosklerozinių plokštelių biocheminiai ir morfologiniai

pokyčiai sukelia audinių optinių savybių pokyčius, kurie gali būti įvertinti atliekant greitus ir tiesioginius spektrinius matavimus pasitelkus šviesolaidines technologijas.

3.2.3. Aterosklerozinių plokštelių savitoji fluorescencija

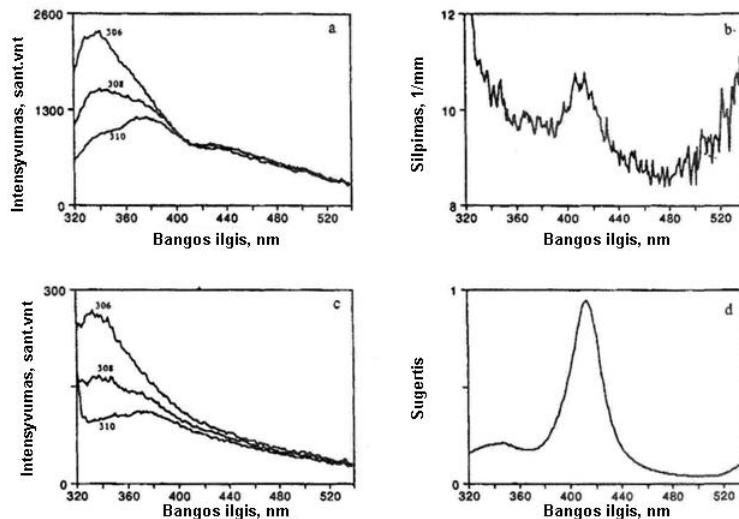
Pirmieji ateromų chromatografiniai tyrimai parodė, kad kai kurie komponentai fluorescuoja silpną šviesiai žalią šviesą (Blankenhorn ir Braunstein, 1956). Ši fluorescencija buvo priskirta įvairiems karotinoidams ir/ar vitaminui A, susikaupusiems aterosklerozinėse pažaidose, o jų koncentracija siejama su pažaidos amžiumi. Vėlesni tyrimai patvirtino hipotezę, kad aterosklerozės pažeistoje aortoje susikaupusios fluorescuojančios medžiagos įeina į intimos plokštelių sudėtį ir yra tiesiogiai susijusios su elastino degeneracija. Šių komponentų žadinimui ir jų fluorescencijos registravimui buvo parinkti tokie bangų ilgiai: 350/405 nm ir 380/450 nm (Banga ir Bihari-Varga, 1974).

Optinių šviesolaidinių technologijų pritaikymas aterosklerozinių plokštelių šalinimui lazerio spinduliuote (lazerinė angioplastika) sukėlė didelį susidomėjimą ir inicijavo klinikinius tyrimus (Isner ir Klarke, 1984; Isner ir kt., 1987). Kad būtų išvengta kraujagyslių perforacijos, reikėjo labai tiksliai ir patikimai nustatyti pažaidos vietą. Tam buvo pasiūlyta arterijos sienelių fluorescencinius matavimus atlikti panaudojant tą patį šviesolaidį, per kurį sklinda didelės galios lazeriniai impulsai, skirti aterosklerozinių plokštelių šalinimui. Pirmieji matavimai patvirtino, kad fluorescencinė spektroskopija padeda atskirti sveiką aortą nuo skaidulinės plokštelės (3.21 pav.) (Kittrell ir kt., 1985). Vėliau buvo paskelbta nemažai darbų, skirtų aterosklerozinių plokštelių diagnostikai. Dažniausiai šie tyrimai buvo derinami kartu su bandymais tobulinti lazerinius šviesolaidinius angiochirurginius kateterius. Sveikų ir aterosklerozės pažeistų arterijų sienelių fluorescencija buvo matuojama žadinant UV ir regimosios šviesos spektrinio ruožo šviesa (Deckelbaum ir kt., 1987; Bergeron ir kt., 1988; Leon ir kt., 1988).



3.21 pav. Sveikos ir aterosklerozinės arterijos fluorescencijos spektrai ($\lambda_{\text{žad.}} = 480 \text{ nm}$). Aterosklerozinės plokštelės fluorescencijos intensyvumas ties 600 nm yra mažesnis negu sveikos arterijos

Keičiant žadinimo bangos ilgį mažais intervalais ($< \pm 20 \text{ nm}$), didžiausi pokyčiai arterijų sienelių fluorescencijos spektruose matomi žadinant nuo 306 iki 310 nm ilgio šviesa. Sveikos aortos fluorescencijos spektre išryškėja trys maksimumai ties 335, 380 ir 440 nm; maksimumo ties 335 nm intensyvumas mažėja didėjant žadinimo bangos ilgiui (3.22 pav. a) (Baraga ir kt., 1990). Jei aortos sienelė būdavo tokia plona, kad reabsorbcijos reiškiniai neturėjo didesnės įtakos, fluorescencijos spektruose, žadinant 306–310 nm ruožo šviesa, išryškėdavo tik du maksimumai – ties 335 ir 380 nm. Todėl įdubą spektre ties 418 nm (3.22 pav. b) autoriai priskiria oksihemoglobino reabsorbcijai (audinių fluorescuojamos šviesos sugerčiai). Maksimumas ties 380 nm priklauso kolageno ir elastino fluorescencijai.



3.22 pav. Aortos savitosios fluorescencijos spektrai žadinant 306, 308 ir 310 nm bangos ilgio šviesa (a). Arterijos intimos spektre silpninimo maksimumas yra ties 420 nm (b). Labai plono arterijos sluoksnio fluorescencijos spektruose nematyti reabsorbcijos poveikio, matomos tik dvi fluorescencijos smailės ties 335 ir 380 nm (c). Įduba ties 418 nm priskiriama oksihemoglobino reabsorbcijai (d) (Baraga ir kt., 1990)

Žadinant arterijų mėginių *in vitro* fluorescenciją azoto lazerio spinduliuote ($\lambda = 337$ nm), sveikų arterijų sienelių ir aterosklerozinių pažeidų spektruose matomi ryškūs skirtumai. Jie aptikti visuose mėginiuose, paimtuose iš aortos, šlauninės, plaučių ir vainikinių kraujagyslių (Andersson-Engels ir kt., 1987; Andersson-Engels ir kt., 1989).

Ieškant morfologinių skirtumų, kurie lemia sveikos ir pažeistos arterijos skirtingą fluorescenciją, nustatyta, kad, tiek žadinant 350 nm, tiek 476 nm ilgio šviesa, sveikų arterijų savitoji fluorescencija daugiausia priskirtina kolagenui ir elastinui (Fitzmaurice ir kt., 1989; Verbunt ir kt., 1992). Plokštelių šerdyje esančios kietos sankaupos, žadinant tiek UV, tiek regimosios šviesos raudono bangų ilgių spinduliuote, fluorescavo geltoną šviesą, tačiau fluorescencijos intensyvumas buvo skirtingas. Tokių sanaujų fluorescencija priskirta ceroidams. Ši ceroidų fluorescencija, įgalinanti gana patikimai atskirti pažeidų vietas nuo sveikų arterijų sienelių, kuriose vyrauja kolageno ir elastino

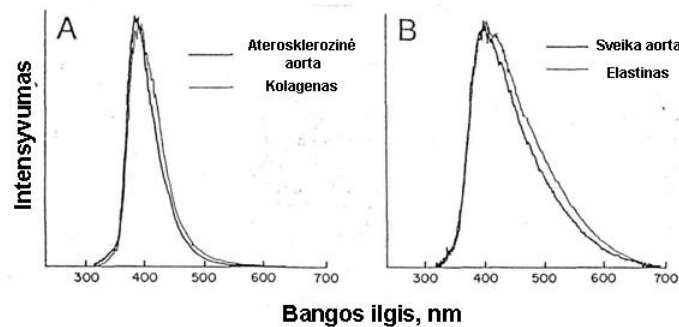
savitoji fluorescencija, gerai padėtų šalinant aterosklerozines plokšteles lazerinės abliacijos metu (Verbunt ir kt., 1992).

Kurie fluoroforai bus sužadinti ir jų fluorescencija atspindės arterijos spektre, nulemia žadinimo bangos ilgio parinkimas. Čia svarbūs du aspektai. Viena, sužadinami tik tie chromoforai, kurie sugeria žadinimo bangos ilgio šviesą. Antra, pamatuoti galima tik tų chromoforų fluorescenciją, kurie arterijų audiniuose yra tokiam gylyje, kur juos pasiekia žadinimo šviesa ir jų skleidžiamą fluorescenciją galima fiksuoti nuo audinio paviršiaus (Gmitro ir kt., 1988). Pasiūlytas paprastas modelis apskaičiuoti audinio gyliui, iš kurio emituojama apie 95 % nuo audinio paviršiaus užfiksuojamos fluorescencijos, pagal priklausomybę nuo spinduliuotės susilpninimo ties žadinimo ir registravimo bangos ilgiais koeficientų. Autoriai parodė, kad pagal šį modelį, žadinant fluorescenciją ties 325 nm, galima tiksliai nustatyti fluorescencijos priklausomybę nuo gylio audinyje, ir įvertino, kad 95 % fluorescencijos sklinda iš 150 µm viršutinio arterijų sienelių sluoksnio (Gmitro ir kt., 1988).

Žadinant fluorescenciją XeCl eksimerinio lazerio spinduliuote (bangos ilgis 308 nm) buvo tirtos ankstyvos aterosklerozės stadijos fluorescencinės diagnostikos taikymo galimybės (Oraevsky ir kt., 1993). Lipidinių ruoželių fluorescencijos spektrai yra platesni ir daugiau pasislinkę į raudonąją spektro pusę, palyginti su sveikos aortos spektru, kurio fluorescencijos smailė yra ties 430 nm, o juostos pusplotis lygus 170 nm. Autoriai (Oraevsky ir kt., 1993) šiuos spektrinius pokyčius priskiria oksiduotų mažo tankio lipoproteinų sankaupoms. Fibroateromose pastebimas triptofano fluorescencijos intensyvumo mažėjimas (Baraga ir kt., 1990). Ištyrus 60 mėginių, remiantis fluorescencijos intensyvumų santykiu, sveikos aortos atskirtos nuo aterosklerozinių pažaidų 93 % tikslumu. Pastebima, kad šiuo atveju tinkamiausias fluorescencijos žadinimo bangos ilgis yra 308 nm, nes, žadinant 325 ir 337 nm bangos ilgio šviesa, triptofanas nesužadinamas ir toks audinių identifikavimas neįmanomas.

Aprašyti kiekybiniai aortos ir vainikinių kraujagyslių spektrų skirtumai žadinant fluorescenciją 325 nm bangos ilgio šviesa (Leon ir kt., 1988). Visų audinių fluorescencijos spektruose ryškėja viena juosta su smaile ties 465 nm. Aterosklerozės pažeistų bandinių fluorescencijos intensyvumas buvo vidutiniškai 45 % mažesnis negu sveikų.

Tiriant biocheminius komponentus, dėl kurių skiriasi sveikų ir aterosklerozės pažeistų kraujagyslių fluorescencija (žadinant He-Ne lazerio 325 nm šviesa), buvo išmatuoti sveikų ir aterosklerozinių audinių bandinių spektrai ir palyginti su iš tų pačių audinių išskirtų kolageno ir elastino spektrais (Laifer ir kt., 1989). Elastino fluorescencijos spektro forma buvo labai panaši į sveikos arterijos spektro, o kolageno – į aterosklerozinės aortos (3.23 pav.). Sukurtas sveikų ir aterosklerozinių aortos audinių klasifikavimo algoritmas, pagrįstas kolageno ir elastino spektrų analize. Klasifikavimo jautrumas buvo 92%. Taigi, žadinant 325 nm bangos ilgio šviesa, svarbiausias aterosklerozinių plokštelių fluoroforas yra kolagenas, o sveikos aortos – elastinas.



3.23 pav. Aterosklerozinės aortos ir kolageno (A) ir sveikos aortos ir elastino (B) fluorescencijos spektrai. Adaptuota pagal (Laifer ir kt., 1989)

Žadinant fluorescenciją ties 458 ir 476 nm, arterijų spektruose matomos trys smailės: ties 520, 550 ir 600 nm (Sartori ir kt., 1987). Sveikos aortos fluorescencijos smailės ties 520 ir 600 nm yra intensyvesnės nei ties 550 nm, o įdubos tarp spektro juostų gana ryškios. Tokie spektro bruožai atsiranda dėl savitosios kolageno, elastino ir ceroido fluorescencijos ir oksihemoglobino sukeliama reabsorbcijos reiškinio derinio. Žadinant 476 nm šviesa nekalcinuotų plokštelių fluorescencijos intensyvumas yra didesnis nei sveikos aortos ar vainikinės kraujagyslės.

Išanalizavus sveikos ir aterosklerozinės aortos ir vainikinių kraujagyslių fluorescencijos spektrus, pasirodė, kad, vykstant sklerozinių plokštelių formavimosi

procesams, struktūrinių baltymų fluorescencijos įnašas mažėja, o ceroido – didėja (Richards-Kortum ir kt., 1989). Pagal sukurtus spektrinės analizės algoritmus bandiniai 92 % tikslumu gali būti klasifikuoti į sveikus audinius, kalcinuotas ar nekalcinuotas aterosklerozines plokšteles.

Tobulinant lazerinės abliacijos technologijas, skirtas aterosklerozinių plokštelių šalinimui, buvo sukurta aparatūra, galinti žadinti fluorescenciją dviem bangos ilgiais (Lucas ir kt., 1990). Informaciją apie plokštelių riebalinę dalį teikė fluorescencija, sužadinta 325 nm ilgio šviesa, o apie struktūrinius baltymus ir kalcinozės lygį – 476 nm šviesa. Analizuojant spektrų duomenis pagal fluorescencijos intensyvumų santykius ties įvairiais bangų ilgiais, buvo atskiriamos kalcinuotos plokštelės, lipidiniai ruoželiai ir fibrozinės plokštelės.

3.2.4. Aterosklerozinių plokštelių tyrimas fluorescencinės spektroskopijos su laikine skyra metodu

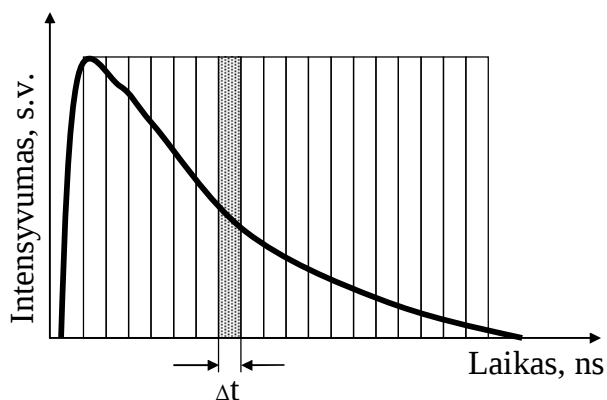
Fluorescencinė spektroskopija su laikine skyra yra dar viena optinės biopsijos šaka. Šis metodas, palyginti su nuostoviąja spektroskopija, technologiškai yra sudėtingesnis ir tyrimas užtrunka ilgiau, tačiau gaunami duomenys yra labai vertingi ir, svarbiausia, kitais metodais jų neįmanoma gauti. Nuostoviosios spektroskopijos metodais registruojamas audinyje esančių molekulių fluorescencijos intensyvumas, kuris yra tiesiogiai proporcingas fluoroforų koncentracijai ir jų fluorescencijos kvantiniam našumui. Smarkiai sklaidančioje ir nehomogeninėje aplinkoje, toks yra biologinis audinys, absoliutaus fluorescencijos intensyvumo pamatuoti beveik negalima, nes dėl nevienodai išsidėsčiusių šviesą sklaidančių ir sugeriančių molekulių, audinio optinės savybės žadinančiosios spinduliuotės kelyje yra skirtingos. Be to, registruojamam fluorescencijos intensyvumui turi įtakos pasirinktas žadinimo–surinkimo sistemos tipas bei fluorescuojančių molekulių blukimas – t. y. jų suirimas dėl žadinančios spinduliuotės poveikio. Čia taip pat reiktų paminėti, kad registruojamas fluorescencijos intensyvumas priklauso ir nuo to, kaip šviesolaidinio zondo antgalis yra priglaudžiamas prie tiriamosios vietos. Tačiau, svarbiausia – nuostoviosios spektroskopijos metodais neįmanoma išskirti molekulių, kurių fluorescencijos spektrai persidengia, o jų sužadinimui naudojama tokio paties bangos ilgio spinduliuotė. Tuo tarpu laikinės skyros optinėje biopsijoje

registruojamas signalas pirmiausia priklauso nuo molekulių kvantinio našumo arba švytėjimo trukmės ir nepriklauso nuo absoliutaus fluorescencijos intensyvumo ar audinyje esančių molekulių koncentracijos. Taigi ryškėja tokie optinės biopsijos su laikine skyra privalumai:

- Galima atskirti audinyje esančius endogeninius fluoroformas, kurių emisijos spektrai persidengia, o pasikeitus fluorescuojančių molekulių koncentracijai, pasikeičia ir švytėjimo trukmė.
- Kol fluorescencija yra gerokai intensyvesnė už triukšmus, registruojamam signalui beveik neturi įtakos audinyje esančios šviesą sugeriančios medžiagos (hemoglobinas) arba pasirinktas žadinimo–surinkimo sistemos tipas.
- Metodas yra jautrus molekulių mikroaplinkai (pH, fermentiniam aktyvumui, temperatūrai), mat fluorescencijos gyvavimo trukmė apibūdina laiką, per kurį molekulė gali sąveikauti su ją supančia aplinka. Iš šių duomenų galima spręsti apie audinio metabolinį aktyvumą ir uždegimo reakcijas.

Neabejotinai laikinės skyros optinė biopsija yra perspektyvus metodas ir norint aterosklerozinių pažeidimų aptikti *in situ*. Net keletas mokslininkų grupių pademonstravo, kad laikinės skyros spektroskopija gali pagerinti fluorescencinių metodų specifiškumą ir apeiti tam tikrus nuostoviosios spektroskopijos apribojimus (Andersson-Engels ir kt., 1990; Baraga ir kt., 1989; Andersson-Engels ir kt., 1991). Tyrimų metu buvo pamatuotos skirtingos fibroateromų pažeistų arterijų sienelių fluorescencijos gyvavimo trukmės, taip pat nustatyta, kad audinyje esantis kraujas neturi įtakos arterijos sienelių fluorescencijos gesimo charakteristikoms. Buvo numatyta, kad laikinės skyros spektroskopija gali padėti geriau aptikti įvairių lygių aterosklerozinių pažeidimų. Šių dienų tyrimais mokslininkai taip pat patvirtino, kad informacija, gaunama pamatavus sveikų ir aterosklerozės pažeistų arterijos sienelių fluorescencijos laikines charakteristikas, gali pagelbėti atskiriant įvairių aterosklerozinių plokštelių tipus, ir yra ypač naudinga identifikuojant lipidų sankaupas (Marcu ir kt., 2001 a; Marcu ir kt., 2001 b; Maarek ir kt., 2000 a).

Aterosklerozinių pažeidimų nustatymui dažniausiai naudojami laikiniai arba impulsiniai metodai. Be jau aptarto per laiką koreliuotų pavienių fotonų skaičiavimo dar yra tiesiogiai stebimas fluorescencijos gesimas optinės sklendės metodu. Pagrindinė šio metodo idėja yra užregistruoti intensyvumą kelis kartus, kol fluorescencija visiškai užgesa. Taigi turimas intensyvumas pradinio laiko momentu, po 1 ns arba mažiau (trukmė pasirenkama priklausomai nuo fluorescencijos gesimo laiko), po 2 ns ir t. t., ir šitaip skenuojama visa gesimo trukmė. Galimi įvairūs šio metodo variantai, t. y. pats detektorius gali būti įjungiamas labai trumpam laikui Δt (~ 1 ns) ir tada užregistruojamas



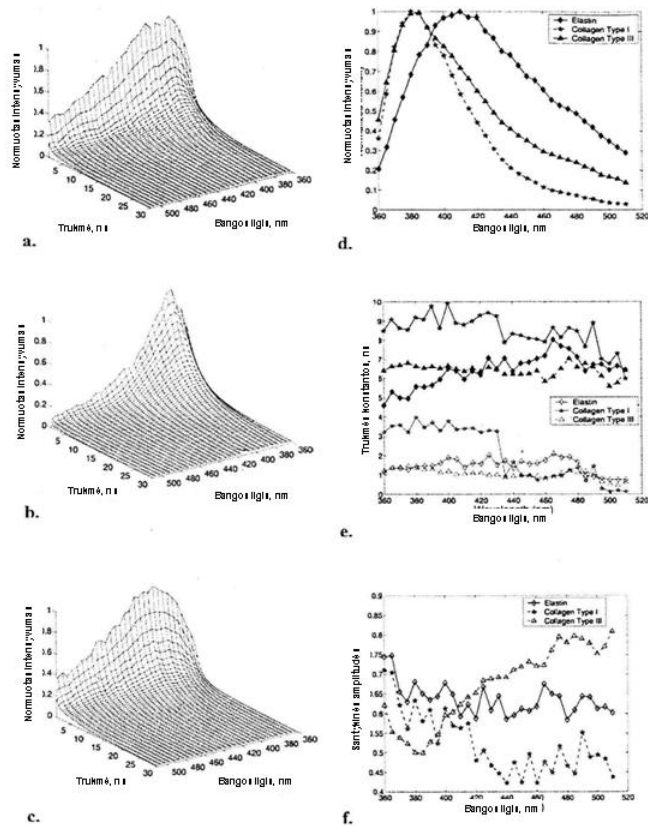
3.24 pav. Optinės sklendės detektorius yra įjungiamas arba atidaroma optinė sklendė labai trumpam laikui Δt . Tokiais trumpais intervalais yra skenuojama visa gesimo trukmė

vidutinis intensyvumas per tą laiką (1 ns) arba detektorius gali būti įjungtas visą laiką ir priešais jį įtaisyta tam tikra sklendė, kuri atsidaro labai trumpam laikui Δt (~ 1 ns) (3.24 pav). Šiuo metodu detektoriaus įjungimo arba sklendės atsidarymo trukmė turi būti daug trumpesnė nei fluorescencijos gesimo trukmė.

Pavyzdžiui, jei tiriamojo objekto

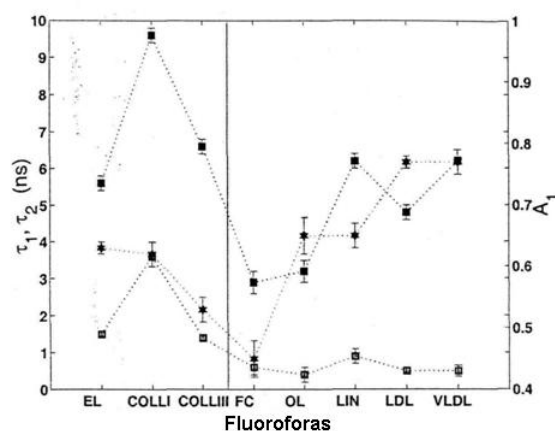
fluorescencija trunka kelias nanosekundes, tai įjungimo arba atsidarymo trukmė turi būti pikosekundžių eilės.

Bet kokio audinio fluorescencijos spektrą sudaro kelių fluoroforų emisija, todėl, siekiant optinės biopsijos technologijas pritaikyti diagnostikai, labai svarbu identifikuoti tas molekules, kurios yra atsakingos už tiriamojo audinio (tiek sveiko, tiek ligos pažeisto) fluorescenciją. Svarbiausieji arterijų sienelių fluoroforai yra elastinas, įvairių tipų kolagenas ir lipidai – laisvasis cholesterolis, esterifikuotas cholesterolis bei lipoproteinai (Marcu ir kt., 2001 a ir b; Maarek ir kt., 2000 b; Marcu ir kt., 2000; Marcu ir kt., 1998). Šie fluoroforai buvo išskirti iš audinių ir buvo pamatuotos jų laikinės optinės charakteristikos (fluorescencijos gyvavimo trukmės). Fluorescencijos spektrai su laikine skyra pateikiami 3.25 paveiksle. Kiekvieno fluoroforo emisijos gesimas yra skirtingas. Didžiausi skirtumai matomi žadinant trumpesne nei 430 nm spinduliuote. Paprastai



3.25 pav. Arterijos sienelės endogeninių fluoroforų spektrų su laikine skyra ir fluorescencinių parametrų pavyzdžiai: a – elastinas; b – kolagenas I; c – kolagenas III. d – Per laiką integruotų elastino ir kolageno bandinių spektrai. d – Gesimo konstantos. f – Santykinės amplitudžių vertės. Adaptuota pagal (Marcu ir kt., 2003)

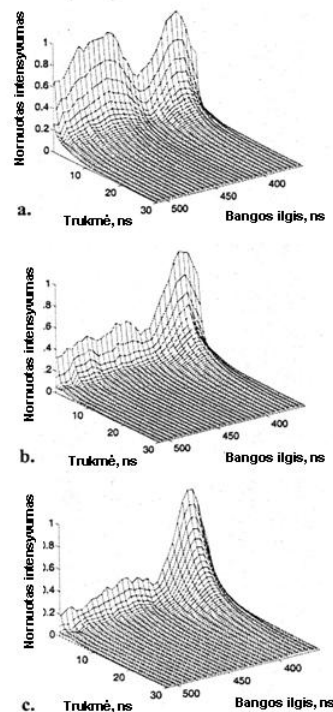
riebalinių darinių švytėjimas trunka trumpiausiai, o struktūriniai baltymai švyti gerokai ilgiau. Dėl to audinių vietos, kuriose yra šie fluoroforai, gali būti atskiriamos. Dar daugiau – optine biopsija su laikine skyra vienus nuo kitų galima atskirti skirtingų tipų cholesterolius, lipoproteinus bei įvairių tipų kolagenus (3.26 pav.) (Marcu ir kt., 2001 b; Maarek ir kt., 2000; Marcu ir kt., 2000). Taip pat buvo nustatyta hidratacijos įtaka registruojamam audinių optiniam atsakui (Maarek ir kt., 2000; Marcu ir kt., 1998). Dėl jos kolageno ir esterifikuoto cholesterolio fluorescencijos trukmė sutrumpėjo. Labiausiai šis efektas buvo pastebimas mėlynosios spektro srities fluorescencijoje.



3.26 pav. Fluorescencijos ties 390 nm gesimo parametrai (τ_1, τ_2 , A_1). Kairėje pusėje: elastino (EL), kolageno I (COLLI) ir kolageno III (COLLIII). Dešinėje pusėje: laisvo cholesterolio (FC), cholesteriloleato (OL), cholesterillinooleato (LIN), mažo tankio lipoproteinų (LDL) ir labai mažo tankio lipoproteinų (VLDL). Adaptuota pagal (Marcu ir kt., 2003)

Ištirus už arterijų sienelių fluorescenciją atsakingų fluoroforų savybes, tolesni eksperimentai buvo atliekami su sveikų ir pažeistų aortos sienelių preparatais (Marcu ir kt., 2001 a; Maarek ir kt., 2000). Tyrimai daryti šviesolaidine žadinimo–surinkimo sistema, nes šitaip galima tiksliai parinkti tiriamąją vietą. Sveika aorta nuo pažeistos buvo atskiriama pagal intimos storį: sveikos aortos intimos storis mažesnis nei 200 μm , o aterosklerozės pažeistos aortos intimos storis – didesnis nei 200 μm . Laikantis Amerikos Širdies asociacijos siūlomos klasifikacijos (Sary ir kt., 1995), pagrįstos pažaidų sudėtimi ir morfologija, jos buvo suskirstytos į septynias grupes: nėra pažaidos, I tipo (ankstyva pažaida), II tipo (lipidinis ruoželis), III tipo (iki aterominės pažaidos), IV tipo (ateroma), V_a tipo (fibroateroma) ir V_b tipo (sunkios pažaidos ir pažengusi kalcinozė). Priklausomai nuo pažaidos tipo, keitėsi ir intimos storis – nuo 80 μm iki 1400 μm (aortoje). Žinant, kad žadinančioji spinduliuotė, o ypač UV srities, yra stipriai sugerama biologinių audinių, buvo įvertintas tyrimui taikytos spinduliuotės (~ 337 nm, azoto lazeris) išsiskverbimo gylis, kuris siekė 150 – 200 μm . Taigi sveikų bei I tipo pažaidų (kai intimos storis mažiau nei 200 μm) fluorescencija registruojama ne tik iš intimos, bet ir iš kitų sluoksnių, o smarkiau pažeistų arterijų fluorescencija registruojama tik iš pažeistos intimos.

Žmogaus aortos nuostoviosios fluorescencijos spektruose yra matoma tam tikrų skirtumų, tačiau tai daugiau yra kiekybiniai skirtumai, kurie priklauso ir nuo registravimo sąlygų, todėl iš laikinės skyros matavimų gaunama papildoma informacija yra labai naudinga. Žmogaus aortos audinių fluorescencijos gesimo kreivės pateiktos 3.27 paveiksle. Sveikų audinių bei ankstyvųjų pažaidų (I ir II tipo) vietų emisija ties 390 nm sumažėja iki 5% maksimalaus intensyvumo per ~11–12 nanosekundžių. Šių mėginių fluorescencijos gesimas yra panašus ties visais bangų ilgiais. Labiau pažeistų audinių fluorescencija trunka ilgiau: ~13 nanosekundžių IV tipo ir ~16 nanosekundžių V_a tipo pažaidų. Šių audinių fluorescencijos trukmės mažėja raudonojoje spektro srityje. Taigi fluorescencijos gesimas ties 390 nm gali būti sėkmingai taikomas riebalinių (IV tipo) ir kolageninių (V_a tipo) pažaidų atskyrimui.



3.27 pav. Aortos sienelės bandinių spektrai, matuoti su laikine skyra: a – sveikos aortos; b – esant IV tipo pažaidai (didelės riebalų sankaupos); c – V_a tipo pažaidos (kolageno sankaupos)

Iš gautų rezultatų taip pat galima įvertinti fluoroforų įnašą į bendrą audinio emisijos spektrą. Aortos fluorescencijos trukmė ties emisijos maksimumu yra 11–12 nanosekundžių, o vainikinės arterijos – apie 14 nanosekundžių. Turint galvoje, kad šių dviejų audinių fluorescencija labiausiai priklauso nuo elastino ir I tipo kolageno, kurių fluorescencijos trukmės yra atitinkamai ~11 ir ~20 nanosekundžių, galima daryti išvadą, kad didesnę įtaką tiek aortos, tiek vainikinės arterijos fluorescencijai turi elastinas (nes jų fluorescencijos trukmės yra beveik kaip elastino). Yra žinoma, kad I ir III tipo kolagenai yra dažniausiai arterijų sienelėse aptinkami kolageno tipai. Iš imunologinių tyrimų nustatyta (Sary ir kt., 1992), kad III tipo kolagenas yra lokalizuotas sveikos intimos subendotelinėje erdvėje, tačiau šioje vietoje nėra I tipo kolageno. Taigi III tipo kolagenas, kurio fluorescencijos trukmė ~15 nanosekundžių, greičiausiai taip pat turi įtakos kraujagyslių sienelių fluorescencijai.

V_a tipo pažeidų optinės laikinės charakteristikos yra labai panašios į I tipo kolageno. Aortos audinių ilgiausios fluorescencijos gyvavimo trukmės buvo aptiktos fibroziniuose pažeidimuose, tad, matyt, kad šių pažeidų fluorescencija yra smarkiai veikiamą I tipo kolageno. Šie rezultatai glaudžiai siejasi su histopatologinės analizės metu gautais duomenimis, kai buvo nustatyta, kad V_a tipo pažeidimuose yra susidarę stori kolageno skaidulų sluoksniai. Ši informacija buvo patvirtinta ir dar vienu būdu – ištyrus aortos sienelę su fibroziniais pažeidimais chromatografinės analizės metodu nustatyta, kad I tipo kolagenas sudaro ~70 % viso šiame audinyje esančio kolageno (Sary ir kt., 1995).

II tipo pažeidų emisija, kuri pasižymi greitesne fluorescencijos dinamika bei poslinkiu į raudonąją spektro pusę palyginti su sveikais audiniais, rodo, jog šiuo atveju už fluorescenciją yra atsakingas fluoroforas, kurio fluorescencijos gyvavimo trukmė yra trumpa. Šios II tipo pažeidų laikinės charakteristikos labai gerai koreliuoja su laisvo ir esterifikuoto cholesterolio fluorescencija, kurios trukmė taip pat yra trumpa (Marcu ir kt., 2001 b; Marcu ir kt., 1998). Taigi II tipo pažeidų fluorescencija gali būti sudaryta iš lipidų fluorescencijos, persiklojusios su gilesniuose sluoksniuose esančių elastino ir kolageno fluorescencija. Šią hipotezę patvirtina vainikinių arterijų bandinių histopatologiniai tyrimai, kurių metu intimoje buvo aptikta daug makrofagų. Yra žinoma, kad makrofagai atakuoja pažeistas kraujagyslių sieneles ir sukaupia daug cholesterolio ir

jo esterų. Galimybė atskirti makrofagų indėlį į registruojamą fluorescenciją yra labai svarbi, kadangi makrofagai (putotosios ląstelės) gali būti kaip aterosklerozinių plokštelių nestabilumo žymenys (Falk ir kt., 1995; Shah, 1996; Sary ir kt., 1995).

III ir IV tipo pažeidimų emisiją greičiausiai sudaro dviejų tarpusavyje konkuruojančių komponentų fluorescencijos: giliau intimoje esančių didelio kiekio lipidų (trumpa fluorescencijos gyvavimo trukmė), ir arti endotelio paviršiaus esančių kolageno skaidulų (ilga fluorescencijos gyvavimo trukmė). Nors heterogeninė intimos struktūra atspindi visas aterosklerozinių pažeidimų vystymosi stadijas ir ją analizuojant galima aptikti sienelių pažeidimų, optinės biopsijos su laikine skyra rezultatai patikimai informuoja apie riebalų kaupimosi sukeltus intimos sudėties pokyčius ir gali būti panaudojami aterosklerozinių pažeidimų identifikavimui.

Apibendrinant galima pasakyti, kad optinė biopsija su laikine skyra gali būti sėkmingai taikoma įvairioms aterosklerozinių pažeidimų stadijoms nustatyti. Užregistravus audinių laikines charakteristikas ties vienu bangos ilgiu (~390 nm) būtų galima atskirti beveik visus, išskyrus I, arterinių pažeidimų tipus. Riebalinės sankaupos taip pat gali būti atskiriamos nuo kitų tipų (fibrozinų) pažeidimų bei sveikų arterijos sienelių. Naujausiais duomenimis, lipidinių ruoželių emisija labiausiai yra veikiamą pačių riebalų fluorescencijos, o fibrozinų pažeidimų emisiją lemia I tipo kolageno fluorescencija. Didėjantis riebalų/kolageno santykis yra susijęs su aterosklerozinių plokštelių mechaninio atsparumo silpnėjimu. Dėl to didėja sienelės plyšimo rizika, todėl gebėjimas optiniais metodais nustatyti riebalų/kolageno kiekį sudaro nemenkas prielaidas optinę biopsiją taikyti klinikoje identifikuojant įtartinas vietas bei stebint pažeidimų vystymąsi *in vivo*.

3.3. Optinė biopsija, taikoma vėžiui diagnozuoti panaudojant endogeninius sensibilizatorius

Kadangi savitąją fluorescenciją grįžti optiniai diagnostiniai metodai ne visada tinka, o gauti rezultatai gana sunkiai interpretuojami, dažnai taikomi sensibilizuotos fluorescencijos diagnostiniai metodai –organizmai paveikiami egzogeninėmis medžiagomis, tam tikrais fluoroforais, kuriems selektyviau besikaupiant ligos pažeistose

ar kitais tikslais tiriamose vietose, jų fluorescencija gali suteikti reikiamos diagnostinės informacijos.

Sensibilizuota fluorescencija gali būti taikoma:

- pažaidoms ar navikiniam dariniui aptikti *in vivo*;
- navikui vaizdinti ir jo riboms nustatyti chirurginės operacijos metu;
- sensibilizatoriaus koncentracijai nustatyti įvairiuose audiniuose *in vivo*;
- sensibilizatoriaus pasiskirstymo audiniuose arba ląstelėse tyrimui fluorescencinės mikroskopijos metodu.

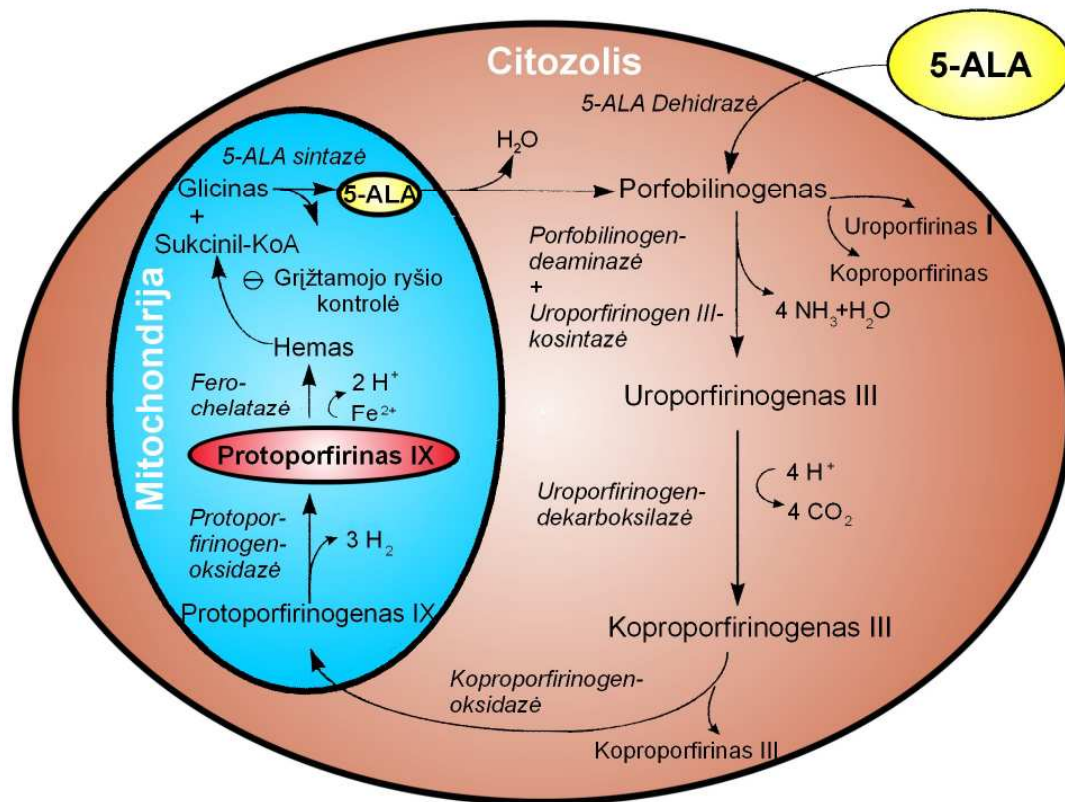
Kaip tam tikra navikinių darinių sensibilizuotos optinės biopsijos rūšis gali būti išskirta biopsija panaudojant endogeninius sensibilizatorius. Jau senokai pastebėta, kad navikiniai audiniai pasižymi ryškesne raudona fluorescencija negu sveiki. Tokia fluorescencija būdinga porfirininės kilmės molekulėms.

5-aminolevulino rūgštis (ALA) yra kraujo hemo sintezės pirmtakas. Į organizmą įterpus egzogeninės ALA, hemo sintezė vyksta intensyviau ir pasigamina daugiau priešpaskutinio sintezės ciklo produkto protoporfirino IX (PpIX). Sveikuose organizmuose hemo biosintezės ciklas veikia taip, kad PpIX perteklius ląstelėse nesusikaupia, tačiau paveikus organizmą papildomu ALA kiekiu ciklą galima sutrikdyti. Tokiu atveju fermentai nebespėja paversti viso besigaminančio PpIX hemu ir ląstelėse ima kauptis PpIX perteklius. Navikinėse ląstelėse dėl sumažėjusio fermento ferochelatazės (FeC) aktyvumo arba padidėjusio fermento porfobilinogeno deaminazės (PBGD) aktyvumo ALA–indukuoti porfirinai kaupiasi geriau. Šiuo reiškiniu pagrįsti fluorescenciniai diagnostavimo metodai ypač tinkami ankstyvų stadijų navikams ir kai kuriems ikinavikiniams dariniams aptikti. Naudojant ALA arba ALA esterius išoriniu ar sisteminiu būdu, fluorescencinėmis vaizdinimo sistemomis galima aptikti ankstyvų stadijų navikus, nustatyti jų paplitimą, matmenis, išryškinti naviko kraštus.

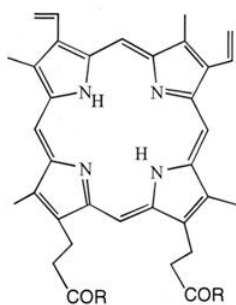
3.3.1. Endogeninių porfirinų biosintezė

Hemo biosintezė. Pradinis hemo biosintezės ciklo etapas yra 5-aminolevulino rūgšties (ALA) sintezė iš glicino ir sukcinil-kofermento-A katalizuojant 5-ALA-sintaze (ALAS). Toliau iš dviejų ALA molekulių susidaro porfobilinogenas (PBG). Veikiant

porfobilinogeno deaminazei (PBGD) ir uroporfirinogeno sintazei keturios PBG molekulės kondensuojamos į uroporfirinogeną III. Toliau vyksta dekarboksilinimo ir oksidavimo reakcijų seka, kol geležies atomas įterpiamas į tetrapirolo žiedą (3.28 pav.). Dalis hemo biosintezės vyksta mitochondrijose, dalis – citozolyje. Mitochondrijoje susintetinta ALA pernešama į citozolį, ten susidaro PBG, o iš jo – uroporfirinogenas III. Citozolyje uroporfirinogeno dekarboksilazė atima iš uroporfirinogeno III keturias karboksilo grupes ir taip susidaro koproporfirinogenas III, kurio šoninės propiono rūgšties liekanos, veikiamos koproporfirinogeno oksidazės, yra dekarboksilinamos ir oksiduojamos į vinilo grupes. Šios reakcijos vėl vyksta mitochondrijoje. Katalizuojant protoporfirinogeno oksidazei, tetrapirolo žiedo metileno grupės oksiduojamos į metino grupes – susidaro protoporfirinas IX (PpIX). Iš aštuonių ALA molekulių pasigamina viena PpIX molekulė (3.29 pav.). Katalizuojant ferochelatazei į tetrapirolo struktūros centrą įterpiamas divalentės geležies atomas Fe(II) – susidaro ne fluorescuojanti hemo molekulė.



3.28 pav. Hemo biosintezės ciklas ir 5-ALA metabolinė seka



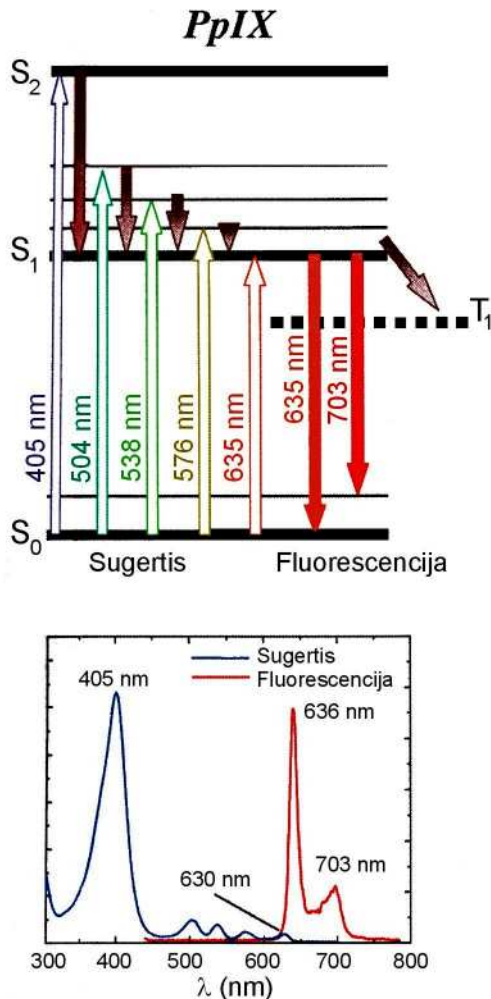
3.29 pav. Protoporfirino IX cheminė struktūra

Hemo biosintezės kontrolė. Hemo sintezės ciklo greitis sureguliuotas taip, kad atitinka hemo pasiūalinimo iš sistemos greitį. Jį kontroliuoja grįžtamosios reguliacijos procesas, dėl kurio susidaręs laisvo hemo perteklius stabdo ALA sintezę. Jei hemas suvartojamas tokiu pat greičiu kaip ir sintetinamas, laisvo hemo bus nedaug ir ALA sintezė nebus stabdoma. Kai ALA koncentracija padidėja, atitinkamai paspartėja hemo sintezė. Jei hemas sintetinamas greičiau negu pasiūalina, susikaupęs jo perteklius stabdo ALA sintezę, o tai savo ruožtu slopina tolesnę hemo sintezę. Taigi normaliomis sąlygomis hemo poreikis kontroliuoja hemo, o kartu ir PpIX sintezės greitį.

Egzogeninė ALA skatina endogeninių porfirinų kaupimąsi. Didžiausias ALA sintezės greitis visada yra mažesnis už didžiausią kiekvienos kitos ciklo pakopos greitį ir tarpiniai produktai nesikaupia, tačiau į organizmą įterptas ALA perteklius gali sutrikdyti ciklą. Dėl jo apeinama griežtai reguliuojama, viso sintezės kelio greitį lemianti ALAS katalizuojama reakcija ir aktyvinama PBGD (antroji greitį ribojanti stadija), todėl ląstelėse intensyviau sintetinami endogeniniai porfirinai. Jei PpIX virtimas hemu vyksta lėčiau negu PpIX sintezė, ląstelėse susikaupia daugiau PpIX. Kadangi uroporfirinai susidaro iš uroporfirinogeno, o koproporfirinai – iš koproporfirinogeno, ALA pertekliui sutrikdžius hemo biosintezės ciklą, gali susikaupti ir šių porfirinų perteklius.

3.3.2. Protoporfirino IX fluorescencija

PpIX sugerties spektrą sudaro intensyvi juosta ties maždaug 400 nm (vadinamoji Soret juosta) ir keturios ne tokios intensyvios juostos regimojoje spektro srityje nuo 500



3.30 pav. Protoporfirino IX sugerties ir fluorescencijos spektrai

nm iki 635 nm (vadinamosios Q-juostos). Žadinant PpIX molekules ties 400 nm (arba regimosios šviesos srities spinduliuote), jos fluorescuoja raudoną šviesą: PpIX fluorescencijos spektrą sudaro dvi juostos ties 635 nm ir 700 nm (3.30 pav.).

ALA-indukuoto PpIX fluorescencijos intensyvumas sveikame ir navikiniame audinyje priklauso nuo įvairių farmakologinių ir fiziologinių veiksnių. Klinikiniu požiūriu svarbus ALA-indukuoto PpIX pranašumas prieš kitus sensibilizatorius tas, kad junginiai yra endogeniniai, jų metabolizmas greitas, praktiškai nėra šalutinio poveikio. Optinės biopsijos požiūriu svarbu tai, kad gerai žinomos PpIX spektrinės savybės. Tačiau ALA-indukuotas PpIX, kitaip negu daug kitų egzogeninių fluoroforų–fotosensibilizatorių, kurie sveikuose audiniuose kaupiasi beveik homogeniškai, įvairių tipų sveikuose audiniuose kaupiasi skirtingai. Tai daugiausia priklauso nuo skirtingo hemo sintezės greičio įvairiose organizmo vietose.

3.3.3. Selektyvus PpIX kaupimasis navikiniuose audiniuose

Kaip ir kodėl navikiniuose audiniuose susikaupia daugiau endogeninių porfirinų negu sveikuose, dar tebetiriama. Nuo ALA patekimo į organizmą iki PpIX susintetinimo

ir jo apykaitos keli vyksmo etapai gali būti atsakingi už selektyvų porfirinų kaupimąsi pažeistose audiniuose:

ALA skvarbumas į audinius. Difuzijos barjeras, trukdantis ALA molekulėms skverbtis ir pasiskirstyti tarp audinių, navikiniuose audiniuose būna sumažėjęs. Manoma, kad, pavyzdžiui, dėl akyto keratino sluoksnio, dengiančio odos bazoląstelinį vėžį, jame susikaupia daugiau PpIX, kurio fluorescencija padeda diagnozuoti naviką ir nustatyti jo ribas.

ALA patekimas į ląsteles. ALA patenka į ląsteles dėl aktyvios pernašos. Navikinėse ląstelėse dėl įvairių priežasčių gali būti didesnis baltymų kanalų kiekis ir aktyvumas.

Plazmos fermentų aktyvumas. Nustatyta, kad navikinėse ląstelėse padidėjęs fermento porfobilinogeno deaminazės, katalizuojančio endogeninių porfirinų sintezės tarpinius etapus, aktyvumas.

Ferochelatazės aktyvumas. Katalizuojant ferochelatazei į PpIX molekulės centrą įterpiama divalentė geležis – susidaro nefluorescuojanti hemo molekulė. Navikinėse ląstelėse nustatytas sumažėjęs ferochelatazės aktyvumas, todėl jose susikaupia daugiau PpIX.

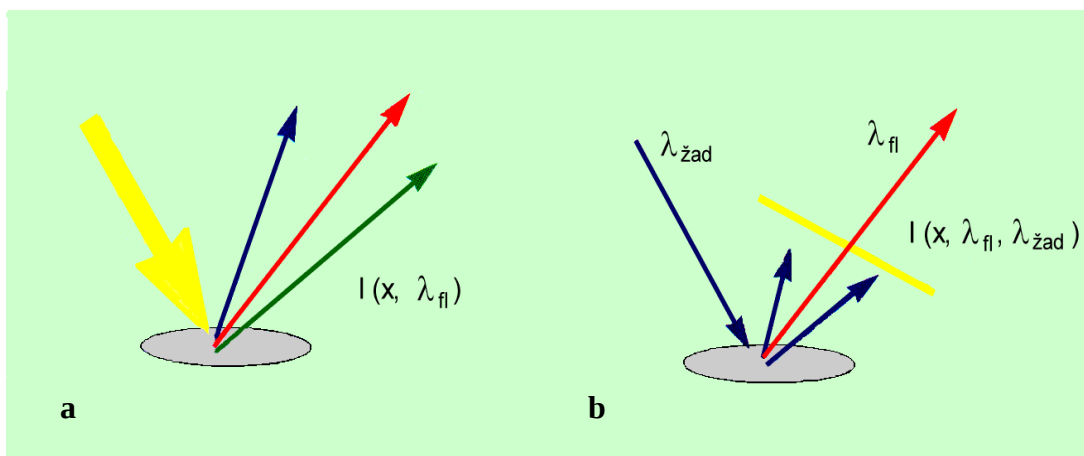
Viduląstelinis PpIX pasiskirstymas ir pasišalinimas. Viduląstelinis endogeninio porfirino pasiskirstymas navikiniame audinyje lemia fluorescencijos intensyvumą ir pasišalinimo iš audinių greitį.

3.3.4. Šlapimo pūslės vėžio optinė biopsija

Apie 70 % atvejų šlapimo pūslės navikai yra paviršiniai ir išsidėstę pūslės gleivinėje ir pogleivio sluoksnyje. Daugelis tų navikų yra papildiniai egzofitai, augantys į šlapimo pūslės ertmę. Tokie navikai paprastai lengvai aptinkami endoskopiškai. Tačiau greta papildinių egzofitinių darinių, šlapimo pūslėje gali būti plokščių neoplazijų, displazijų ar karcinomų *in situ*, kurios tiriant endoskopiškai lieka nepastebėtos. Dariniai jau gali būti susiformavę tose pūslės srityse, kurios apžiūros metu dar atrodo visiškai sveikos. Kad gydymas būtų sėkmingas, labai svarbu aptikti neoplazinius darinius, tokius kaip displazijos ar karcinoma *in situ*. Tačiau didelė tikimybė, kad šie maži papildiniai

egzofitiniai dariniai, ypač jei navikas daugiažidinis, tiriant endoskopiškai, gali likti nepastebėti.

Recidyvų skaičius po šlapimo pūslės vėžio rezekcijos yra didelis – iki 75 %. Per antrąją endoskopinę apžiūrą, praėjus kelioms savaitėms po papildinio naviko pašalinimo, naviko liekanos aptinkamos maždaug trečdaliui pacientų. Todėl stengiamasi sukurti efektyvesnius diagnostikos metodus, padedančius aptikti neoplazijas *in vivo*. Nuo 1992 metų urotelio navikinių darinių diagnostikai taikoma ALA indukuoto PpIX fluorescencija grįsta optinė biopsija.



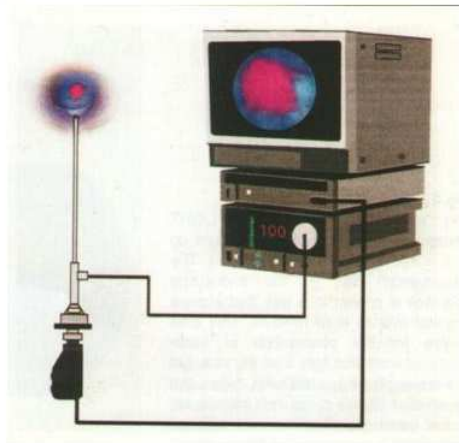
3.31 pav. Audinių fluorescencija žadinant balta (a) ir monochromatine šviesa (b)

Atliekant *in vivo* fluorescencinę optinę biopsiją, reikia tinkamai parinktos matavimo aparatūros ir filtrų sistemos. Tiriant šlapimo pūslės sienos audinius baltos šviesos cistoskopijos metodu, šviesa nuo kiekvieno audinio paviršiaus taško (x) įvairių bangos ilgių (λ_{fl}) šviesa sklaidoma skirtingai (3.31 pav. a). Stebėtojas mato audinio struktūros ir spalvos pokyčius, gali susieti juos su audinio būkle ir, pasiremdamas savo patirtimi, daryti išvadas apie atsiradusias pažaidas.

Jei šlapimo pūslės sienoje susikaupusio fluoroforo pasiskirstymas koreliuoja su navikinių pažaidų sukeltais audinio pokyčiais, fluorescencijos stebėjimas gali suteikti daugiau ir patikimesnės informacijos. Tokiu atveju audinys apšviečiamas ne balta, o monochromatine fluoroforą žadinančia šviesa (λ_{zad}) (3.31 pav. b). Į sistemą įstatytas stebėjimo filtras (geltonas brūkšnys) sulaiko išsklaidytą žadinimo šviesą ir atskiria ją nuo raudonos fluoroforo skleidžiamos fluorescencijos šviesos. Sistema leidžia keisti žadinimo

bangos ilgį ($\lambda_{\text{žad}}$) pritaikant jį konkrečiam fluoroforui. Stebėjimo filtrai parenkami tokie, kad padėtų išskirti daugiausia informacijos teikiančio fluoroforo fluorescenciją (λ_{fl}). Jei sistema tinkamai suderinta, stebėtojas gerai mato fluorescuojančias audinio sritis ir gali spręsti apie jų priežastis.

Ypač daug šlapimo pūslės navikų diagnostikos srityje yra nuveikę Miuncheno (Vokietija) universitetinės ligoninės mokslininkai ir gydytojai. Apžvelgsime tik keletą iš jų paskelbtų darbų. Į šlapimo pūslę instiliavus 3 % ALA tirpalo ir po 2–3 valandų atlikus fluorescencinę cistoskopiją, žadinant ALA-indukuotą PpIX kriptono jonų lazerio spinduliuote (406,7 nm), urotelio pažeidimai švytėjo raudona šviesa (Kriegmair ir kt., 1994; Kriegmair ir kt., 1996). Pažeistos vietos ir normalaus urotelio fluorescencijos intensyvumų santykis buvo 17:1. Tiriant 104 pacientus, sergančius šlapimo pūslės karcinoma, naviko diagnozavimas fluorescencine cistoskopija buvo gerokai tikslesnis (96,9 %), palyginti su įprasta baltos šviesos cistoskopija (72,7 %) (Kriegmair ir kt., 1996). Šioje ligoninėje sukonstruota speciali fluorescencinė diagnostinė sistema, sudaryta iš modifikuotų įprastinių komponentų (šviesos šaltinio, endoskopo, CCD kameros) (3.32 pav.).



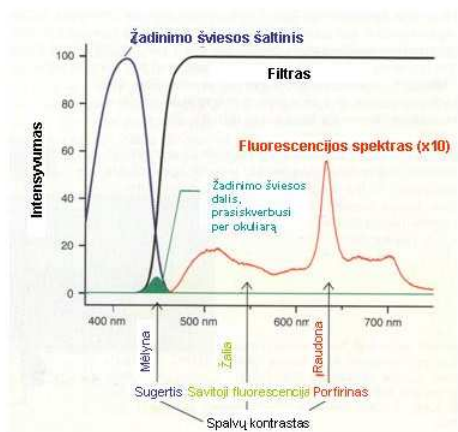
3.32 pav. Diagnostinė sistema, skirta fluorescencinei cistoskopijai

Mėlyną fluorescencijos žadinimo šviesą spinduliuoja specialiai tam tikslui sukurta didelio galingumo šviesos sistema. Ši sistema, vadinama „D-LIGHT“, gali būti naudojama ir kaip baltos šviesos šaltinis. Tiek mėlynos, tiek baltos šviesos intensyvumą galima tolygiai keisti. Prireikus balta šviesa gali būti perjungta į fluorescenciją žadinančią mėlyną šviesą ir atvirkščiai. Prietaisą galima sujungti su visais įprastais endoskopiniais instrumentais, tam tereikia specialios optikos. Integruoti šviesolaidžiai leidžia atlikti endoskopinę apžiūrą žiūrint tiesiai arba 30 laipsnių kampų. Prie okuliaro tvirtinamas stebėjimo filtras, kurio paskirtis – blokuoti didžiąją dalį išsklaidytos atspindėtos žadinimo šviesos, kad geriau išryškėtų raudona fluorescencija. Galima ne tik matyti plika akimi, bet ir fiksuoti rezultatus jautria CCD kamera.

Būtų „idealus atvejis“, jei fluoroforas būtų labiausiai susikaupęs tik navikiniame audinyje ir jo fluorescenciją žadintų vieno bangos ilgio šviesa. Tada sveikas audinys atrodytų juodas, o navikinis – fluorescuotų fluoroforui būdinga spalva, pavyzdžiui, raudona, jei fluoroforas yra PpIX. Tačiau realiai toks atvejis neįmanomas.

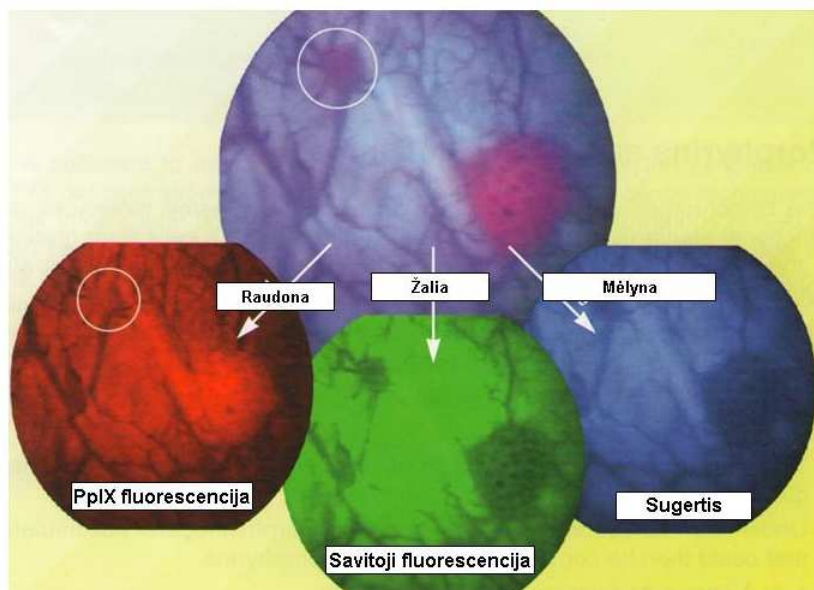
Realiuose fluorescencijos vaizduose sveiki audiniai atrodo tamsiai raudoni, o navikiniai – šviesesni. Tačiau atskirti vienus nuo kitų gana sunku. Tolygiai apšviesti išgaubtą šlapimo pūslės sieną neįmanoma, todėl būna neaišku, ar fluorescencijos intensyvumas padidėjęs dėl didesnio fluoroforo kiekio, ar jį sukelia didesnis apšviestumas. Šią problemą galima išspręsti taip konstruojant stebėjimo filtrą, kad jis šiek tiek praleistų mėlyną žadinimo šviesą. Ir praleistų jos tiek, kad raudona endogeninių fluoroforų ir nebūdinga PpIX fluorescencija būtų slopinama, o sveiki audiniai dėl to atrodytų tarsi „melsvi“ (3.33 pav.). Taip atsiranda raudonos/mėlynos spalvų kontrastas, leidžiantis atskirti sveikus ir „įtartinus“ audinius. Šis spalvų kontrastas suteikia daug daugiau tikrumo identifikuojant sveikus ir navikinius audinius. Be to, spalvų kontrastas nepriklauso nuo stebėjimo geometrijos. Spalvų kontrastu grįstas vaizdinimas taip pat padeda išspręsti trukdymus, atsirandančius dėl kraujo sugerties. Tose vietose, kur intensyvesnis kraujo tekėjimas arba dėl uždegimo paraudę audiniai, žadinimo šviesą sugeria nefluorescuojantis kraujo pigmentas – hemas. Dėl to sužadinama mažiau PpIX

molekulių ir sumažėja porfirino fluorescencijos intensyvumas. Tačiau, kadangi žadinimo šviesos mažiau ir išsklaidoma, spalvų kontrastas lieka nepakitęs.



3.33 pav. Audinių fluorescencijos stebėjimo schema

Apžiūrint šlapimo pūslę baltoje šviesoje kai kurie navikai kartais atrodo intensyvesnio raudonumo negu sveiki audiniai. Tokiais atvejais, net jei navike ir yra nemažai susikaupusio PpIX, sveiko ir navikinio audinio fluorescencijos intensyvumų skirtumo nebus galima išvelgti. Netaikant spalvų kontrasto vaizdinimo navikas liks neaptiktas. Toks pavyzdys pateiktas 3.34 paveiksle. Viršutinis vaizdas yra gautas panaudojant spalvų kontrastą, o apatiniai – monochrominę spektrinio diapazono fluorescenciją: raudoną (kairėje), žalią (viduryje) ir mėlyną (dešinėje). Taigi, jei audinys yra paraudęs, o stebėjimui naudojama monochrominė fluorescencija, didesnysis iš dviejų navikų sunkiai įžiūrimas, o mažasis visai nematomas (apatinis kairysis). Vaizdas žalioje šviesoje gali suteikti naudingos informacijos, nes jame navikiniams audiniams būdingas savitosios fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas pastebimas navikų vietose (apatinis vidurinis). Tiesa, vaizdą kiek gadina patamsėjimai, atsirandantys dėl didesnės žadinimo šviesos sugerties, tačiau navikams būdingas savitosios fluorescencijos intensyvumo mažėjimas padeda sudaryti geresnį spalvų kontrastą.



3.34 pav. Spalvų kontrasto taikymas atskiriant dviejų navikų vaizdus fluorescencinės cistoskopijos metu

Literatūra

Alfano R.R., D.B. Tata, J. Cordero, P. Tomashefsky, F. Longo, M. Alfano (1984) Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue. IEEE J. Quant. Electron., 20, 1507–1511.

Alfano R.R., G.C. Tang, A. Pradhan, W. Lam, D.S.J. Choy, E. Opher (1987) Fluorescence spectra from cancerous and normal human breast and lung tissues. IEEE J. Quant. Electron., 23, 1806–1811.

Andersson-Engels S., A. Brun, E. Kjellen, L.G. Salford, L.-G. Stromblad, K. Svanberg, S. Svanberg (1989) Identification of brain tumours in rats using laser-induced fluorescence and hematoporphyrin derivative. Lasers Med. Sci., 4, 241–249.

Andersson-Engels S., A. Elner, J. Johansson, S.-E. Karlsson, L.G. Salford, , L.-G. Stromblad, K. Svanberg, S. Svanberg (1990) Clinical recordings of laser-induced fluorescence spectra for evaluation of tumour identification feasibility in selected clinical specialities. *Lasers Med. Sci.*, 6, 415–424.

Andersson-Engels S., L.Baert, R. Berg, M.A. D’Hallewin, J. Johansson, U. Stenram, K. Svanberg, S. Svanberg (1991) Fluorescence characteristics of atherosclerotic plaque and malignant tumors. *SPIE Proc.*, 1426, 31–40.

Andersson-Engels S., A.Gustafson, U. Stenram, K. Svanberg, S. Svanberg (1987) Diagnosis of arterial atherosclerosis using laser-induced fluorescence. *Lasers. Med. Sci.*, 2, 261–266.

Andersson-Engels S., A. Gustafson, J. Johansson, U. Stenram, K. Svanberg, S. Svanberg (1989) Laser-induced fluorescence used in localizing atherosclerotic lesions. *Lasers. Med. Sci.*, 4, 171–181.

Andersson-Engels S., J. Johansson, S. Svanberg (1990) The use of time-resolved fluorescence for diagnosis of atherosclerotic plaque and malignant tumours. *Spectrochim. Acta*, 40A, 1203–1210.

Anidjar M., O. Cussenot, S. Avriellier, D. Etti, P. Teillac, A. Le Duc (1998) The role of laser-induced autofluorescence spectroscopy in bladder tumor detection. *Ann. of the NY Acad.Sci.*, 838, 130–142.

Ankerst J., S. Montan, K. Svanberg, S. Svanberg (1984) Laser-induced fluorescence studies of hematoporphyrin derivative in normal and tumour tissue of rat. *Appl. Spectrosc.*, 38, 890–896.

Baraga J.J., R.P. Rava, P. Taroni, C. Kittrell, M. Fitzmaurice, M.S. Feld (1990) Laser induced fluorescence spectroscopy of normal and atherosclerotic human aorta using 306–310 nm excitation. *Lasers Surg. Med.*, 10, 245–261.

Baraga J.J., P. Taroni, Y.D. Park, K. An, A. Maestri, L.L. Tong, R.P. Rava, C. Kittrell, R.R. Dasari, M.S. Feld (1989) Ultraviolet laser induced fluorescence of human aorta. *Spectrochim. Acta*, 45A, 95–99.

Banga I., M. Bihari-Varga (1974) Investigations of free and elastin bound fluorescent substances present in the atherosclerotic lipid and calcium–plaques. *Connective Tissue Research*, 237–241.

Bergeron A., Y. Douville, G. Duplain (1988) Complete fluorescence spectrum of a normal and atherosclerotic aorta. *Can. J. Phys.*, 66, 1035–1039.

Blankenhorn D.H., H. Braunstein (1956) Carotenoids in man III. The microscopic pattern of fluorescence in atheromas, and its relation to its growth. *J. Clin. Invest.*, 35, 160–165.

Bottiroli G., A.C. Croce, D. Locatelli, R. Marchesini, E. Pignoli, S. Tomatis, C. Cuzzoni, S. Dipalma, M. Dalfante, P. Spinelli (1995) Natural fluorescence of normal and neoplastic human colon: a comprehensive *ex vivo* study. *Lasers Surg. Med.*, 16, 48–60.

Bourg-Heckly G., J. Blais, J.J. Padilla, O. Bourdon, J. Etienne, F. Guillemin, L. Lafay (2000) Endoscopic ultraviolet-induced autofluorescence spectroscopy of the esophagus: tissue characterization and potential for early cancer diagnosis. *Endoscopy*, 32, 756–765.

Brookner C., M. Follen, I. Boiko, J. Galvan, S. Thomsen, A. Malpica, S. Suzuki, R. Lotan, R. Richards-Kortum (2000) Tissue slices autofluorescence patterns in fresh cervical tissue. *Photochem. Photobiol.*, 71, 730–736.

Chance B., P. Cohen, F. Jsbsis, B. Schoener (1962) Intracellular oxidation-reduction states *in vivo*. *Science*, 137, 499–505.

Chance B., B. Schoener (1966) Fluorimetric studies of the flavin component of the respiratory chain. In: *Flavins and Flavoproteins*. Ed. E.C. Slater, Elsevier Publishing Company, New York, 510-519.

Christov A., E. Dai, M. Drangova, L.Liu, G.S. Abela, P. Nash, G. McFadden, A. Lucas (2000) Optical detection of triggered atherosclerotic plaque disruption by fluorescence emission analysis. *Photochem. Photobiol.*, 72, 242–252.

Das B.B., K.M. Yoo, F. Liu, J. Cleary, R. Prudente, E. Celmer, R.R. Alfano (1993) Spectral optical–density measurements of small particles and breast tissues. *Optics*, 32, 549–554.

Deckelbaum L.I., J.K. Lam, H.S. Cabin, K.S. Clubb, M.B. Long (1987) Discrimination of normal and atherosclerotic aorta by laser–induced fluorescence. *Lasers Surg. Med.*, 7, 330–335.

Drezek R., C. Brookner, I. Pavlova, I. Boiko, A. Malpica, R. Lotan, M. Follen, R. Richards-Kortum (2001) Autofluorescence microscopy of fresh cervical tissue sections reveals alterations in tissue biochemistry with displasia. *Photochem. Photobiol.*, 73, 636–641.

Falk E., S.K. Prediman, V. Fuster (1995) Coronary plaque disruption. *Circulation*, 92, 657–671.

Felton C.V., D. Crook, M.J. Davies, M.F. Oliver (1997) Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaque. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17, 1337–1345.

Fiarman G.S., M.H. Nathanson, A.B. West, L.I. Deckelbaum, L. Kelly, C.R. Kapadia (1995) Differences in laser-induced autofluorescence between adenomatous and

hyperplastic polyps and normal colonic mucosa by confocal microscopy. *Digest. Dis. Sci.*, 40, 1261–1268.

Fitzmaurice M., J.O. Bordagaray, G.L. Engelmann, R. Richards-Kortum, T. Kolubayev, M.S. Feld, N.B. Ratliff, J.R. Kramer (1989) Argon ion laser-excited autofluorescence in normal and atherosclerotic aorta and coronary arteries: morphologic studies. *Am. Heart J.*, 118, 1028–1038.

Fuster V. (1996) Syndromes of atherosclerosis. Correlations of clinical imaging and pathology. Armonk, NY: Futura.

Gmitro A.F., F.W. Cutruzzola, M.L. Stetz, L.I. Deckelbaum (1988) Measurement depth of laser-induced tissue fluorescence with application to laser angioplasty. *Appl. Optics*, 27, 1844–1849.

Glassman W., C.H. Liu, G.C. Tang, S. Lubicz, R.R. Alfano (1992) Ultraviolet excited fluorescence spectra from non-malignant tissues of the gynecologic tract. *Laser Life Sci.*, 5, 49–58.

Hung J., S. Lam, J. LeRiche, B. Palcic (1991) Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue. *Lasers Surg. Med.*, 11, 99–105.

Isner J.M., R.H. Clarke (1984) The current status of lasers in the treatment of cardiovascular disease. *IEEE J. Quantum Electron.*, QE-20, 1406–1420.

Isner J.M., P.G. Steg, R.H. Clarke (1987) Current status of cardiovascular laser therapy. *IEEE J. Quantum Electron.*, QE-23, 1756–1771.

Kapadia C.R., F.W. Cutruzzola, K.M. O'Brian, M.L. Stetz, L.I. Deckelbaum (1990) Laser-induced fluorescence spectroscopy of human colonic mucosa. *Gastroenterology*, 99, 150–157.

Keith R.I., Y.E. Miller, R.M. Gemmill et al (2000) Angiogenic squamous dysplasia in bronch of individuals at high risk for lung cancer. *Clin. Cancer Res.*, 6, 1616–1625.

Kittrell C., R.L. Willett, C. de los Santos-Pacheo, N.B. Ratiff, J.R. Kramer, E.G. Malk, M.S. Feld (1985) Diagnosis of fibrous arterial atherosclerosis using fluorescence. *Appl. Optics*, 24, 2280–2281.

Kozlovaitė V. (2002) Aterosklerozė ir trombocitų disfunkcija. *Biomedicina*, 2, 81–83.

Kriegmair M., R. Baumgartner, R. Knuechel, P. Steinbach, A. Ehsan, W. Lumper, F. F. Hofstadter, A. Hofstetter (1994) Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid. *Urology*, 44, 836–841.

Kriegmair M., R. Baumgartner, R. Knuechel, H. Stepp, F. Hofstadter, A. Hofstetter (1996) Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced porphyrin fluorescence. *J.Urol.*, 155, 105–110.

Laifer L.I., K.M. O'Brien, M.L. Stetz, G.R. Gindi, T.J. Garrand, L.I. Deckelbaum (1989) Biochemical basis for the difference between normal and atherosclerotic arterial fluorescence. *Circulation*, 80, 1893–1901.

Lee R.T., P. Libby (1997) The unstable atheroma. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17, 1859–1867.

Leon M.B., D.Y. Lu, L.G. Prevosti, W.W. Macy, P.D. Smith, M. Granovsky, R.F. Bonner, R.S. Balaban (1988) Human arterial surface fluorescence: atherosclerotic plaque identification and effects of laser atheroma ablation. *J. Amer. Coll. Cardiol.*, 12, 94–112.

Lohmann W., J. Mussmann, C. Lohmann, W. Kunzel (1989) Native fluorescence of the cervix uteri as a marker for dysplasia and invasive carcinoma. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 31, 249–253.

Lucas A., M.J. Radosavljevic, E. Lu, E.J. Gaffney (1990) Characterization of human coronary artery atherosclerotic plaque fluorescence emission. *Can. J. Cardiol.*, 6, 219.

Maarek J.M., L. Marcu, M. Fishbein, W.S. Grundfest (2000 a) Time-resolved fluorescence of aortic wall: use for improved identification of atherosclerotic lesions. *Lasers Surg.Med.*, 27, 241–254.

Maarek J.M., L. Marcu, W.J. Snyder, W.S. Grundfest (2000 b) Time-resolved fluorescence spectra of arterial fluorescent compounds reconstruction with Laguerre expansion technique. *Photochem.Photobiol.*, 71, 178–187.

Marchesini R., M. Brambilla, E. Pignoli, G. Bottiroli, A.C. Croce, M.D. Fante, P. Spinelli, S. di Palma (1992) Light induced fluorescence spectroscopy of adenomas, adenocarcinomas and non-neoplastic mucosa in human colon. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 14, 219–230.

Marcu L., D. Cohen, J.M. Maarek, W.S. Grundfest (2000) Characterization of type I, II, III, IV and V collagens by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy. *Optical biopsy III. SPIE Proc.*, 3917, 93–101.

Marcu L., J.M. Maarek, W.S. Grundfest (1998) Time-resolved laser-induced fluorescence of lipids involved in development of atherosclerotic lesion lipid-rich core. *Optical biopsy II. SPIE Proc.*, 3250, 158–167.

Marcu L., M. Fishbein, J.M. Maarek, W.S. Grundfest (2001 a) Discrimination of lipid-rich atherosclerotic lesions of human coronary artery by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy. *Atheroscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 21, 1244–1250.

Marcu L., W.S. Grundfest, J.M. Maarek, (2001 b) Arterial fluorescent components involved in atherosclerotic plaque instability: differentiation by time-resolved fluorescence spectroscopy. *Advanced characterization, therapeutics, and systems XI. SPIE Proc.*, 4244, 428–433.

Marcu L., W.S. Grundfest M. Fishbein (2003) Time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy for staging atherosclerotic lesions. In: Ed. M.-A. Mycek, B.W.Pogue. *Handbook of biomedical fluorescence*, Marcel Dekker, Inc., New-York-Basel, 397–430.

Moreno P.R., R.A. Lodder, W.N. O'Connor, V.A. Vyalkov, K.R. Purushotham, J.E. Muller (1999) Characterization of vulnerable plaques by near infrared spectroscopy in an atherosclerotic rabbit model. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 33, 66 A.

Oraevsky A.A., S.L. Jacques, G.H. Petit, R.A. Sauerbrey, F.K. Tittel, J.H. Nguy, P.D. Henry (1993) XeCl laser-induced fluorescence of atherosclerotic arteries. *Circ. Res.*, 72, 84–90.

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

Pitts J., R. Sloboda, K. Dragnev, E. Dmitrovsky, M. Mycek (2001) Autofluorescence characteristics of immortalized and carcinogen-transformed human bronchial epithelial cells. *J. Biomed. Opt.*, 6, 31–40.

Pollack M.A., A. Taylor, J. Taylor, R.J. Williams (1942) B vitamins in cancerous tissues I. Riboflavin. *Cancer Res.*, 2, 739–742.

Praškevičius A., L. Ivanovienė, N. Stasiūnienė, J. Burneckienė, H. Rodovičius, L. Lukoševičius, D. Kondratas (2003) *Biochemija*. Kaunas: KMU leidykla.

Ramanujam N., M.F. Mitchell, A. Mahadevan, S. Thomsen, E. Silva, R.R. Richards-Kortum (1994) *In vivo* diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337 nm laser induced fluorescence. *Proc.Natl.Acad.Sci.*, 91, 10193–10197.

Ramanujam N., M.F. Mitchell, A. Mahadevan, S. Thomsen, A. malpica, T. Wright, N. Atkinson, R.R. Richards-Kortum (1996). Spectroscopic diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia (CIN *in vivo* using laser induced fluorescence spectra at multiple excitation wavelengths). *Lasers Surg. Med.*, 19, 63–74.

Richards-Kortum R.R., R.P. Rava, R. Cothren, A. Metha, M. Fitzmaurice, N.B. Ratliff, J.R. Kramer, C. Kitrell, M.S. Feld (1989) A model for extraction of diagnostic

information from laser induced fluorescence spectra of human artery wall. *Spectrochim. Acta*, 45A, 87–93.

Richards-Kortum R.R., R.Drezek, K. Basen-Enquist, S.B. Cantor, U. Utzinger, C. Brookner, M. Follen (2003) Cervical dysplasia diagnosis with fluorescence spectroscopy. In: Ed. M.-A. Mycek, B.W. Pogue. *Handbook of biomedical fluorescence*, Marcel Dekker, Inc., New-York-Basel, 265–313.

Romer T.J., J.F. Brennan III, M. Fitzmaurice, M.L. Feldstein, G. Deinum, J.L. Myles, J.R. Kramer, R.S. Lees, M.S. Feld (1998) Histopathology of human coronary atherosclerosis by quantifying its chemical composition with Raman spectroscopy. *Circulation*, 97, 878–885.

Romer T., M. Fitzmaurice, M. Cothren, R. Richards-Kortum, R. Petras, M. Sivak, J. Kramer (1995) Laser-induced fluorescence microscopy of normal colon and dysplasia in colonic adenomas: implications for spectroscopic diagnosis. *Am. J. Gastroenterol.*, 90, 81–87.

Sartori M., R. Sauerbrey, S. Kubodera, F.K. Tittel, R. Roberts, P.D. Henry (1987) Autofluorescence maps of atherosclerotic human arteries – A new technique in medical imaging. *IEEE J. Quantum Electr.*, QE-23, 1794–1797.

Schomacker K., J. Frisoli, C. Compton, T. Flotte, J.M. Richter, N. Nishioka, T. Deutsch (1992) Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential. *Lasers Surg. Med.*, 12, 63–78.

Shah P.K. (1996) Pathophysiology of plaque rupture and the concept of plaque stabilization. *Cardiol. Clin.*, 14, 17–29.

Shinnar M., J.T. Fallon, S. Wehrli, M. Levin, D. Dalmacy, Z.A. Fayad, J.J. Badimon, M. Harrington, E. Harrington, V. Fuster (1999) The diagnostic accuracy of *ex vivo* MRI for human atherosclerotic plaque characterization. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 19, 2756–2761.

Stalioraitytė E., R. Ptašekas, D. Pangonytė, J. Lašienė, L. Griciūtė, R. Gailys, M. Simanaitis, A. Laurinavičius, Z. Stukonienė (2001) *Patologinė anatomija*, Kaunas.

Stary H.C., D.H. Blankenhorn, A.B. Chandler, S. Glagov, W. Insull Jr., M. Richardson, M.E. Rosenfeld, S.A. Schaffer, C.J. Schwartz, W.D. Wagner, R.W. Wissler (1992) A definition of the intima of arteries and of its atherosclerosis-prone regions: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation*, 85, 391–405.

Stary H.C., A.B. Chandler, R.E. Dinsmore, V. Fuster, S. Glagov, W. Insull Jr., M.E. Rosenfeld, C.J. Schwartz, W.D. Wagner, R.W. Wissler (1995) A definition of advanced

types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis. A report from the Committee on vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 15, 1512–1531.

Svanberg K., E. Kjellen, J. Ankerst, S. Montan, E. Sjöholm, S. Svanberg (1986) Fluorescence studies of hematoporphyrin derivative in normal and malignant rat tissue. *Cancer Res.*, 46, 3803–3808.

Vallahajosula S., V. Fuster (1997) Atherosclerosis: imaging techniques and the evolving role of nuclear medicine. *J. Nucl. Med.*, 38, 1788–1796.

Verbunt R.J., M.A. Fitzmaurice, J.R. Kramer, N.B. Ratliff, C. Kittrell, P. Taroni, R.M. Cothren, J. Baraga, M.S. Feld (1992) Characterization of ultraviolet-induced autofluorescence of ceroid deposits and other structures in atherosclerotic plaques as a potential diagnostic for laser angioplasty. *Am. Heart J.*, 123, 208–216.

Vo-Dinh T., M. Panjehpour, B.F. Overholt (1998) Laser-induced fluorescence for esophageal cancer and dysplasia diagnosis. *Ann. of the NY Acad.Sci.*, 838, 116–122.

Wagnieres G., A. McWilliams, S. Lam (2003) Lung cancer imaging with fluorescence endoscopy. In: Ed. M.-A. Mycek, B.W.Pogue. *Handbook of biomedical fluorescence*, Marcel Dekker, Inc., New-York-Basel, 361–396.

Zellweger M., P. Grosjean, D. Goujon, P. Monnier, H. Van Den Berg, G. Wagnieres (2001 a) Autofluorescence spectroscopy to characterize the histopathological status of bronchial tissue *in vivo*. *J. Biomed. Opt.*, 6, 41–52.

Zellweger M., D. Goujon, M. Forrer, H. Van Den Berg, G. Wagnieres (2001 b) Absolute autofluorescence spectra of healthy bronchial tissue *in vivo*. *Appl. Opt.*, 40, 3784–3791.

Zonios G., R. Cothren, J.M. Crawford, M. Fitzmaurice, R. Manoharan, J. van Dam, M.S. Feld (1998) Spectral pathology. *Ann. of the NY Acad.Sci.*, 838, 108–115.