



2004-2006m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto 5 priemonė
„Žmogiškųjų išteklių kokybės gerinimas mokslinių tyrimų ir inovacijų srityje“

**Projektas: Fizinių mokslų II ir III studijų pakopų pertvarka, jas pritaikant prioritetinių
MTEP sričių vystymui**

Projekto numeris BPD2004-ESF-2.5.0-03-05/0012

Biofizikos rinktiniai laboratoriniai darbai

Parengė: S.Bagdonas, M.Vengris

Vilnius 2006-2008

Biofizikos rinktiniai laboratoriniai darbai

Paskaitų konspektas

TURINYS

IVADAS

1. ŠVIESA IR BIOLOGINIS OBJEKTAS

1.1. Biomedicininė fotonika

1.2. Kiekybinis biologinių audinių optinių parametrų įvertinimas

2. FLUORESCENCIJOS REGISTRAVIMO TECHNIKOS

2.1. Optinės biopsijos schema

2.2. Šviesos šaltiniai

2.2.1. Lempos

2.2.2. Lazeriniai šviesos šaltiniai

2.2.2.1. Argono lazeris

2.2.3 Šviesą emituojantys diodai (LED)

2.3. Fluorescencijos žadinimo–surinkimo sistema

2.3.1 Spindulinė žadinimo–surinkimo sistema

2.3.1.1. Monochromatorius

2.3.2. Šviesolaidinė žadinimo–surinkimo sistema

2.3.2.1. Šviesolaidžiai

2.3.2.2. Filtrai

2.4. Detektoriai

2.4.1. Fotodaugintuvai

2.4.2. CCD detektoriai

2.5. Optinės biopsijos prietaisai

2.5.1. Spindulinis optinės biopsijos prietaisas

2.5.2. Šviesolaidinis optinės biopsijos prietaisas

2.6. Optinė biopsija su laikine skiriamąja geba

3. METODINIS PRIEDAS

3.1. Fluorescencijos spektroskopijos principai

3.2. Sugerties spektroskopijos principai

IVADAS

Saugaus darbo Biofotonikos laboratorijoje taisyklės

Biofotonikos laboratoriniai darbai skirti praktiškai supažindinti su nuostoviosios spektroskopijos metodais, kuriuos galima panaudoti biologiniu požiūriu svarbių molekulių, modeliųjų sistemų ir biologinių objektų tyrimuose.

Prieš pradėdant kiekvieną darbą, privalu susipažinti su jam priskirta eksperimentine aparatūra, išsiaiškinti jos veikimą. Darbą pradėti galima tik gavus laboranto ar dėstytojo leidimą.

Laboratorinių darbų metu naudojamų lazerinių šviesos šaltinių spinduliuotė nėra pavojinga kontakto su kūno paviršiumi atveju, tačiau gali sukelti regos sutrikimus, jai tiesiogiai patekus į akį. Todėl kai lazerinis šaltinis įjungtas, griežtai draudžiama lankstytis virš darbo stalo, taip pat sukioti optinius elementus, neišsiaiškinus jų paskirties.

Atliekant spektroskopinius matavimus su UV spinduliuotės šaltiniais, draudžiama žiūrėti į šaltinio spinduliuotės angą. Jei spinduliuotė įvesta į šviesolaidį, negalima žiūrėti į jo galą. UV spinduliuotė gali sukelti negrįžtamus lęšiuko pažeidimus.

Jei darbo metu bandinių paruošimui naudojami rūgštiniai ar šarminiai tirpikliai, privalu dirbti su apsauginėmis pirštinėmis. Tirpalų paruošimas atliekamas tik specialiai tam skirtoje vietoje, prie chemiškai atsparia danga padengto stalo. Darbas su lakiais organiniais tirpikliais atliekamas tam skirtoje traukos spintoje. Ant paruoštų tirpalų indų, taip pat bandinių taros turi būti užklijuojama etiketė, kurioje nurodoma medžiaga, jos koncentracija, tirpiklis, bei paruošimo data.

Biologinių audinių bandiniai, skirti laboratoriniams tyrimams, turi būti saugomi šaldiklyje. Atliekant darbą, privalu paimti tik reikiamą bandinių kiekį. Atšildytų bandinių negalima dėti atgal į šaldiklį. Visi panaudoti bandiniai privalo būti grąžinami laborantui.

1. ŠVIESA IR BIOLOGINIS OBJEKTAS

1.1. Biomedicininė fotonika

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

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

Šviesos prigimtis. Šviesos prigimties problemos žmoniją domino labai seniai. Antikinės Graikijos mąstytojai Aristotelis, Platonas ir Euklidas pirmieji suformulavo pagrindinius šviesos sklaidimo ir atspindžio dėsnius, tačiau net iki XIX a. pradžios buvo manoma, kad šviesa yra šviesos šaltinio skleidžiamas dalelių srautas, kuris, patekęs į akį, stimuliuoja regėjimą. Šią idėją ypač rėmė I.Niutonas. Jis XVII a. antrojoje pusėje išplėtojo korpuskulinės šviesos prigimties teorijos sampratą ir ja remdamasis aiškino šviesos atspindžio ir lūžio reiškinius. Niutono amžininkas olandų mokslininkas K.Hiugensas manė, kad šviesa – tai bangos, plintančios nuo šviesos šaltinio į aplinką. Jis 1670 m. padėjo pagrindus banginės šviesos prigimties sampratai, tačiau nesukūrė nuoseklios teorijos, kuri būtų galėjusi konkuruoti su Niutono korpuskuline teorija. Maždaug tuo pačiu metu (1665 m.) F.Grimaldis

eksperimentiškai pagrindė difrakcijos ir interferencijos reiškinius, tačiau daugelis mokslininkų, veikiami didžiulio Niutono autoriteto, dar maždaug šimtmetį laikėsi korpuskulinės teorijos, nepripažindami banginės šviesos prigimties.

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

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

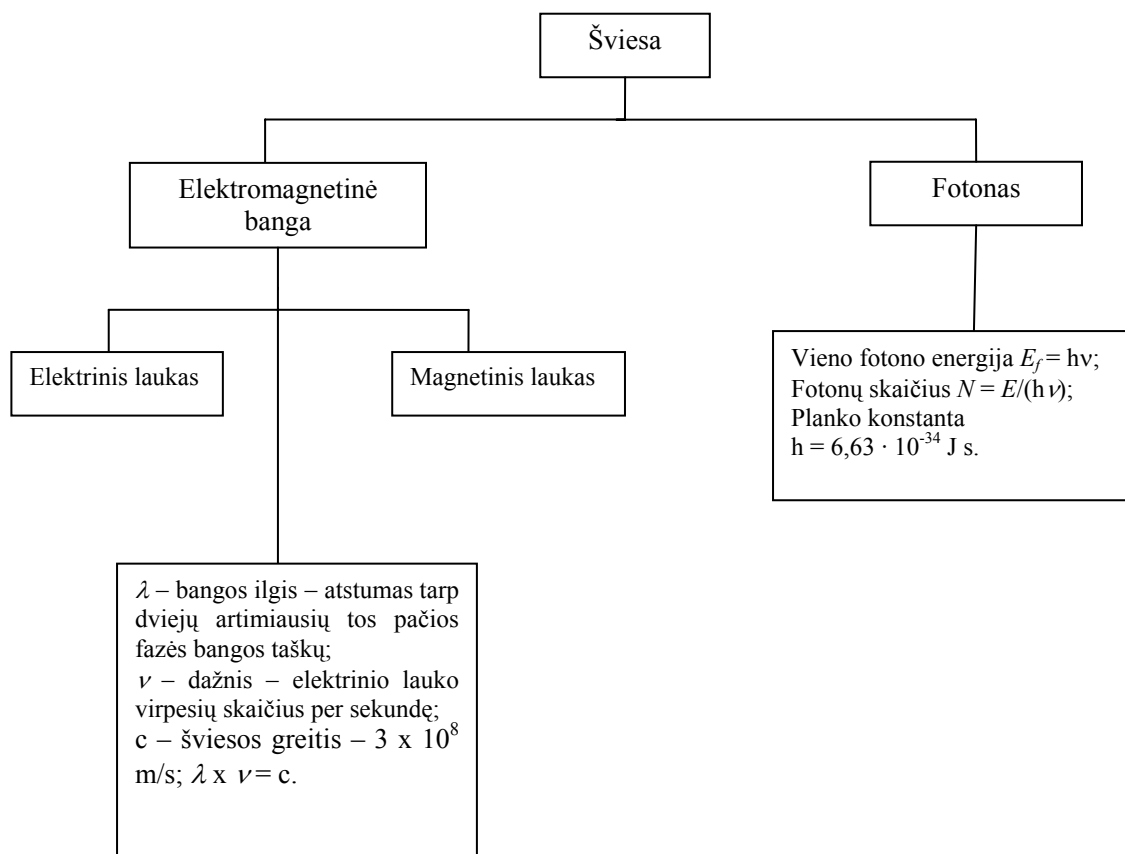
Vėlesni kitų mokslininkų tyrimai pademonstravo, kad elektromagnetinėms bangoms būdingi atspindžio, lūžio ir kiti optiniai reiškiniai. Tačiau elektrodinaminė teorija, pagrindusi šviesos kaip elektromagnetinės bangos sampratą, vis dėlto nesugebėjo paaiškinti šviesos sugerties ir emisijos dėsningumų. Tik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

Fotono energijos išraiška (1.1) sujungia abi šviesos prigimtis:

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

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

Dvilypę šviesos prigimtį apibūdinantys parametrai pateikiami 1.1 paveiksle.

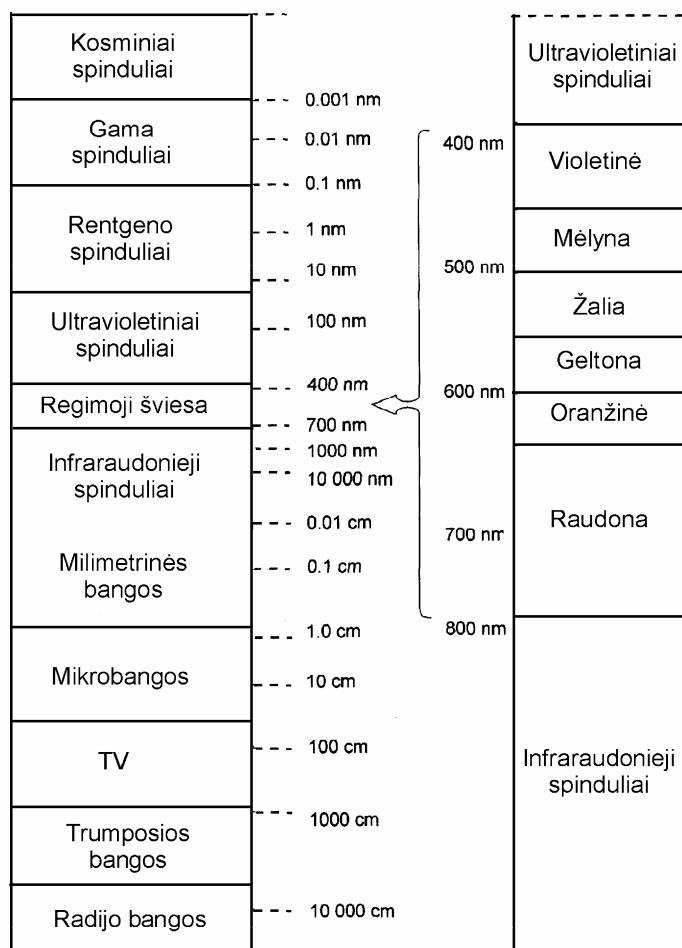


1.1 pav. Dvejopą šviesos prigimtį atspindintys parametrai

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

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

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



Elektromagnetinių bangų spektras

1.2 pav. Elektromagnetinių bangų spektras

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

Optinė biopsija. Biomedicininė fotonika gali būti apibrėžta kaip mokslo ir technologijų sritis, nagrinėjanti visą elektromagnetinių bangų spektrą ir jų sąveiką su biologiniu objektu. Ši sritis jungia mokslo kryptis, kurios tiria ne tik įvairius šviesos fotonų ir jų sąveikos su biologiniu objektu aspektus, bet taip pat apima optines ir ne tik optines technologijas, susijusias su elektromagnetinių bangų fotono sąvoka. Tai gali būti didelės energijos kosminiai, gama ar rentgeno spinduliai ir mažos energijos šiluminis arba mikrobangų spinduliavimas. Biomedicininės fotonikos sąvoka apima fotonų sugertį, emisiją, medžiagų pralaidumą fotonams, sklaidą ir šviesos stiprinimą. Jai priklauso medžiagos ir fotono sąveikos tyrimo metodai ir technologijos, tokios kaip lazeriai ir kiti šviesos šaltiniai, šviesolaidžiai, elektrooptiniai prietaisai, sudėtingos mikromechaninės ir mikroskopinės

sistemos ir, žinoma, nanosistemos, kurios dar tik pradeda skintis kelią į įvairiausias žmonių veiklos sferas. Suprantama, kad šios mokslo ir technologijų sritys yra labai plačios ir biomedicininė fotonika apima jose tik tą dalį, kuri susijusi su ligų diagnostavimu, gydymu ir profilaktika. Optinė biopsija yra dar siauresnė sritis, susijusi su tiesioginiu šviesos fotonų panaudojimu medicininei diagnostikai. Tiesa, reikėtų pažymėti, kad nėra griežtos ribos tarp atskirų elektromagnetinės spinduliuotės spektrinių ruožų. Netgi žmonių akys mato skirtingai. Regimosios šviesos srities skirtingų bangos ilgių šviesą žmogaus akis mato kaip skirtingų spalvų šviesą labai individualiai, intervalais nuo 20 nm iki 160 nm. Taigi spalvos yra ne šviesos savybė, o subjektyvus fiziologinis ir psichologinis individo atsakas į šviesą. Vienų akys mato tolesnėje infraraudonoje spektro srityje spinduliuojančius fotonus, kitų žmonių akies jautrumas šiai spektro sričiai yra mažesnis. Optinė biopsija siejama ir su tomis elektromagnetinio spektro sritimis, kurios yra už regimosios šviesos ruožo ribų, t. y. jai priskiriama dalis ultravioletinės ir artimosios infraraudonosios spektro srities.

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

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

Fluorescenciją naudoti medicininei diagnostikai pradėta XX a. trečiajame dešimtmetyje, kai prancūzas A. Polikardas Lione, atlikdamas eksperimentus su žiurkėmis, kurioms buvo įskiepyta sarkoma, pastebėjo raudoną navikų fluorescenciją apšvietus juos ultravioletine šviesa. Jis teisingai priskyrė ją navike susikaupusiam endogeniniam porfirinui (Policard, 1924). 1942 m. paskelbti duomenys apie egzogeninio hematoporfirino kaupimąsi eksperimentinių gyvūnų navikuose ir jo raudoną fluorescenciją (Auler ir Banzer, 1942; Figge, 1942). Tai buvo pirmosios optinės biopsijos – iš audinių optinių savybių nustatytos ligos pažeistos vietos.

1.2. Kiekybinis biologinių audinių optinių parametrų įvertinimas

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

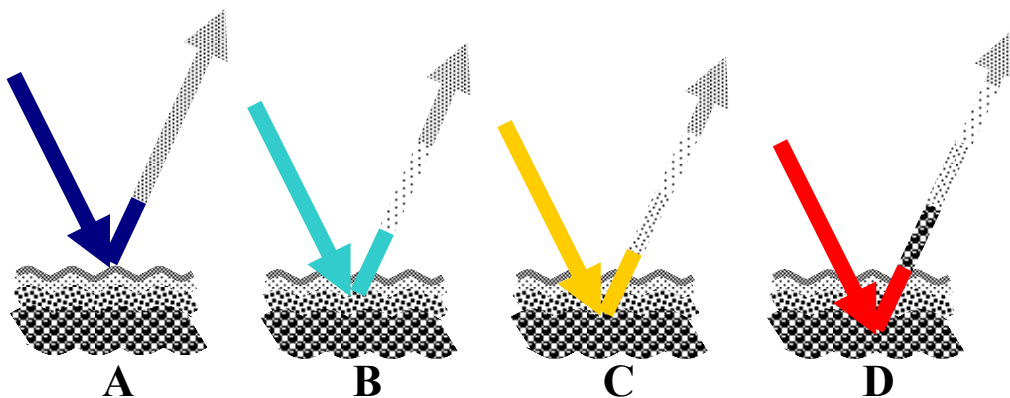
Audinių fluoroforų tyrimams buvo dėta daug pastangų. Daugelis jų buvo aptikti taikant įvairius spektroskopinius metodus, pavyzdžiui, tokius kaip žadinimo–fluorescencijos matricos ir fluorescencijos su laikine skyra spektroskopija. Fluorescencinė mikroskopija ir mikrospektrofluorimetrija taip pat buvo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

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

- atsispindėti nuo audinio paviršiaus;
- prasiskverbti pro audinį nesukeldama jame jokių vyksmų;
- būti sugerta audinio molekulių ir inicijuoti fotochemines reakcijas;
- būti išsklaidyta audinyje, nes jis yra nehomogeniškas;
- būti sugerta fluoroforų ir išspinduliuota fluorescencijos pavidalu.

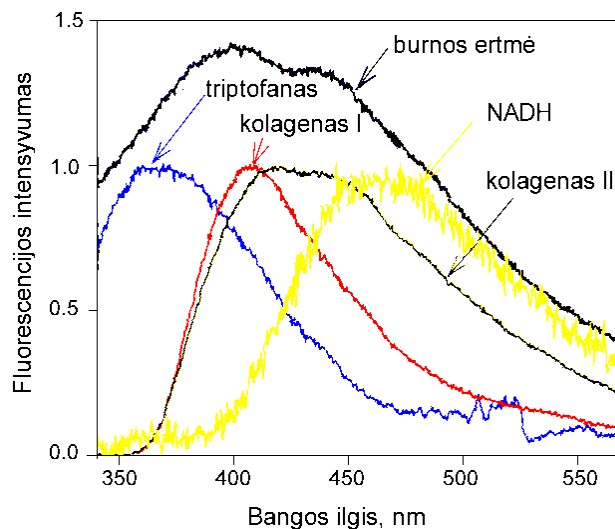
Sužadintos audinių savitosios fluorescencijos šviesa taip pat yra sklaidoma audinio komponentų, dalį jos gali sugerti kiti chromoforai, kita dalis išspinduliuojama nuo audinio paviršiaus. Tad visada privalu prisiminti, kad audinio paviršiuje matuojamos fluorescencijos signalas nebus gryna fluoroforo fluorescencija, spektre atsispindės ir šviesą tik sugeriančių ar tik sklaidančių dalelių indėlis. Be to, fluoroforai yra netolygiai pasiskirstę audinio paviršiuje, taip pat ir nevienodame gylyje. Todėl nuo audinio paviršiaus pamatuotas fluorescencijos spektras bus kiek kitoks negu iš gilesnių sluoksnių. Įvairių gylių sluoksnių fluorescencijos spektrai gali būti skirtingi, o matuojant juos audinio paviršiuje gaunamas įvairių sluoksnių fluorescencijų mišinys. Santykinis įvairių gylių fluorescencijos spektrų indėlis į realiai nuo audinio paviršiaus pamatuotą spektrą priklauso ne tik nuo audinio fluorescencinių savybių, bet ir nuo fluorescenciją žadinančios bangos ilgio, nes skirtingų bangos ilgių šviesa

išsiskverbia į audinį skirtingu gyliu (1.3 pav.), tad audinio paviršiuje matuojama fluorescencija, priklausomai nuo žadinančios bangos ilgio, atspindės skirtingo gylio sluoksnių fluorescencijų derinius.



1.3 pav. Skirtingų bangos ilgių šviesa išsiskverbia į audinį skirtingu gyliu

Audinius sudaro sudėtingas įvairiausių molekulių mišinys, tačiau už audinių savitąją fluorescenciją atsakingi keli fluoroforai, kurių svarbiausieji yra baltymų sudėtyje esančios aminorūgštys (triptofanas, tirozinas ir fenilalaninas), fibriliniai baltymai kolagenas ir elastinas, redukuotas nikotinamidadeninukleotidas NADH ir jo fosfatas (NADPH), flavinai ir flavoproteinai, lipopigmentai, β -karotinas ir porfirinai. Todėl audinių savitosios fluorescencijos spektrų juostos yra plačios ir dengia viena kitą, o viso spektro forma yra neišraiškinga palyginus su atskirų fluoroforų spektrais (1.4 pav.).



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

Fluoroforai turi jiems būdingus:

- sugerties koeficientą, nurodantį tikimybę sugerti šviesos fotoną šviesos kelio ilgio vienetė;

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

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

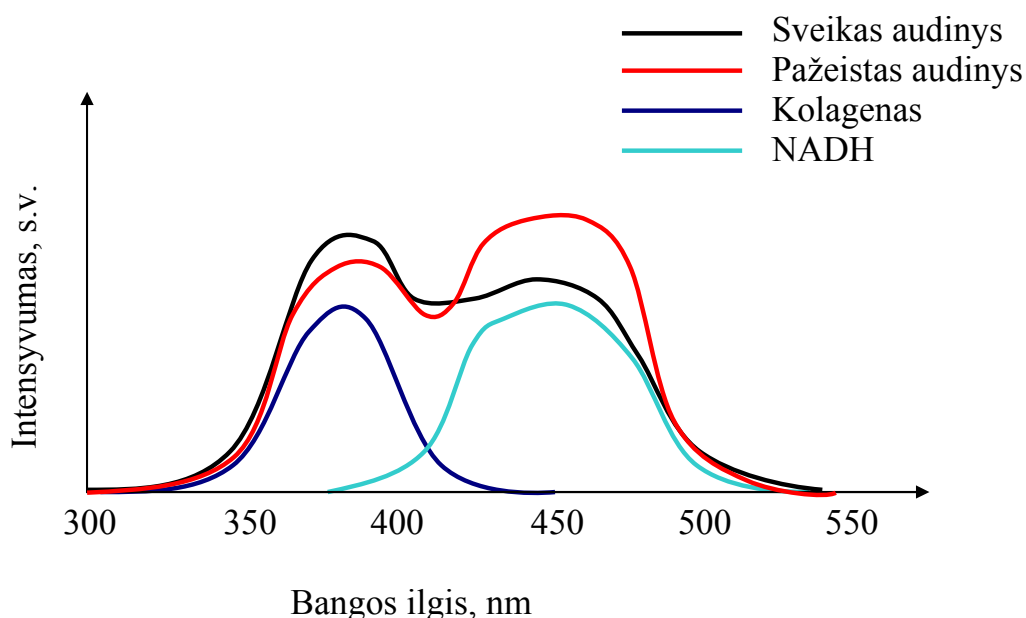
1.1 lentelė. Biologinių audinių endogeniniai fluoroforai

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

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

Kol kas dar gana menkai suprasta audinio biochemijos ir jo fluorescencijos sąsaja. Navikų ar kitokių pažeidimų audiniuose sukelti biocheminiai ir morfologiniai pokyčiai keičia

audinių spektrines savybes, tačiau tų pokyčių priežastys nėra iki galo suprastos. Kadangi ne visada žinomos spektre atsispindinčios audinio savybės, neįmanoma iki galo įvertinti spektrų teikiamos diagnostinės informacijos. Epitelio sluoksnio sustorėjimas, kuris yra būdingas, pavyzdžiui, displazijos pažeistiems gimdos kaklelio audiniams, gali paaiškinti, kodėl sumažėja kolageno fluorescencijos įnašas į audinio savitosios fluorescencijos spektrą. Taip pat egzistuoja hipotezė, kad ligos pažeistame audinyje yra suaktyvėjusi medžiagų apykaita, dėl to padidėja redukuotų elektronų nešiklių NADH ir FADH_2 koncentracija ir sumažėja oksiduotų elektronų nešiklių NAD ir FAD koncentracija. Dėl to ligos pažeistų audinių savitosios fluorescencijos spektre padidėja NADH ir FADH_2 fluorescencijos intensyvumas, palyginti su sveikais audiniais (1.5 pav.).

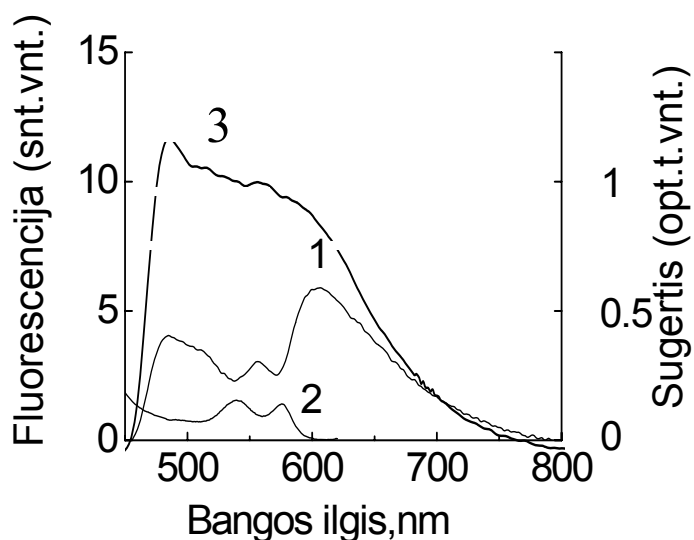


1.5 pav. Ligos sukelti kolageno ir NADH fluorescencijos intensyvumų pokyčiai

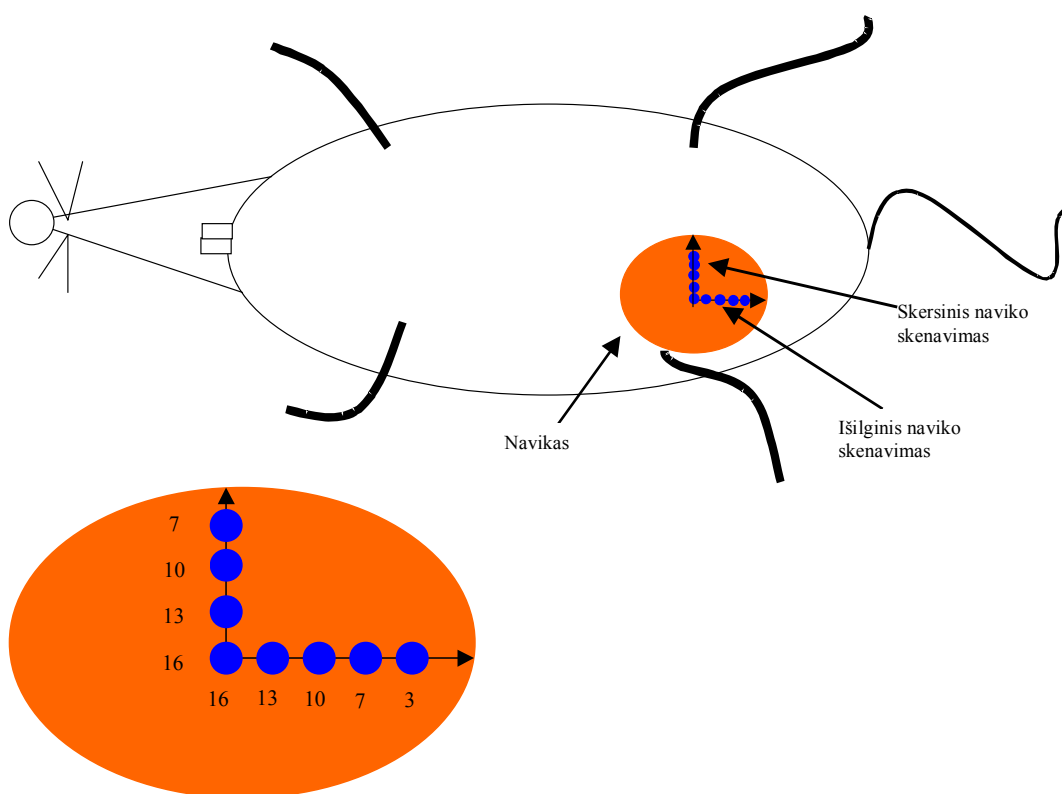
Metabolizmo spartos skirtumai gali atsispindėti sveikų ir ligos pažeistų audinių spektruose. Nustatyta, kad NADH fluorescencija eksponentiškai užgęsta praėjus 2 val. po audinio pašalinimo, nes audiniuose esantis NADH oksiduojasi į nefluorescuojantį NAD. Be to, sveiko ir navikinio audinio pH yra skirtingas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

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

Tai sukelia įvairius fluorescencijos spektrų iškraipymus. Dėl stiprios sugerties ties tam tikrais bangų ilgiais gaunamos tariamos smailės ir įdubos (1.6 pav.).



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

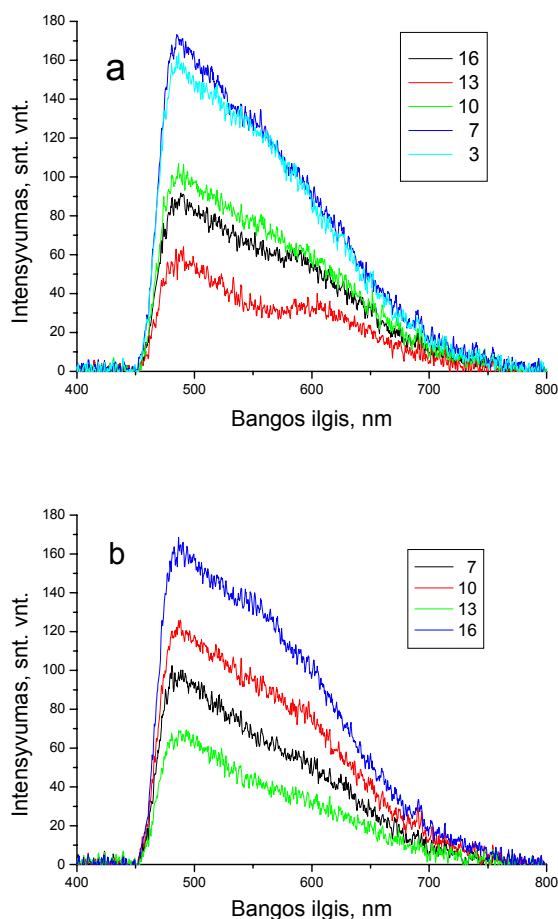


1.7 pav. Eksperimentinės pelės modelinė schema ir skenuojamos naviko vietos

Siekiant įvertinti įvairių veiksnių poveikį navikinių audinių savitosios fluorescencijos spektrams, buvo atliktas eksperimentas, kurio metu buvo matuojami pelės kirkšnyje iškiepyto vidutinio dydžio (1,5 cm) naviko fluorescencijos spektrai. Siekta nustatyti, kiek oda „pridengia” naviko fluorescenciją, t. y. kiek ir kaip iškraipomi spektrai matuojant naviko

(prapjovus odą) ir virš naviko esančios odos savitosios fluorescencijos spektrus. Taip pat buvo stengiamasi kaip galima suvienodinti fluorescencijos žadinimo ir registravimo sąlygas, nes tik taip galima tinkamai įvertinti ir patikimai palyginti nuo odos virš naviko ir nuo atviro naviko paviršiaus matuojamos fluorescencijos intensyvumus. Eksperimento *in vivo* metu pelė buvo užmigdoma ir stabiliai mobilizuojama ant mikrometrinio stalelio. Šitaip buvo galima matuoti odos virš naviko spektrus ir naviko spektrus prapjovus odą tiksliai tose pačiose vietose. Navikas buvo skenuojamas skersai (statmenai pelės uodegai) ir išilgai (lygiagrečiai su pelės uodega), tikintis ir čia rasti dėsningumų. Išilgai pamatuoti penkių vietų fluorescencijos spektrai, o skersai – keturių (1.7 pav.).

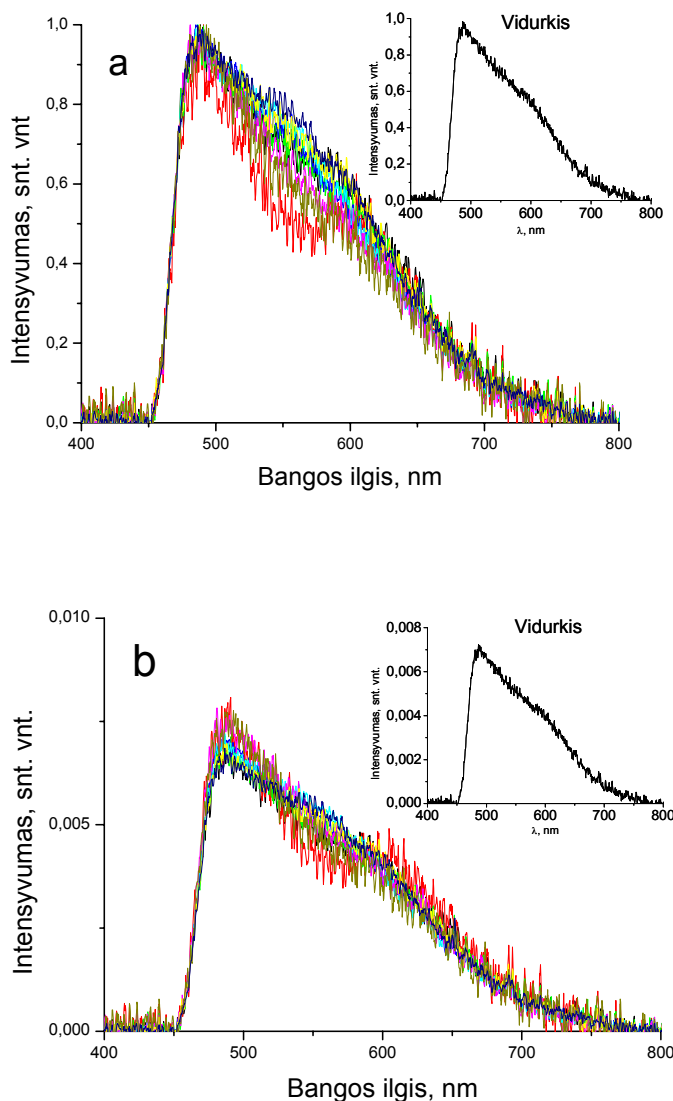
Odos virš naviko išilgai ir skersai (pagal 1.7 pav.) pamatuoti savitosios fluorescencijos spektrai pateikiami 1.8 paveiksle. Matyti, kad fluorescencijos intensyvumas nepriklauso nuo matavimo vietos, ir nėra jokio dėsningo kitimo nuo krypties „centras–kraštas“.



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

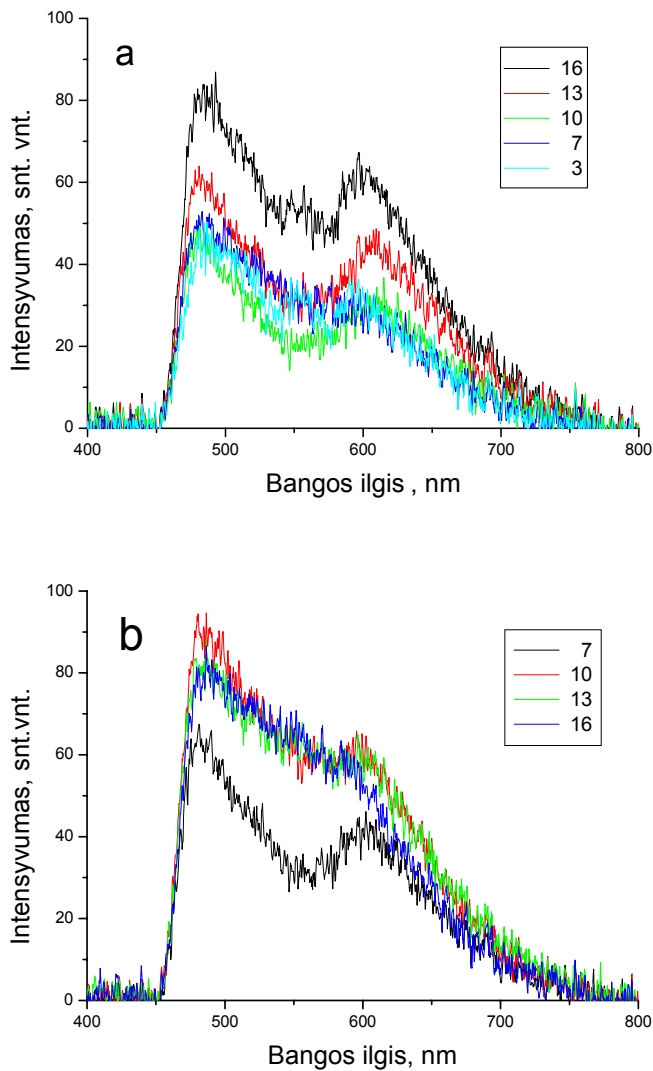
Kadangi nėra skersai ir išilgai matuotų odos spektrų ryškių skirtumų ir neaptikta jokių dėsningumų matuojant spektrus nuo naviko vidurio link krašto, tai visi spektrai buvo analizuojami neatsižvelgiant į matavimo vietą. Kad išryškėtų spektrų formos ypatumai, jie

buvo sunormuoti į didžiausią intensyvumo vertę (1.9 pav. a) ir į matuojamo spektro plotą (1.9 pav. b).



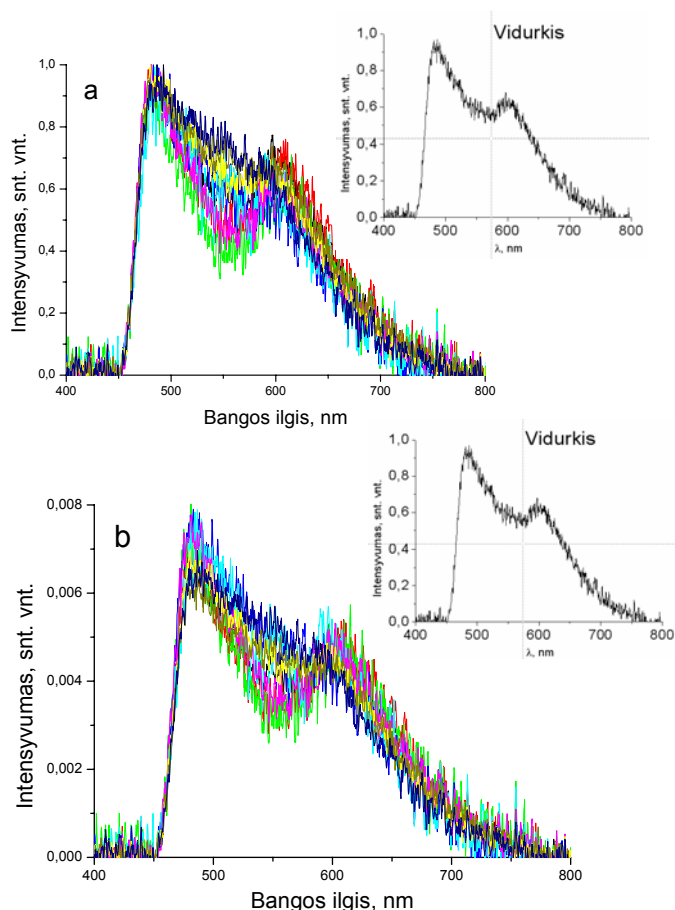
1.9 pav. Į didžiausią intensyvumo vertę (a) ir į spektro plotą (b) normuoti odos virš naviko spektrai. Intarpai vaizduoja spektrų vidurkį

Matyti, kad abiem normavimo atvejais vidurkiniai spektrai yra panašūs. Spektrams būdingas nedidelis petys ties 605–620 nm. Prapjovus odą virš naviko lygiai tose pačiose vietose išmatuoti naviko savitosios fluorescencijos spektrai (1.10 pav.).



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

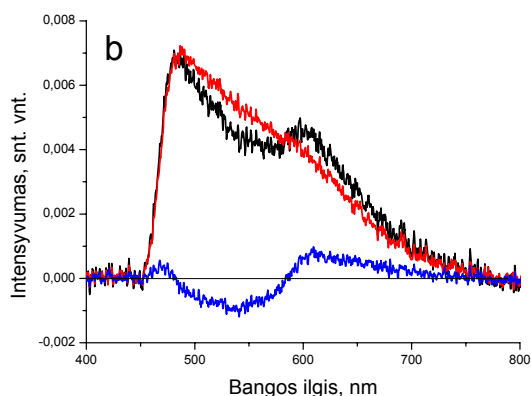
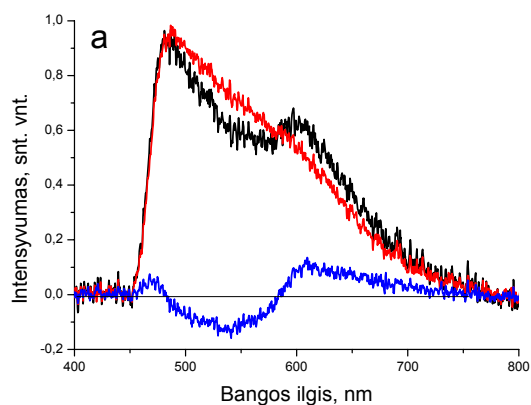
Ir šiuo atveju fluorescencijos intensyvumai yra išsibarstę atsitiktiniu būdu, tad jie analizuojami visi drauge, nepriklausomai nuo to, kaip buvo matuoti (išilgai ar skersai, arčiau ar toliau nuo naviko centro). Svarbu pastebėti, kad odos virš naviko (1.8 pav.) ir paties naviko (1.10 pav.) savitosios fluorescencijos spektrų intensyvumai skiriasi – antru atveju fluorescencijos intensyvumas yra beveik perpus mažesnis. Kaip minėta, eksperimento sąlygos kaip galima buvo palaikomos vienodos, todėl fluorescencijos intensyvumo pokyčiai gali būti laikomi parametru, leidžiančiu atskirti sveiką ir pažeistą audinį. Taigi fluorescencijos signalo intensyvumas matuojant jį tiesiogiai virš naviko yra silpnesnis, palyginti su odos virš naviko fluorescencijos signalo intensyvumu. Spektrai buvo sunormuoti į maksimalų intensyvumą ir į spektro plotą (1.11 pav.).



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

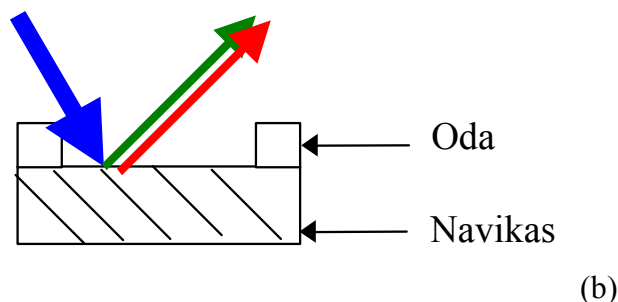
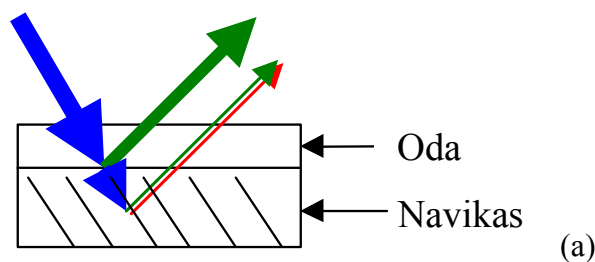
Kaip matyti iš pateiktų paveikslų, nuo odos paviršiaus ir nuo atverto naviko paviršiaus matuotų fluorescencijos spektrų forma skiriasi. Taigi oda nėra tiesiog paprastas sluoksnelis, sumažinantis fluorescencijos, matuojamos tiesiog nuo naviko paviršiaus, intensyvumą, o yra biologinis audinys, dėl savo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

Normuotų spektrų smailė ties 605–620 nm yra žymesnė, taip pat išryškėja įduba ties 570 nm (1.11 pav.). Norint įsitikinti, ar skirtumai gali labiau išryškėti, buvo gauti naviko ir odos virš naviko normuotų savitosios fluorescencijos skirtuminiai spektrai (1.12 pav.). Buvo išvesti normuotų naviko ir odos virš naviko spektrų vidurkiai ir tada iš jų maksimalų intensyvumą normuoto vidurkinio naviko spektro buvo atimtas į maksimalų intensyvumą normuotas vidurkinis odos virš naviko spektras (1.12 pav. a). Analogiška procedūra atlikta ir su į spektro plotą normuotais spektrais (1.12 pav. b).



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

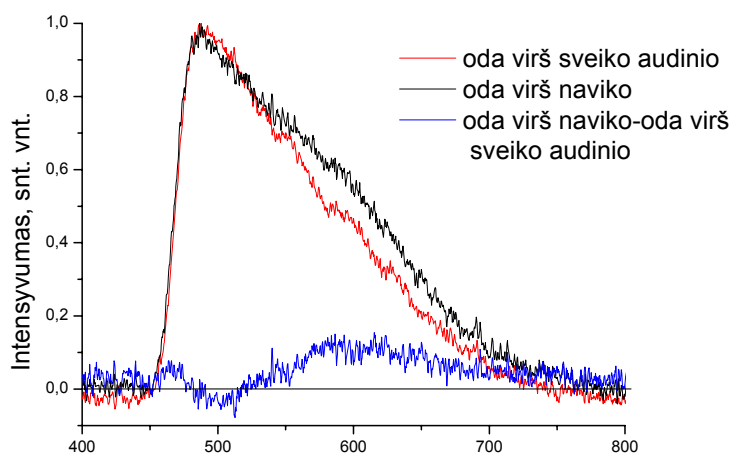
Anksčiau pastebėti skirtumai dar labiau išryškėjo. Navikų spektrų intensyvumas 500–575 nm intervale yra mažesnis nei odos virš naviko spektrų fluorescencijos intensyvumas, tačiau jis yra didesnis 605–640 nm spektriniame intervale. Galima įtarti, kad skirtumai 500–575 nm intervale atsirado dėl hemoglobino sugerties (reabsorbcijos reiškinys). Spektriniame intervale nuo 605 nm iki 640 nm fluorescuoja endogeniniai porfirinai. Tai tikėtinas rezultatas, nes yra žinoma, kad navikiniuose audiniuose kaupiasi daugiau endogeninių porfirinų. Odos virš naviko spektruose endogeninių porfirinų aptikta mažiau nei matuojant fluorescenciją tiesiogiai virš naviko. Šį faktą galima būtų paaiškinti tuo, kad odos sluoksnis tarsi ekranuoja naviko fluorescencijos signalą (1.13 pav.). Matuodami odos virš naviko spektrus fiksuojame bendrą odos ir naviko. Yra žinoma, kad navikinių audinių savitosios fluorescencijos intensyvumas yra mažesnis nei sveikų audinių. Aptariamuoju atveju silpną naviko fluorescencijos signalą kelyje į išorę dar labiau silpnina audinių sklaida ir sugertis. Galima įsivaizduoti, kad odos sluoksnis veikia kaip tam tikras filtras. Šiuo atveju fiksuojama silpna naviko savitoji fluorescencija, o dominuojanti yra odos fluorescencija (1.13 pav. a).



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

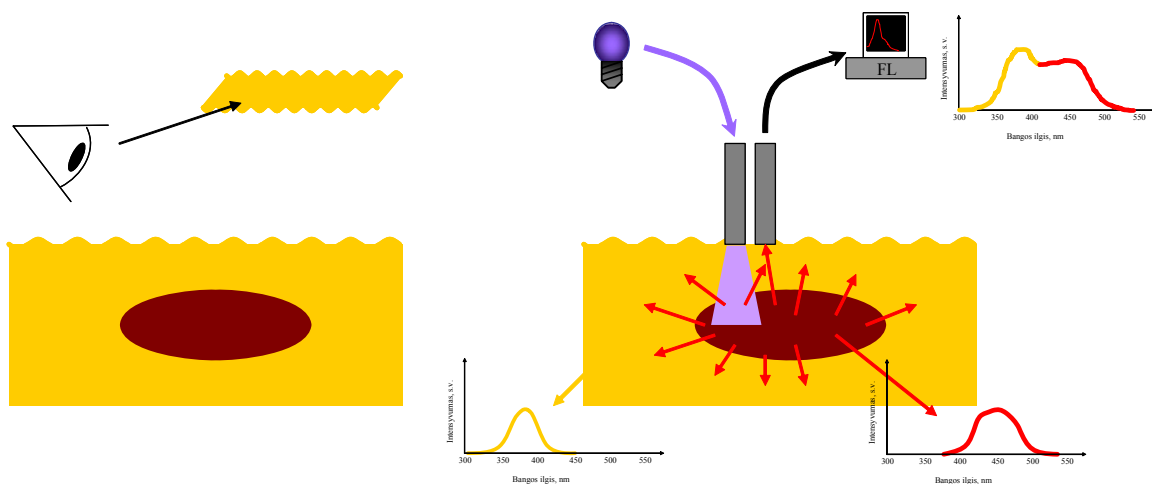
Kai fluorescencija matuojama tiesiogiai virš naviko (1.13 b pav.), registruojamas tik naviko fluorescencijos spektras su jam būdinga endogeninių porfirinų juosta (605–620 nm) (1.11 pav.).

Jei per odą matuojamos naviko savitosios fluorescencijos signalas yra toks silpnas, ar galima atskirti odos virš sveiko audinio ir virš naviko fluorescencijos spektrus? Norint atsakyti į šį klausimą, reikia matuoti odos virš sveikų audinių spektrus ir palyginti juos su jau turimais odos virš naviko spektrais. Virš sveikų eksperimentinės pelės nugaros ir pilvo audinių esančios odos savitosios fluorescencijos spektrų vidurkiai buvo sunormuoti į vienetinį intensyvumą ir atimti iš taip pat normuotų odos virš naviko spektrų (1.14 pav.).



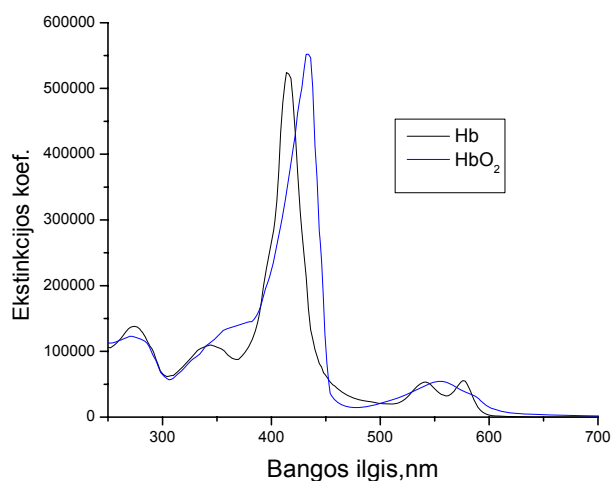
1.14 pav. Į didžiausią intensyvumą normuoti vidurkiniai odos virš sveiko audinio (raudona kreivė) ir odos virš naviko (juoda kreivė) savitosios fluorescencijos spektrai. Odos virš naviko ir odos virš sveiko audinio skirtuminis spektras (mėlyna kreivė)

Iš skirtuminio spektro matyti, kad odos virš naviko savitosios fluorescencijos intensyvumai didesni spektriniame ruože nuo 580 nm iki 620 nm. Šis ruožas atitinka navikų fluorescencijai būdingą endogeninių porfirinų juostą (605–620 nm). Apibendrinant galima pasakyti, kad, matuojant įtariamo navikinio darinio fluorescencijos spektrus net ir per jį dengiantį odos sluoksnį, naviką galima aptikti, kas neįmanoma vizualios apžiūros metu (1.15 pav.).



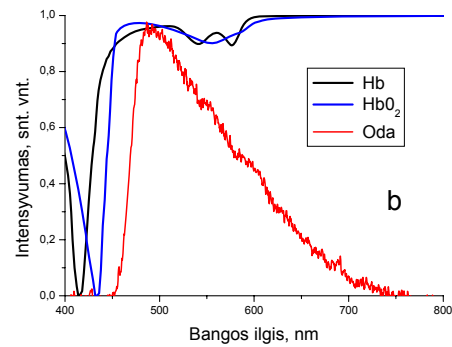
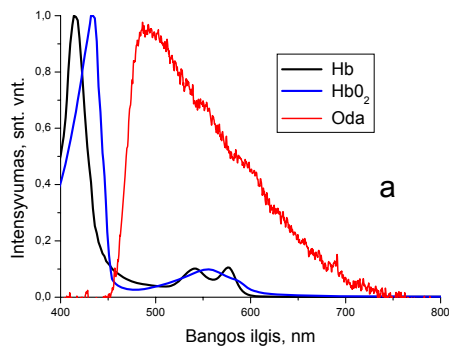
1.15 pav. Naviko diagnostikos galimybių vizualios apžiūros ir optinės diagnostikos metu

Fluorescencijos intensyvumų skirtumai, esantys 500–575 nm intervale, kur navikų spektruose yra įduba (1.12 pav.), greičiausiai, yra hemoglobino sugerties (1.16 pav.) pasekmė.

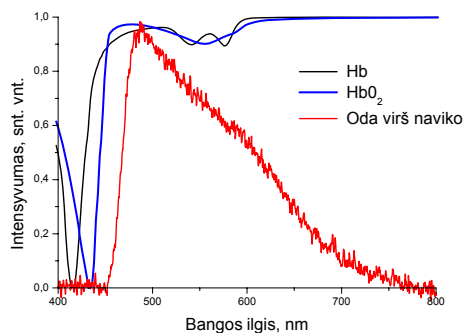


1.16 pav. Oksiduoto (mėlyna kreivė) ir neoksiduoto (juoda kreivė) hemoglobino sugerties spektrai

Norint tai įrodyti, buvo analizuoti tos pačios pelės odos virš sveiko audinio, odos virš naviko, raumens, naviko ir naviko pjūvio fluorescencijos spektrai. Suvidurkinti ir į vienetinį intensyvumą sunormuoti atitinkamų audinių spektrai sugretinti su normuotais oksiduoto ir neoksiduoto hemoglobino spektrais (1.17 pav.).

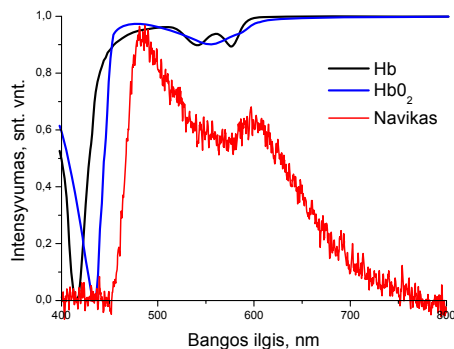


1.17 pav. Normuoti į maksimalų intensyvumą odos virš sveiko audinio savitosios fluorescencijos spektrai, sugretinti su hemoglobino sugerties spektrais (a) ir su invertuotais hemoglobino sugerties spektrais (b).

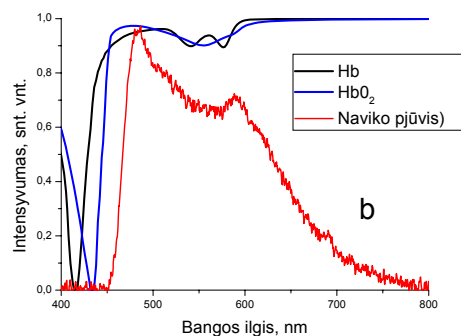
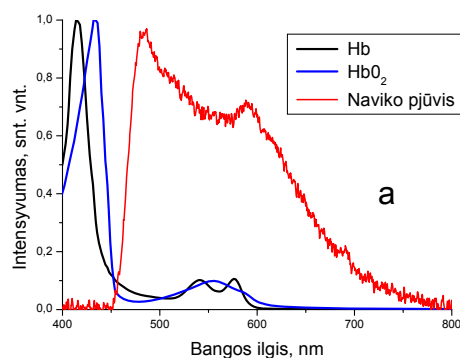


Kaip matyti iš 1.17 paveikslų, hemoglobino sugertis odos fluorescencijos spektrams įtakos neturi.

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



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



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

Iš paveikslų 1.17–1.20 matyti, kad ten, kur yra kraujo ar kraujosruvų (navikas ir naviko pjūvis), dėl hemoglobino sugerties (fluorescencijos reabsorbcijos) registruojamas netikslus savitosios fluorescencijos spektras. Kadangi odos paviršiuje kraujo nėra, fluorescencija 500–580 nm intervale yra intensyvesnė ir spektre būdingos įdubos nėra. 1.2 lentelėje pateiktos apskaičiuotos įvairių audinių vidutinės savitosios fluorescencijos intensyvumų vertės.

1.2 lentelė. Įvairių audinių vidutinės savitosios fluorescencijos spektrų intensyvumo vertės

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

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

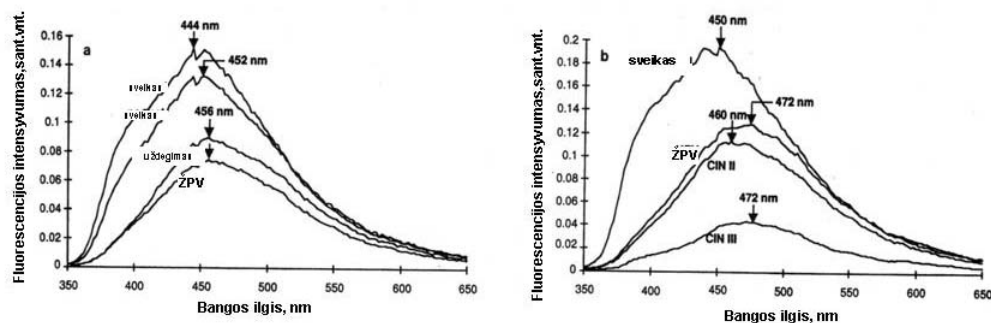
Taigi iš pateikto pavyzdžio matyti, kaip svarbu suprasti dėl biologinio objekto sudėtingumo daugelio veiksnių veikiamus optinius signalus ir tinkamai interpretuoti jų teikiamą informaciją. Tam tikslui tyrinėtojai kuria įvairius modelius, kurie padeda gauti kuo tikslesnę kiekybinę informaciją, apimančią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

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

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

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

Tos pačios grupės atlikti tyrimai ir sudarytas algoritmas, pagrįstas audinių savitosios fluorescencijos intensyvumų palyginimais, padeda identifikuoti histologiškai pakitusį gimdos kaklelį (Ramanujam ir kt., 1994 a). Klinikinio tyrimo metu buvo matuojama 337 nm bangos ilgio lazerio spinduliuote sužadinta tiriamo audinio savitoji fluorescencija. Kolposkopiškai nustatyti pakitę plotai ir prieš imant bandinius biopsijai buvo pamatuoti tų vietų fluorescencijos spektrai. Vidutiniškai matuota po 2 pakitusios ir 2 sveikos vietos spektrus. Buvo imamos tik pakitusių vietų biopsijos. Fluorescencijos spektrai registruoti 350–650 nm intervale (1.21 pav.). Pamatuoti 28 pacienčių gimdos kaklelio spektrai, iš 66 kolposkopiškai apžiūrint atrodančių sveikų ir 49 histologiškai nesveikų vietų (5 uždegimo, 21 papilomos viruso (HPV) infekcija ir 23 įvairių stadijų gimdos kaklelio intraepitelinė neoplazija (CIN)). Šio tyrimo metu buvo daroma prielaida, kad kolposkopiškai apžiūrint sveikai atrodantys audiniai yra histologiškai sveiki.



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

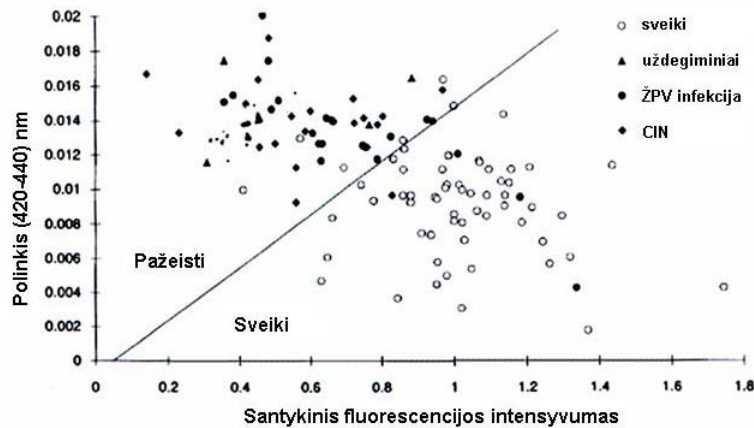
Fluorescencijos matavimų rezultatai parodė, kad pakitusios histologijos audinių fluorescencijos intensyvumas yra mažesnis kaip sveikų audinių. Sveikų audinių spektrų forma kinta priklausomai nuo matavimo vietos tiek tos pačios pacientės, tiek skirtingų pacienčių audinius. Sveiko audinio didžiausias fluorescencijos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

Nustatant, ar sveikų ir nesveikų audinių fluorescencijos intensyvumų maksimumų skirtumai yra statistiškai reikšmingi, naudotasi t-testais (angl. *one-sided paired t-test*). Hipotezės, kad sveikų audinių fluorescencijos intensyvumas didesnis negu nesveikų, patvirtina rezultatas $p < 0,005$, o kad tos pačios pacientės papildomos viruso infekcijos pažeisti audiniai fluorescuoja intensyviau negu intraepitelinės neoplazijos pažeisti – rezultatas $p < 0,05$. Taip pat ir tikrinant spektrų polinkio kampų skirtumus (ligos pažeistų audinių spektrų polinkio kampai didesni negu sveikų) gauta patikimumo vertė $p < 0,005$.

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

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

Pagal šį algoritmą apdoroti visų matavimų duomenys pateikiami (1.22 pav.) (Ramanujam ir kt., 1994 b). Ordinačių ašis atitinka į vienetinį intensyvumą normuotų spektrų polinkio kampą, absčių ašis – santykinį kiekvieno bandinio maksimalų fluorescencijos intensyvumą (kiekvieno matavimo maksimalus fluorescencijos intensyvumas buvo padalijamas iš tos pačios pacientės visų kolposkopiškai apžiūrint sveikai atrodančių audinių spektrų maksimalios vertės vidurkio). Šio algoritmo jautrumas ir specifiškumas yra 92 % ir 90 %.



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

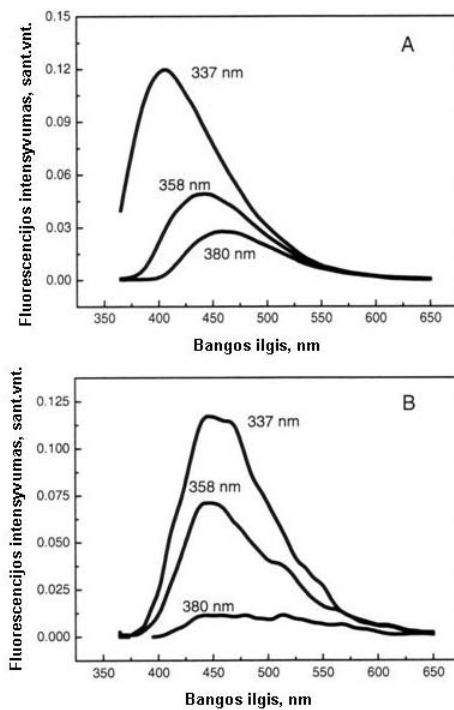
Tinkamų algoritmų sukūrimas padeda identifikuoti diagnostikai tinkamiausius spektrinius ruožus, t. y. tuos, kuriuose matomi didžiausi sveikų ir nesveikų audinių spektriniai skirtumai. Kartais jie gali suteikti naudingos informacijos ir apie tai, dėl ko atsiranda tokie skirtumai. Tačiau labai dažnai nedidelius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

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

Tas pats modelis taikytas analizuojant *in vivo* pamatuotus gimdos kaklelio audinių fluorescencijos spektrus žadinant 337 nm bangos ilgio šviesa (Ramanujam ir kt., 1994 a). Audinių savitoji fluorescencija priskirta kolagenui, elastinui, NAD(P)H ir FAD, o fluorescencijos slopinimas – oksihemoglobino sugerčiai ir sklaidai. Sklaidos poveikis laikytas nekintančiu. Sunormavus kiekvienos pacientės kiekvienos matuotos vietos kolageno

fluorescencijos įnašą į tos pačios pacientės sveikų vietų fluorescencijos spektruose esančio kolageno įnašo vidurkį, pastebėta bendra tendencija, kad ikinavikinių pažeidimų paliestuose audiniuose kolageno fluorescencija yra mažesnė negu sveikų audinių. Šitaip buvo nustatytas NAD(P)H fluorescencijos padidėjimas ikinavikiniuose audiniuose, palyginti su sveikais. Taigi tokia duomenų analizė suteikia informacijos, paaiškinančios dėl ko atsiranda spektrų pokyčių. Tačiau dėl gana sudėtingų normavimo sąlygų metodas nėra patogus taikyti klinikinėje diagnostikoje.

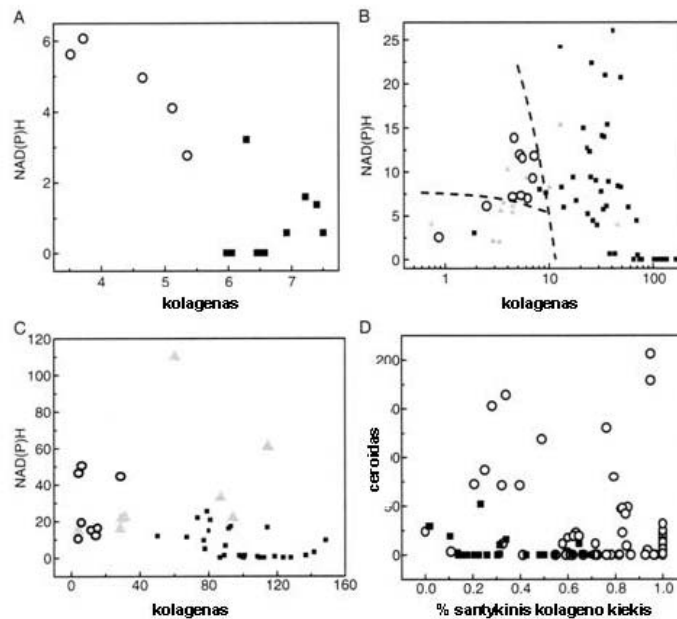
Kitaip nei realiai pamatuoti fluorescencijos spektrai, kuriuose egzistuoja netiesinėms priklausomybėms paklūstantis audinių fluorescencijos, sklaidos ir sugerties įnašai, tikrąją savitosios fluorescencijos spektrą sudaro tiesinėms priklausomybėms paklūstantys tam tikro bangos ilgio šviesa sužadintų atskirų fluoroforų spektrų derinys. Tad, žinant atskiro komponento spektrines savybes, paprasta tiesinė spektrų analizė leidžia gauti kiekybinę informaciją apie audinio biocheminę sudėtį. Tačiau, nors ir žinant, kokios yra fluoroforų tirpalų spektrinės savybės, negalima jų tiesiogiai lyginti su *in vivo* pamatuotomis spektrinėmis savybėmis, nes fluoroforo aplinka gyvame objekte jas keičia. Siekiant gauti dviejų svarbiausiųjų endogeninių fluoroforų, kolageno ir NAD(P)H fluorescencijos spektrus *in vivo* aplinkoje, buvo pasinaudota fluorescencijos ir atspindžio spektrų duomenimis, gautais matuojant juos *in vivo* žmogaus stemplės audiniuose sustabdžius kraujo tekėjimą (Georgakoudi ir kt., 2002 a). Pokyčiai, kuriuos audiniuose sukelia pakitusi oksidacinė-redukcinė būklė, buvo matomi ir atspindžio, ir fluorescencijos spektruose. Tokie pokyčiai buvo tikėtini, nes mažėjant audiniuose deguonies kiekiui, NAD(P)H kiekis didėja. Apdorojant matuotų spektrų duomenis pagal multivariacinį kreivių išskyrimo algoritmą, gauti du spektriniai komponentai, kurių buvimas gali būti paaiškintas sumažėjusio deguonies kiekio poveikiu. Tų komponentų spektriniai parametrai sutampa su kolageno ir NAD(P)H. Taigi multivariaciniu kreivių išskyrimo būdu gauti fluorescencijos spektrai reprezentuoja kolageną ir NAD(P)H *in vivo* (1.23 pav.) (Georgakoudi ir kt., 2002 a).



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

Fluorescencinių matavimų duomenys buvo įrašyti į sveikų ir ligos pažeistų audinių savitosios fluorescencijos žadinimo-fluorescencijos matricas. Rezultatai suteikė kiekybinės informacijos apie audinių biocheminę sudėtį ir jos pokyčius vystantis ligai. Duomenys apie Bareto stemplės, gimdos kaklelio, burnos ir koronarinių arterijų audinius pateikti 1.24 pav. (Georgakoudi ir kt., 2002 a).

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

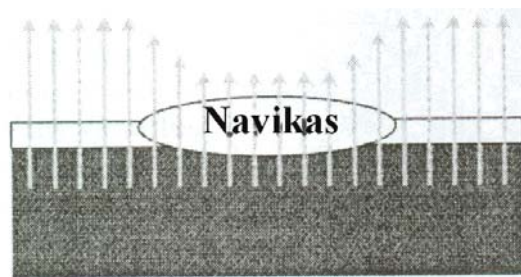


1.24 pav. NAD(P)H ir kolageno fluorescencijos įnašas į audinių savitosios fluorescencijos žadinimo–emisijos matricas (žadinimo bangos ilgiai nuo 337 iki 425 nm; emisijos – nuo 375 iki 700 nm). (A) Displazijos nepalieti audiniai (stačiakampiai) ir displaziniai Bareto stemplės audiniai. (B) Gimdos kaklelio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

Išanalizavus Bareto stemplę sergančių septynių ligonių stemplės audinių fluorescencijos spektrus, nustatyta, kad vėlyvų stadijų displazijos pažeistuose audiniuose yra mažiau kolageno ir daugiau NAD(P)H negu displazijos nepalietuose audiniuose. Didesnis NAD(P)H keikis navikiniuose audiniuose siejamas su intensyvia ląstelių proliferacija ir intensyvesne medžiagų apykaita (Mayevsky ir Chance, 1982). Kolageno kiekio sumažėjimas gali būti paaiškinamas tuo, kad kolageninės struktūros silpnėja jungiamajame audinyje galbūt dėl suaktyvėjusios kolageną skaldančio fermento kolagenazės veiklos. Iš dalies kolageno fluorescencijos silpnėjimas galimas ir dėl navikui vystantis atsiradusio epitelio sluoksnio sustorėjimo. Dėl navikams būdingo gleivinės sluoksnio sustorėjimo silpnėja naviko stromos žadinimas šviesa ir labiau ekranuojama jungiamojo audinio fluorescencija (1.25 pav.).

Epitelis

Pogleivis



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

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

In vivo pamatuotų 35 pacienčių gimdos kaklelio kolposkopinės apžiūros metu sveikai ir įtartinai atrodžiusių kaklelio audinio vietų fluorescencijos spektrų apdoroti rezultatai pateikiami 1.24 pav. B. Iš įtartinai atrodžiusių vietų paimti biopsiniai mėginiai klasifikuoti kaip plokščialąstelinės metaplazijos (t. y. gerybiniai navikai) ir plokščialąstelinės intraepitelinės (t. y. ikivėžinės) pažaidos. Panašiai kaip ir dėl Bareto stemplės pažeistose vietose aptiktas sumažėjęs kolageno kiekis taip pat gali būti priskiriamas suaktyvėjusiai kolagenazės veiklai. Plokščialąstelinėse intraepitelinėse pažaidose NAD(P)H fluorescencija buvo intensyvesnė negu plokščialąstelinės metaplazijos vietose. Šis didėjimas gali būti dėl sustorėjusio epitelio sluoksnio arba aktyvesnės medžiagų apykaitos. Kaip rodo diagnostinio diferencijavimo linijos (1.33 pav. B), nubrėžtos atlikus regresinę analizę, kolposkopinės apžiūros metu įtartinai atrodančios ir histopatologiškai identifikuotos kaip gerybinės plokščialąstelinės metaplazijos vietos gali būti patikimai atskirtos nuo plokščialąstelių intraepitelinių pažaidų. Taigi kiekybiniai biocheminės sudėties duomenys gali gerai padėti sprendžiant, kurias kolposkopiškai apžiūrint įtartinai atrodžiusias vietas būtina tikrinti.

Dar viena tirta audinių rūšis – burnos ertmės plokščialąstelinis epitelis (Georgakoudi ir kt., 2003). Buvo nustatyta, kad tiriant burnos audinius svarbu žinoti keratino turinčio ir neturinčio epitelio savybes. Kolageno ir NAD(P)H buvimas sveiko, displazijos pažeisto ir navikinio keratino neturinčio epitelio vietose parodytas 1.33 pav. C. Kaip ir sergant Bareto

stemplės liga, displazijos pažeistuose ir navikiniuose audiniuose yra mažesnė kolageno ir didesnė NAD(P)H fluorescencija.

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

Analizuojant 110 vainikinių arterijų segmentų *ex vivo* pamatuotus spektrus, nustatyta, kad ne tik hemoglobinas, bet ir β -karotinas sugeria šviesą ir dėl to iškraipo matuojamus fluorescencijos ir atspindžio spektrus. Atitinkamai apdorojus spektrų duomenis, nustatyta, kad aterosklerozės pažeistų kraujagyslių segmentuose ceroido ir kolageno fluorescencija buvo gerokai intensyvesnė negu sveikų (1.24 pav. D) (Georgakoudi ir kt., 2003). Šitie rezultatai gerai sutapo su histopatologinių tyrimų duomenimis.

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

Literatūra

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2. FLUORESCENCIJOS REGISTRAVIMO TECHNIKOS

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

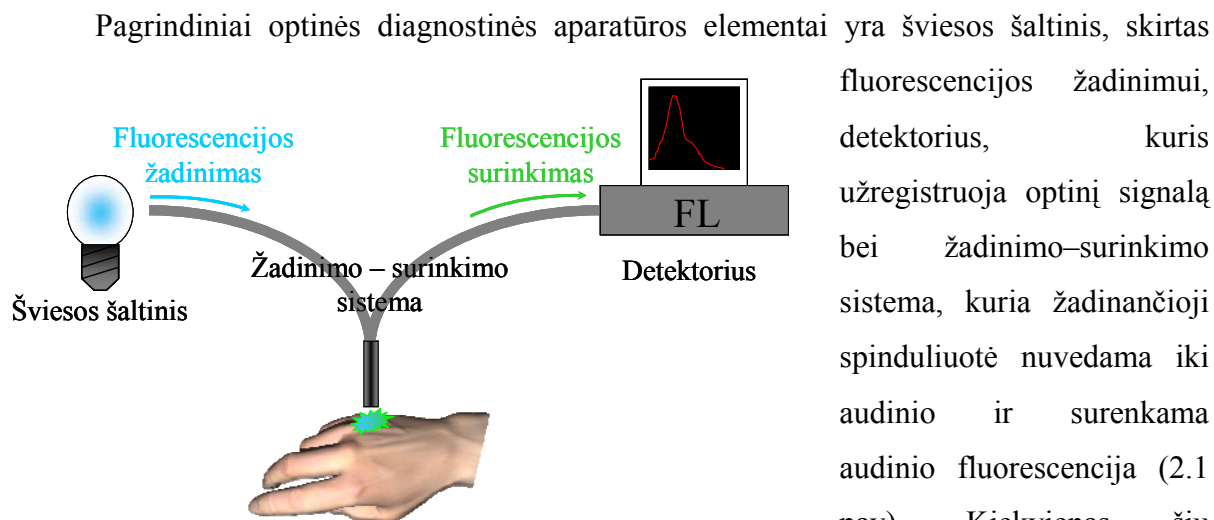
Diagnostikai taikomi fluorescenciniai metodai gali būti padalyti į dvi dalis – tai nuostoviosios fluorescencinės spektroskopijos metodai ir fluorescencijos su laikine skiriamąja geba metodai. Pastarieji yra daug sudėtingesni, tačiau jais gaunama informacija yra gerokai tikslesnė. Be to, tokie tyrimai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

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

2.1. Optinės biopsijos schema

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

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



fluorescencijos žadinimui, detektorius, kuris užregistruoja optinį signalą bei žadinimo–surinkimo sistema, kuria žadinančioji spinduliuotė nuvedama iki audinio ir surenkama audinio fluorescencija (2.1 pav). Kiekvienas šių elementų labai svarbus ir priklausomai nuo

2.1 pav. Optinės biopsijos schema

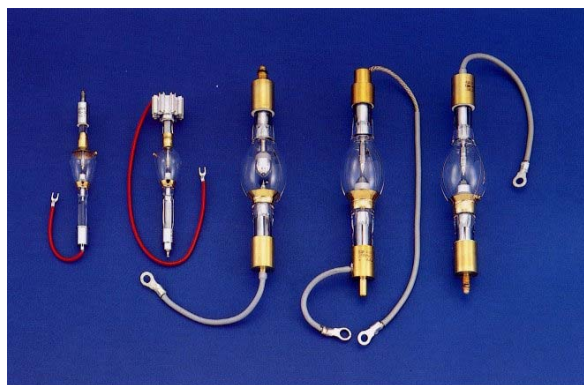
atliekamos užduoties gali arba turi būti keičiamas. Šiuos komponentus gerai išmanant bei suprantant teisingai įvertinamos esamos konfigūracijos diagnostinės aparatūros galimybės bei taikymo ribos. Taigi panagrinėsime kiekvieną komponentą.

2.2. Šviesos šaltiniai

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

2.2.1 Lempas

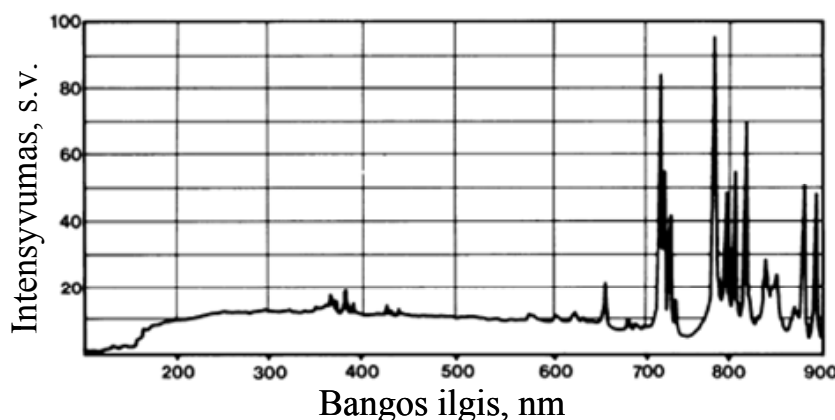
Pirmiausia šiam tikslui buvo pradėtos taikyti įvairių tipų lempos (2.2 pav.), tačiau



2.2 pav. Įvairių tipų aukšto slėgio lempos

dabar tokio tipo šviesos šaltinius dažniausiai galima aptikti tik labai sudėtinguose, plataus panaudojimo spektrometruose. Jų privalumas – platus emituojamos šviesos diapazonas. Kadangi tiriant biologinį objektą labai svarbu tiksliai parinkti žadinančiosios spinduliuotės bangos ilgį, kuris įvairių tyrimų metu gali būti vis kitoks, toks pasirinkimas atrodo tinkamiausias. Tačiau kartais fluorescencijos žadinimui, ypač siekiant sužadinti gilesnius sluoksnius, reikia didelių intensyvumų ir tai įgyvendinti naudojant lempas yra sudėtinga, o kartais ir neįmanoma. Be to, lempų naudojimas daro sudėtingesnę žadinimo–surinkimo sistemą, čia be spinduliuotės nuvedimo iki audinio bei fluorescencijos surinkimo sistemos papildomai turi būti naudojamas spinduliuotės spektrinės sudėties modifikavimo įrenginys. Tai yra dar vienas komponentas, kuris daro diagnostikos sistemą sudėtingesnę.

Paminėsime keletą šiuo metu populiariausių lempų. Dažniausiai šiuo metu yra naudojamos aukšto slėgio **ksenono (Xe) lempos**. Jų privalumas – platus, gana tolygus emituojamos šviesos diapazonas – nuo 250 nm iki 750 nm (2.3 pav.). Dėl kvarcinio apvalkalo šios lempos nespinduliuoja trumpesnių nei 250 nm bangų spinduliuotės, tačiau spektre esanti



2.3 pav. Ksenono lempos spektras

UV srities spinduliuotė gali negrįžtamai pažeisti akis, todėl reikia vengti žiūrėti į veikiančią ksenono lempą. Daugelis ksenono lempų yra laikomos beozonėmis, tai yra veikdamos jos nesukuria aplinkoje ozono.

Ksenono lempų veikimo trukmė yra maždaug 2000 valandų. Šios lempos yra gaminamos su specialiais korpusais (2.4 pav.), nes pačios lemputės yra užpildytos aukšto slėgio (~ 10 atm) dujomis ir dėl to atsiranda sprogimo rizika. Šių lempų maitinimo šaltiniai taip pat gali kelti pavojų. Veikimo metu jie kuria 25 A srovę esant 20 V įtampai (450 W galingumo lempai), o lempos įjungimo momentu yra generuojami 20–40 kV impulsai. Tokia įtampa lengvai

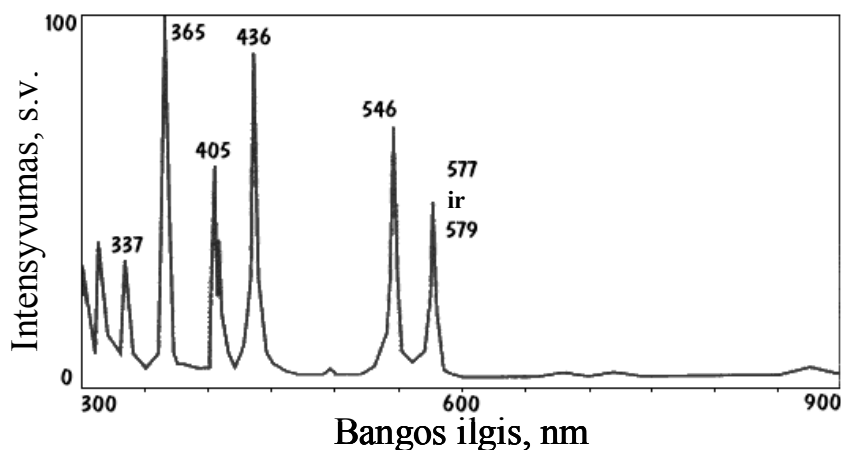


2.4 pav. Hamamatsu Xe lempa ir maitinimo blokas

prasiskverbia per odą, o vėliau tekanti stipri srovė gali būti mirtina. Reikia nepamiršti, kad ksenono lempa, kaip ir daugelis kitų, spinduliuoja labai daug infraraudonųjų spindulių, kitaip tariant, smarkiai kaista. Taigi naudojant šias lempas reikia imtis atitinkamų saugumo priemonių, o taikant jų spinduliuotę tiesiogiai, be spektrinės sudėties modifikavimo įrenginių, siekiant išvengti tiriamosios vietos nudegimų,

reikia naudoti šilumą absorbuojančius filtrus.

Aukšto slėgio gyvsidabrio (Hg) lempos. Savo paskirtimi ir veikimu gyvsidabrio lempos yra panašios į ksenono lempas. Hg lempų spinduliuotė yra intensyvesnė nei ksenono, tačiau ji sukoncentruota į gana siauras, gyvsidabriui būdingas linijas (2.5 pav.). Taigi, jei fluorescencijos žadinimui yra tinkamos gyvsidabrio emituojamos linijos, dėl didesnio spinduliuotės intensyvumo geriau yra naudoti šį šviesos šaltinį. Egzistuoja ir žemo slėgio gyvsidabrio lempos. Jos sverbios tuo, kad jų emituojamos linijos yra ypač siauros, todėl jos daugiausiai naudojamos kalibravimo tikslais.



2.5 pav. Gyvsidabrio lempos spektras

Taip pat yra galimas abiejų anksčiau minėtų lempų derinys. Tai yra vadinamosios gyvsidabrio–ksenono (Hg–Xe) lempos. Jų privalumas yra tas, kad dėl esančio jose Hg yra gaunamas didesnis intensyvumas UV srityje

nei veikiant Xe lempoms, o Xe sukuria didesnę intensyvumą tarp Hg linijų.

Kvarco-volframo halogeninės (QTH) lempos. Šių lempų privalumas – intensyvus ir tolygus spinduliavimo spektras regimojoje ir infraraudonojoje srityje. Anksčiau jos buvo mažai naudojamos, nes netiko UV spinduliuotę sugeriančioms molekulėms sužadinti, tačiau padidėjus susidomėjimui raudonoje bei infraraudonojoje srityse sugeriančiais fluoroforais šios lempos yra labai tinkamos.

Visi šie išvardyti šviesos šaltiniai daugiausia yra naudojami nuostoviosios optinės biopsijos tikslams, nes lempomis labai sunku išgauti trumpus impulsus ar moduluoti jų

intensyvumą, reikalingą laikinės skyros matavimams. Egzistuoja impulsinės lempos, zgeneruojančios nanosekundžių trukmės impulsus, tačiau jų spinduliuotės intensyvumas yra per silpnas nuostoviesiems matavimams atlikti. Taip pat yra galimas ir intensyvumo moduliavimas, tačiau tai yra atliekama naudojant išorinį moduliatorių, kuris žadinimo sistemą padaro dar sudėtingesnę. Taigi laikinės skyros matavimams šiuo metu patogiau bei ekonomiškiau yra naudoti kitų tipų impulsinius šviesos šaltinius.

2.2.2 Lazeriniai šviesos šaltiniai

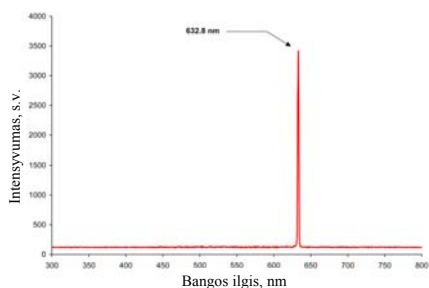
Pastaruoju metu, labai išpopuliarėjus lazeriams, jie vis dažniau yra taikomi ir



2.6 pav. Įvairių bangos ilgių lazeriniai diodai

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

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



2.7 pav. He-Ne lazerio emisijos spektras

prastesnė ultravioletinių lazerių panaudojimo situacija.

Dar viena savybė, lazerinius šviesos šaltinius išskirianti iš visų kitų šviesos šaltinių, yra itin maža spindulio skėstis. Tai yra labai svarbi ir patogi savybė, kai šviesos šaltinio spinduliuotė reikia suvesti į šviesolaidį. Optinės biopsijos taikymui, registruojant biologinių audinių fluorescencijos spektrus, labai dažnai yra naudojamos šviesolaidinės sistemos, ir spinduliuotės įvedimas į

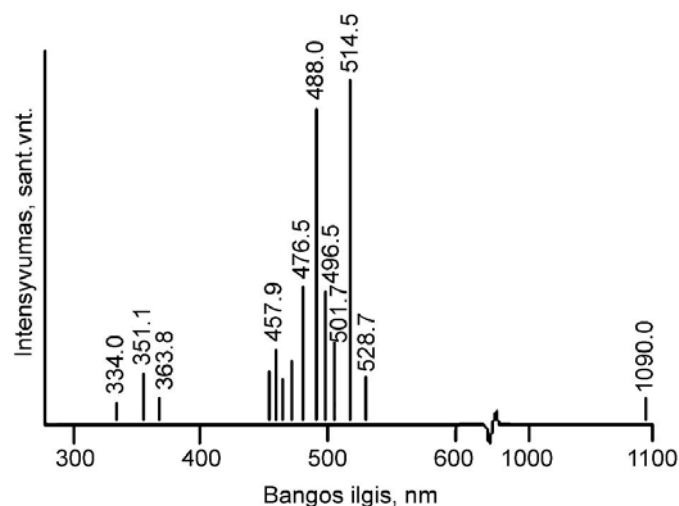
šviesolaidį yra labai svarbus etapas siekiant neprarasti žadinančiosios spinduliuotės galios bei supaprastinti ar minimizuoti pačią optinės biopsijos sistemą. Be to, puslaidininkiniai lazeriai

puikiai veikia impulsiniu režimu ir gali būti naudojami optinei biopsijai su laikine skiriamąja geba.

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

2.2.2.1. Argono lazeris

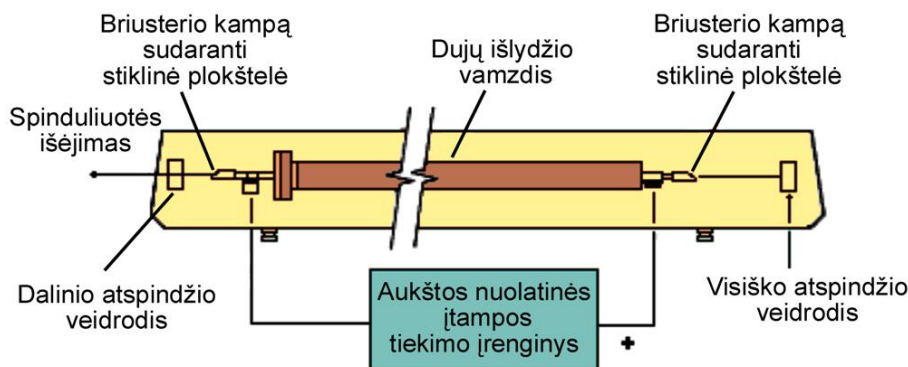
Iš regimosios spektro srities lazerių diagnostikai dažniausiai naudojamas argono jonų lazeris, spinduliuojantis įvairių bangos ilgių spinduliuotę (2.8 pav.). Intensyviausias šio lazerio spinduliavimas yra ties 488 nm ir 515 nm. Argono lazeriu galima generuoti 25 skirtingų bangos ilgių šviesos pluoštą regimojoje srityje nuo 408,9 nm iki 686 nm ir 10 UV srityje nuo 275 nm iki 363,8 nm. Lazerio aktyvioji terpė kaupinama nuolatinės srovės lanko išlydžiu. Aušinimui naudojamas vanduo arba oras – nelygu, koks lazerio galingumas. Šio lazerio galia regimojoje spektro srityje pasiekama iki 100 W. Dujų slėgis vamzdyje paprastai būna apie 0,1 torų. Kad argono lazeris spinduliuotų tik pasirinkto bangos ilgio šviesą, jo optinio rezonatoriaus veidrodžiai turi būti atrankūs, t. y. atspindėti tik pasirinkto ilgio bangas; kitų bangos ilgių pluošteliai išeina iš rezonatoriaus ir nėra stiprinami. Keičiant rezonatoriaus veidrodžius arba įvedant į rezonatorių optinius elementus, galima derinti bangos ilgį.



2.8 pav. Argono lazerio spinduliuotės spektras

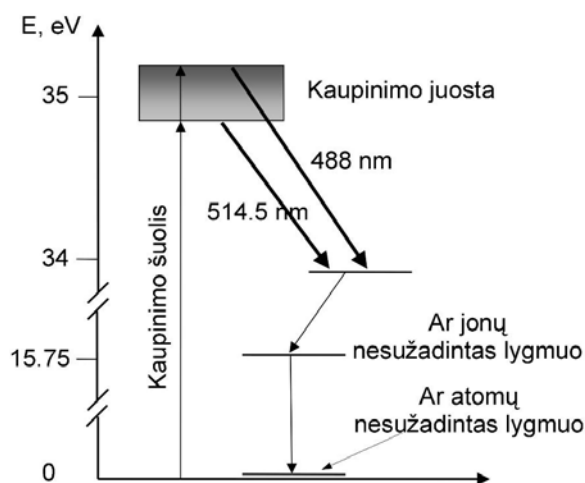
Pagrindinės argono jonų lazerio dalys pavaizduotos 2.9 paveiksle. Optinį rezonatorių sudaro du vienas į kitą nukreipti atspindintys paviršiai – veidrodžiai. Vienas veidrodis yra

visiškai atspindintis, kitas – pusiau skaidrus, naudojamas spinduliuotės išvedimui. Argono dujų jonų pripildytas stiklinis vamzdis įtaisytas tarp šių veidrodžių. Stiklinio vamzdžio galai yra uždaryti stiklinėmis plokštelėmis, kurios sudaro Briusterio kampą lazerio spinduliuotės sklaidimo atžvilgiu. Šios plokštelės padeda minimizuoti atspindžio nuostolius kuriant poliarizuotos šviesos pluoštą. Aukštos įtampos (apie 8 kV) nuolatinė srovė jonizuoja argono dujas.



2.9 pav. Argono lazerio principinė schema

Argono atomo jonizacijai yra sunaudojama apie 35 eV energijos (2.10 pav.). Šis didelis energijos kiekis nėra visas sunaudojamas lazerinei spinduliuotei sukurti. Didelė dalis energijos išspinduliuojama į aplinką šilumos pavidalu. Dėl šios priežasties argono lazerių našumas yra labai mažas ir siekia tik 0,1 %.



2.10 pav. Aktyviosios lazerio terpės energiniai lygmenys

Argono jonų lazeris žadinamas keliais būdais. Tai priklauso nuo darbo režimo. Impulsiniu režimu dirbantis lazeris žadinamas vienpakopiu būdu. Elektronai, pagreitinti elektriniame lauke, kurį sukuria prie vamzdžio elektrodų prijungta įtampa, susiduria su nesužadintos būsenos argono atomais ir sužadina juos į aukštesnį energinį lygmenį, kurio energija apie 35 eV. Iš šio lygmens vyksta elektrono šuolis į žemiau esantį lygmenį. Šuolio metu ir išspinduliuojami fotonai, kurių bangų ilgiai 514,5 nm ir 488 nm.

Tipiniai argono jonų lazerio parametrai pateikiami 2.1 lentelėje.

2.1 lentelė. Tipiniai argono jonų lazerio parametrai

Pagrindiniai bangos ilgiai	488 nm; 514,5 nm
Viršutinio energinio lygmens gyvavimo trukmė	$1,0 \times 10^{-8}$ s
Dujų suslėgimas	0,1 torų ir mažiau
Darbo temperatūra	kambario
Sužadinimo metodas	elektros išlydis
Dujų temperatūra	1200 °C
Aktyviosios terpės lūžio rodiklis	$\approx 1,0$
Galia	nuo 100 mW iki 50 W
Darbo režimas	impulsinis, CW

2.2.3 Šviesą emituojantys diodai (LED)

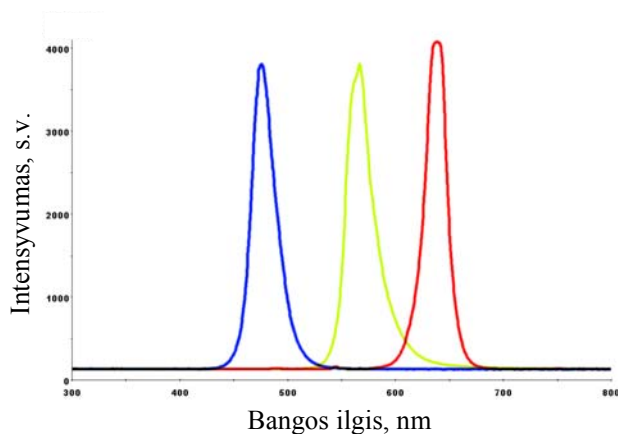
Kaip alternatyva lempoms bei lazeriams, yra naudojami šviesą emituojantys diodai (2.11 pav.). Didžiausias jų privalumas yra palyginti nedidelė kaina, o didžiausias trūkumas,



2.11 pav. Įvairių tipų, formų bei galingumo šviesos diodai

kurį šiuo metu labai intensyviai mėginama pašalinti, – nepakankamas tam tikrų bangos ilgių srities, konkrečiai ultravioletinės, galingumas. Iš esmės šviesos diodai yra tarpinis ir šiuo metu turbūt patogiausias fluorescencijos žadinimo šaltinis iš visų trijų minėtų šviesos šaltinių tipų. Jų emituojamos šviesos spektras (2.12 pav.)

yra platesnis nei lazerių, tačiau daug siauresnis nei lempų, todėl dažnai užtenka tik primityvių spektrinės sudėties modifikavimo įrenginių. Jie taip pat nespinduliuoja pašalinių infraraudonųjų spindulių, todėl nelieka papildomos šilumos ir nudeginimo problemų. Dažnai šviesos diodų spinduliuotė jau yra iš dalies fokusuota, todėl jos suvedimas į šviesolaidį taip pat yra gerokai paprastesnis ir patiriama mažesnių nuostolių. Kitos savybės, kurios daro juos patrauklius naudoti, yra mažas jų dydis bei, skirtingai nei lazerinių diodų, paprastas valdymo blokas. Šiuo metu parduodamų šviesos diodų spektrinių diapazonų gama siekia nuo mažiau nei 300 nm iki kelių mikronų, o galia – nuo kelių milivatų iki vatų. Paprastai optinei biopsijai pakanka 10–20 mW galingumo šviesos šaltinio, tačiau tam tikrais atvejais gali prireikti ir daugiau nei 50 mW.

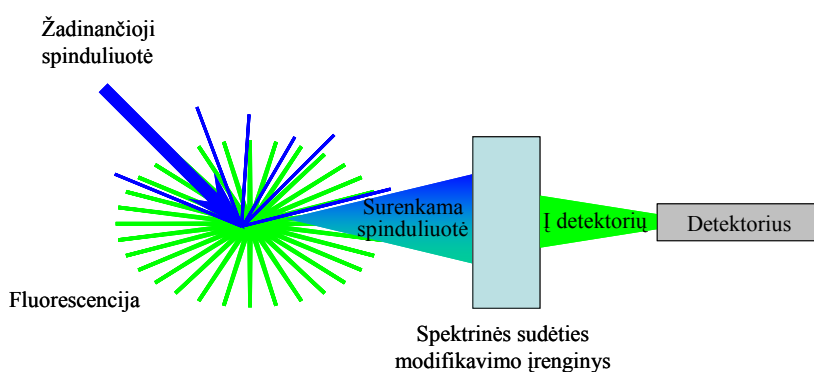


2.12 pav. Šviesos diodų emisijos spektrai bei trūkumus.

Tačiau konkretaus šviesos šaltinio fluorescencijai žadinti pasirinkimas priklauso nuo keliamos užduoties ir kitų optinės biopsijos aparatūros dalių. Kitas labai svarbus optinės biopsijos aparatūros komponentas yra fluorescencijos žadinimo–surinkimo sistema.

2.3. Fluorescencijos žadinimo–surinkimo sistema

Fluorescencijos žadinimo–surinkimo sistemos paskirtis yra nuvesti šviesos šaltinio spinduliuotę iki audinio, surinkti audinio fluorescenciją ir perduoti į detektorius. Šiuo metu yra naudojamos dviejų tipų žadinimo–surinkimo sistemos: spindulinė ir šviesolaidinė. Tam tikrais atvejais, siekiant geresnio rezultato, šios abi sistemos gali būti sujungiamos. Į fluorescencijos žadinimo–surinkimo sistemą taip pat įeina ir spektrinės sudėties modifikavimo sistema. Priklausomai nuo pasirinkto šviesos šaltinio bei keliamų uždavinių, žadinančiosios spinduliuotės kelyje ši sistema gali būti ir nereikalinga, tačiau iš audinio surinktos spinduliuotės kelyje tokia sistema yra būtina.



2.13 pav. Fluorescencijos atskyrimo nuo žadinančiosios spinduliuotės schema

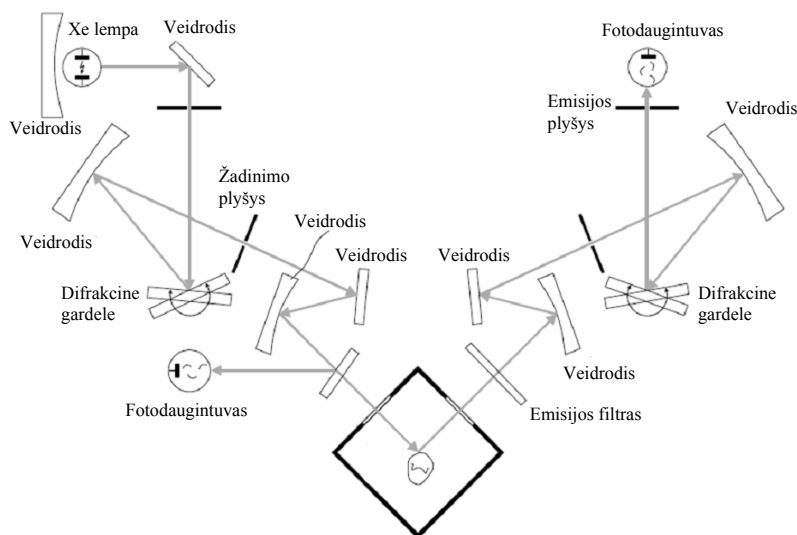
Prieš patekdama į audinį žadinančioji spinduliuotė yra stipriai išsklaidoma, todėl didelė jos dalis kartu su audinio fluorescencija patenka į detektorius. Į detektorius patekęs išsklaidytos žadinančiosios

spinduliuotės intensyvumas yra daug didesnis nei naudingą informaciją nešančio fluorescencijos signalo, todėl detektoriui sunku žadinančiosios spinduliuotės fone užregistruoti palyginti silpną fluorescencijos signalą. Taigi fluorescencijos surinkimo kanale

reikia spektrinės sudėties modifikavimo sistemos, galinčios atskirti žadinančiąją spinduliuotę ir neleisti jos į detektorius. Tokios sistemos veikimas pagrįstas tuo, kad tik dalis žadinančiosios spinduliuotės fotonų energijos yra paverčiama fluorescencija, kita dalis yra prarandama šilumos pavidalu molekulių viduje vykstančiuose procesuose, todėl fluorescencija visada yra matoma ilgesnių bangų pusėje. Taigi, jei žadinimui naudojame mėlyną šviesą, fluorescencija bus žalios spalvos ir taikant spektrinės sudėties modifikavimo sistemą bus galima jas nesunkiai atskirti (2.13 pav.). Šiuo metu yra naudojamos dviejų tipų spektrinės sudėties modifikavimo sistemos – gardelinės ir filtrinės. Pirmosios dažniausiai yra naudojamos spindulinėse sistemose, o antrosios – šviesolaidinėse sistemose.

2.3.1 Spindulinė žadinimo–surinkimo sistema

Tai tokia sistema, kurioje spinduliuotė iki audinio ateina panaudojant veidrodžius ir lęšius (2.14 pav.). Pateiktame pavyzdyje optinio atsako žadinimui yra naudojama Xe lempa



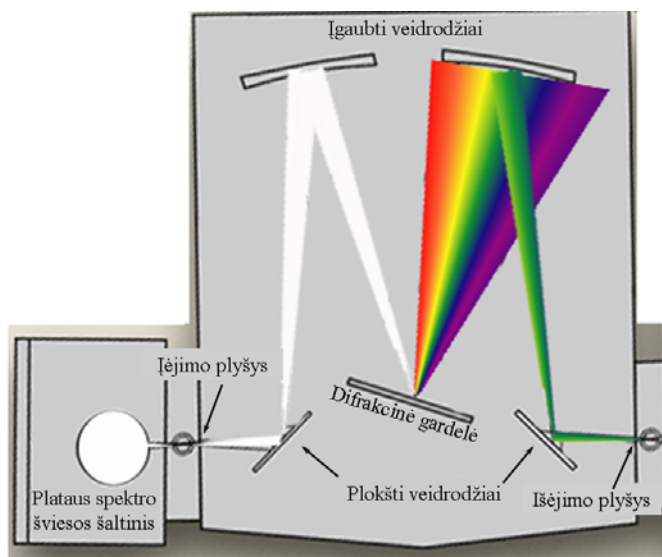
2.14 pav. Danties tyrimui naudojama spindulinė sistema

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

2.3.1.1 Monochromatorius

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

Monochromatoriaus paskirtis yra iš plataus spinduliuotės spektro išrinkti reikiamos



2.15 pav. Plokščiagardelinis monochromatorius

bangos ilgio (spalvos) šviesą (2.15 pav.). Tai gali būti atlikta panaudojant difrakcines gardeles arba prizmes. Šiuolaikiniai monochromatoriai dažniausiai yra gaminami su difrakcinėmis gardelėmis, todėl tokio tipo spinduliuotės spektrinės sudėties modifikavimo sistemos vadinamos gardelinėmis. Pagrindiniai monochromatorių parametrai yra skiriamoji geba, pralaidumo efektyvumas ir pašalinės šviesos

kiekis (šviesos kiekis už pasirinktos spektrinės srities (spalvos) ribų). Renkantis monochromatorių optinei biopsijai visų pirma reikia atsižvelgti į tai, kad signalai dažnai yra labai silpni, todėl monochromatorius turi turėti kuo didesnę pralaidumo efektyvumą. Kitas



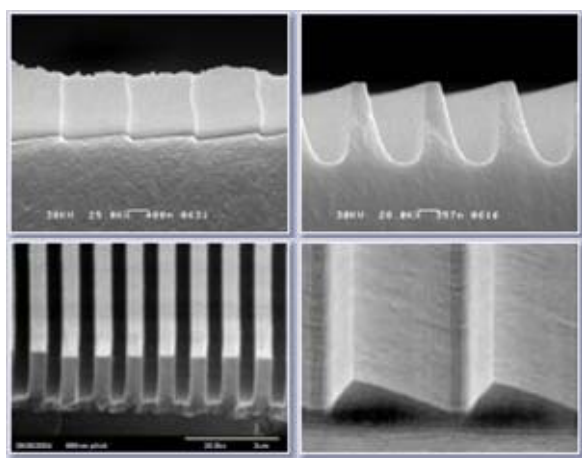
2.16 pav. Difrakcinė gardelė

parametras, kuris taip pat yra svarbus, tai mažas pašalinės šviesos kiekis; taip bus išvengiama, kad išsklaidyta šviesa nepatektų į detektorius. Paskutinis parametras, skiriamoji geba, šiuo atveju nėra toks svarbus, nes biologiniuose audiniuose esančių pigmentų fluorescencijos spektrai nėra labai siauri. Monochromatorių skiriamąją gebą nulemia difrakcinė gardelė (2.16 pav.), o konkrečiau – difrakcinėje gardelėje esančių rėžių skaičius milimetre. Šiuo metu gaminamos gardelės, kurios turi nuo kelių šimtų iki 6000 rėžių milimetre. Monochromatoriaus skiriamoji geba taip

pat gali būti keičiama didinant arba mažinant spinduliuotės įėjimo bei išėjimo iš monochromatoriaus plyšio pločius. Didesni plyšiai smarkiai padidina registruojamo signalo intensyvumą, tačiau pablogina skiriamąją gebą, ir atvirkščiai – mažesni plyšiai pagerina skiriamąją gebą, tačiau smarkiai krinta registruojamas intensyvumas.

Pagrindinis monochromatoriaus elementas, difrakcinė gardelė, gali būti plokščia arba įgaubta. Plokščios gardelės dažniausiai yra gaminamos mechanškai raižant lygų būsimos gardelės paviršių ir dėl to gali atsirasti tam tikrų netikslumų įvairiose jos vietose, tuo tarpu

įgaubtos gardelės dažniausiai yra gaminamos holografijos metodu. Gamybos metu atsiradę netikslumai kaip tik labiausiai ir nulemia monochromatoriaus pašalinės šviesos perdavimo savybes bei vaizdų „šmėklų“ atsiradimą. Jie pasireiškia kaip kitos spalvos arba baltos šviesos dėmės monochromatoriaus viduje. Kad šias dėmes būtų galima panaikinti, monochromatoriaus vidinės sienelės yra padengiamos šviesą sugeriančia medžiaga. Monochromatoriuose su įgaubtomis gardelėmis yra mažiau šviesą atspindinčių elementų, nes įgaubta gardelė atlieka ir šviesos išskaidymo į spalvas funkciją, ir fokusavimo funkciją. Taip pat labai svarbu atkreipti dėmesį į tai, kuriai spektrinei sričiai yra optimizuotas monochromatorius. Tai nulemia difrakcinės gardelės griovelio formą (2.17 pav.). Pavyzdžiui, vienokios formos grioveliai labiausiai tinka ultravioletinei spinduliutei, o kitokios –



2.17 pav. Įvairių formų difrakcinių gardelių grioveliai

regimosios šviesos ar infraraudonosios srities spinduliutei. Monochromatorių tinkamumą tam tikrai sričiai apibūdina pralaidumo efektyvumo kreivė. Ši kreivė parodo, kiek procentų įeinančios šviesos praeina monochromatorių. Monochromatorių su plokščiomis (mechanškai gaminamomis) gardelėmis pralaidumas būna efektyvesnis nei su holografinėmis, tačiau jų efektyvaus pralaidumo sritis yra siauresnė. Monochromatorių efektyvumas taip pat yra nevienodas skirtingos poliarizacijos spinduliutei. Kadangi molekulių fluorescencija yra iš dalies poliarizuota, tai registruojamame spektre matomas intensyvumo pasiskirstymas gali būti paveiktas ir šios monochromatoriaus savybės. Tačiau šie reiškiniai labiausiai pasireiškia atliekant poliarizacinius matavimus. Nepaisant visų išvardytų trūkumų, kurie išryškėja tik dirbant labai sudėtingomis sistemomis, monochromatorius kol kas yra geriausia bei universaliausia, tačiau ir sudėtingiausia, spinduliuotės spektrinės sudėties modifikavimo sistema.

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

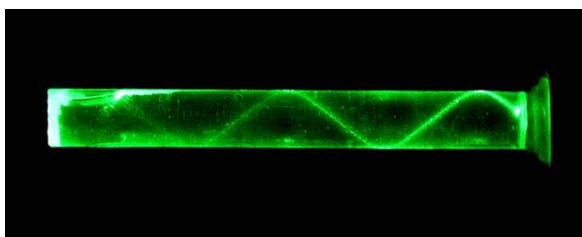
veidas ir t. t.) padėtis. Dėl to dažnai daug paprasčiau ir saugiau yra naudoti šviesolaidines sistemas.

2.3.2. Šviesolaidinė žadinimo–surinkimo sistema

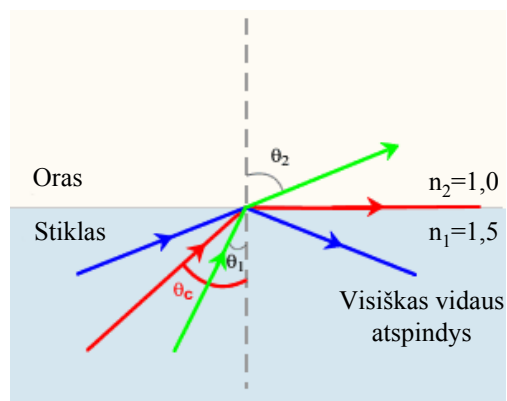
Siekiant supaprastinti optinės biopsijos aparatūrą, pirmiausia reikia supaprastinti fluorescencijos žadinimo–surinkimo sistemą. Tai yra ta aparatūros dalis, kuri turėtų būti paslankiausia, todėl šiam tikslui buvo pradėti naudoti šviesolaidžiai. Norint geriau suprasti šviesolaidinių sistemų savybes bei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

2.3.2.1. Šviesolaidžiai.

Šviesolaidžių analogija galime laikyti paprasčiausius elektros laidus, kuriais teka elektra. Šviesolaidžiai netgi savo forma labai primena laidus, kuriais „teka“ šviesa. Tačiau, skirtingai nei elektros, šviesos perdavimui reikia kur kas sudėtingesnių sąlygų. Taigi, kas nulemia, kad šviesa gali nusklisti šviesolaidžiu didžiulius atstumus ir beveik be nuostolių neišeidama iš jo? Tai nulemia specifinė optinio kabelio struktūra.



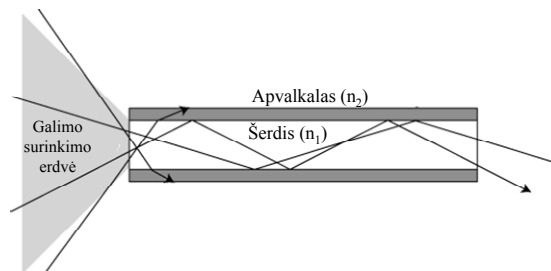
2.18 pav. Visiškas vidaus atspindys vandeniui užpildytame stikliniame vamzdyje



2.19 pav. Visiškas vidaus atspindys

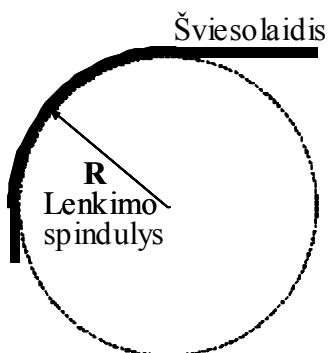
Šviesos sklidimas šviesolaidžiu remiasi visiško šviesos atspindžio dėsniu. Visiškas atspindys (2.18 pav.) atsiranda dviejų skaidrių medžiagų skiriamosioje zonoje, jei šviesos spindulys į ją krinta iš optiškai tankesnės medžiagos ir jei kritimo kampas α didesnis už kritinį kampą. Kritinis kampas – tai šviesos kritimo kampas, kuriam esant vyksta visiškas vidaus atspindys (2.19 pav.). Šis kampas apskaičiuojamas: $\sin \alpha_{kritinis} = n_2 / n_1$. Šiuo atveju spindulys neišeis iš medžiagos ir jo optinė energija bus visiškai atspindėta. Iš principo visiškas vidaus atspindys vyksta be energijos nuostolių, tačiau realiai šviesa prasiskverbia kelių bangos ilgių atstumu į optiškai retesnę medžiagą. Tai rodo, kad šviesolaidžio skersmuo negali būti neribotai mažas, jis priklauso nuo perduodamos šviesos bangos ilgio. Kad būtų visiškas vidaus atspindys, turi būti tenkinama tokia sąlyga: $n_{centr} > n_{dang}$. Dangalo storis turi būti nuo 10 iki 20 kartų didesnis už bangos ilgį. Kritinis visiško vidaus atspindžio kampas riboja

spindulių perdavimą: tik mažesniu nei tinkamu spindulių įvedimo kampu įvesti spinduliai bus perduodami šviesolaidžiu, visi kiti praras energiją ir bus labai susilpninti (2.20 pav.). Praktikoje yra nurodomas ne šis kampas, o šviesolaidžio skaitinė apertūra (NA), kuri yra lygi: $NA = n \sin \theta_{kr} = \sqrt{n_1^2 - n_2^2}$. Taigi, kuo



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

didesnė skaitinė apertūra, tuo didesnis tinkamas spindulių įvedimo kampas ir galimo surinkimo erdvė. Sklisdamas šviesolaidžiu spindulys silpsta ne vien tik dėl absorbcijos ar išsklaidymo, bet ir dėl energijos praradimo sulenkimuose. Šviesolaidžio maksimalaus sulenkimo spindulys R (2.21 pav.) yra vienas iš parametrų, kurį būtina žinoti dirbant su šviesolaidžiais ir siekiant išvengti negrįžtamų šviesolaidžių pažaidų. Įprastinių šviesolaidžių pralaidumas smarkiai krinta sulenkus juos didesniu nei 30 mm spinduliu, tačiau pastaruoju



2.21 pav. Šviesolaidžio lenkimo spindulys

metu jau sukurti šviesolaidžiai, kuriuos galima sulenksti net 7,5 mm spinduliu. Tai yra ilgalaikiai sulenkimo spinduliai, tačiau trumpam šviesolaidį be didesnių pažeidimų galima sulenksti beveik du kartus mažesniu spinduliu. Pasiekus ribinį spindulį, nuostoliai staiga ima smarkiai didėti, be to, kuo storesnis šviesolaidis, tuo greičiau jie pasireiškia (užtenka didesnio spindulio). Šiuo atžvilgiu plonesni šviesolaidžiai yra pranašesni už storesnius. Jei šviesolaidžiai yra vienodo storio, tai leidžiamo sulenkimo spindulį nulemia šviesolaidžio skaitinė apertūra. Kuo

didesnė skaitinė apertūra, tuo šviesolaidis gali būti daugiau sulenkiamas. Didesnė skaitinė apertūra taip pat nulemia ir kitas šviesolaidžio savybes, pvz., didesnę tinkamą spindulių įvedimo kampą.

Renkantis šviesolaidžius optinei biopsijai svarbu atsižvelgti, kokios spektrinės srities spinduliuotė sklis šiais šviesolaidžiais, nes skirtingoms sritims reikalingos ir skirtingos medžiagos, iš kurių gaminamas šviesolaidis. Galima išskirti tris spektrines sritis – ultravioletinę ($\lambda < 400$ nm), regimosios šviesos (400 nm–700 nm) ir infraraudonąją ($\lambda > 700$ nm). Naudojant tai sričiai netinkamų medžiagų šviesolaidį, daromos signalo registravimo klaidos arba net galima sugadinti ir patį šviesolaidį. Pavyzdžiui, tam tikros medžiagos, iš kurių daromi šviesolaidžiai, veikiamos UV spinduliuotės, fluorescuoja. Dar vienas parametras, kuris yra svarbus renkantis šviesolaidžius, yra jų skersmuo. Viena vertus, pasirinkimą riboja kita aparatūros dalis (jei šviesolaidį reikia įvesti į endoskopo ar kito prietaiso ertmę), tačiau, kita vertus, negalima rinktis ir labai plono šviesolaidžio, nes juo bus

surenkama tik nedidelė dalis fluorescencijos ir bus gaunamas tik labai silpnas optinis signalas. Dažniausiai optinei biopsijai yra naudojami 50–600 μm skersmens šviesolaidžiai. Tam tikrais atvejais, kada reikia ypač storų šviesolaidžių, yra naudojamos šviesolaidžių pynės – t. y. 100–200 μm skersmens šviesolaidžiai yra „supakuojami“ į vieną storą pynę.

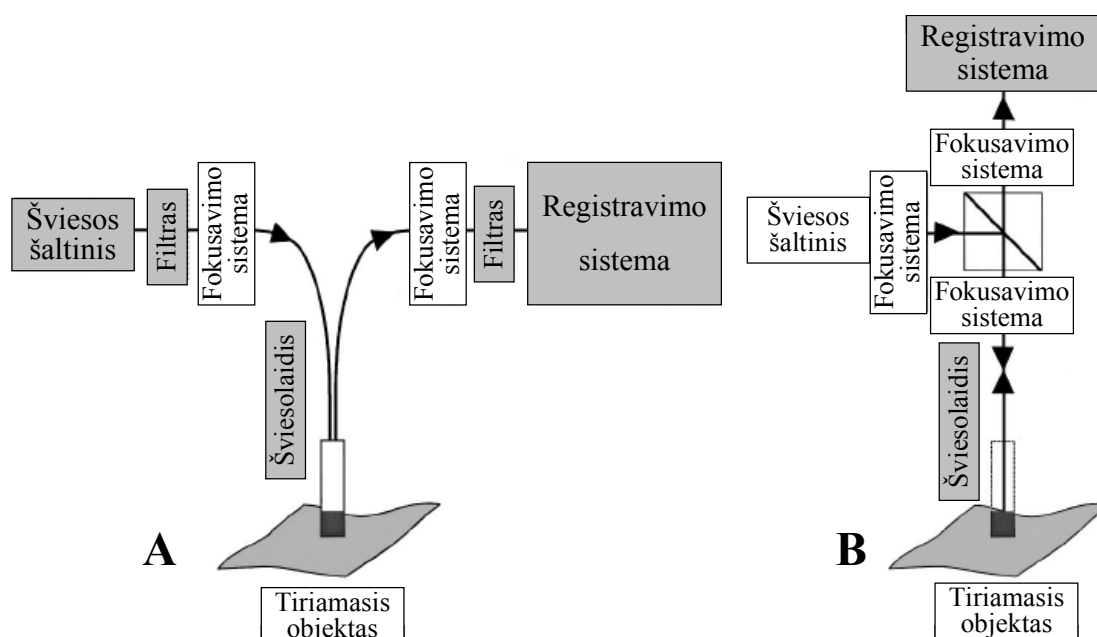
Optinėje biopsijoje spindulių perdavimui bei fluorescencijos surinkimui dažniausiai yra naudojami du atskiri šviesolaidžiai. Dėl patogumo šie du šviesolaidžiai viename gale yra sujungiami į vieną antgalį, kuris ir yra priglaudžiamas prie tiriamosios vietos. Tokie



2.22 pav. Bifurkacinis šviesolaidis

šviesolaidžiai vadinami bifurkaciniais (2.22 pav.). Kartais, kai reikia labai plono šviesolaidžio, ir žadinimui, ir surinkimui yra naudojamas tas pats šviesolaidis. Tada fluorescencijos atskyrimui nuo žadinančiosios spinduliuotės yra naudojami papildomi optiniai elementai – prizmės, dichroiniai veidrodžiai ir kt. Abi sistemos yra pavaizduotos 2.23 paveiksle.

Optinei biopsijai vietoje dviejų naudojant vieną šviesolaidį, priklausomai nuo šviesolaidžio skersmens, galima gauti 1,8–4 kartus efektyvesnę sistemą, tačiau tokios sistemos optinė schema yra gerokai sudėtingesnė.



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

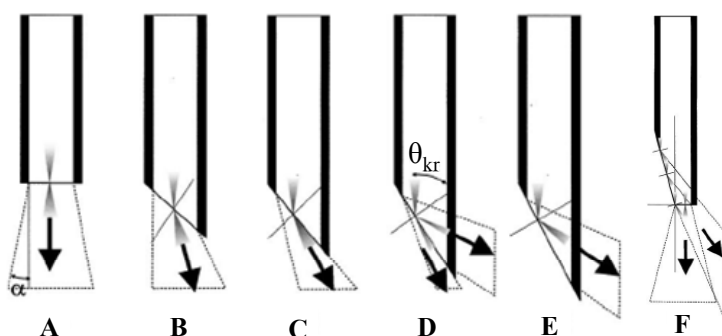
Aptartoji šviesolaidinė žadinimo–surinkimo sistema yra kontaktinė, t. y. zondas yra arba priglaudžiamas prie audinio, arba laikomas nedideliu atstumu nuo audinio, todėl naudojami šviesolaidiniai zondai turi atitikti tam tikrus saugumo reikalavimus. Kalbant apie saugumą, galima išskirti tokias potencialias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

- **Pažaidos**, sukeltos žadinimui naudojamos spinduliuotės (tai galioja ir nespindulinei žadinimo–surinkimo sistemai). Šviesos energija, kuri saugiai gali būti naudojama optinio atsako sužadinimui, neturėtų viršyti 3 mJ/cm^2 ties 270 nm .
- **Terminio pažeidimo rizika**. Turėtų būti įvertinta audinio temperatūros padidėjimo iki pavojingos ribos rizika. Tai priklauso nuo audinio tipo ir kiekvienam audiniui ši rizika turėtų būti įvertinama atskirai.
- **Elektrošoko pavojus**. Medžiagos, iš kurių gaminami šviesolaidžiai (kvarcas, akrilas, polistirolas, silicis), yra geri elektros srovės izoliatoriai, todėl elektrošoko rizika yra minimali.
- **Klinikinis pavojus** (infekcijos įnešimas, užkrėtimas). Siekiant išvengti klinikinio pavojaus, šviesolaidinis zondas prieš kiekvieną naudojimą turi būti dezinfekuojamas arba sterilizuojamas. Jei šviesolaidinis zondas yra vientisa optinės biopsijos sistemos dalis ir negali būti atjungiamas, galima naudoti specialius užmaunamus antgalius, kurie turi būti skaidrūs tiek žadinančiam, tiek surenkamam spinduliui bei atitikti tuos pačius saugumo reikalavimus, keliamus šviesolaidiniam zondui. Dezinfekuojant svarbiausia yra paties šviesolaidinio zondo atsparumas dezinfekavimo priemonėms.
- **Zondui naudojamų medžiagų kenksmingumas**. Šviesolaidžiai yra apibūdinami kaip trumpalaikio paviršinio arba išorinių kontaktų įrenginiai, todėl medžiagos, iš kurių jie yra pagaminti, turi būti ištirtos dėl citotoksiškumo, jautrinimo ar erzinimo (alerginės reakcijos) bei dėl toksiškumo, susijusio su dažnu ar ilgu naudojimu.

Priklausomai nuo tiriamojo objekto bei jo lokalizacijos – ar tai yra paviršinis darinys ir šviesolaidiniu zondų galima prieiti tiesiogiai, ar tai yra vidaus organas ir šviesolaidinis zondas turi būti suderintas su esamais vidaus organų apžiūros prietaisais – endoskopais, yra galimi įvairūs šviesolaidinių zondų antgaliai. Pirmiausia antgaliai gali būti skirstomi pagal jų galo tipą:

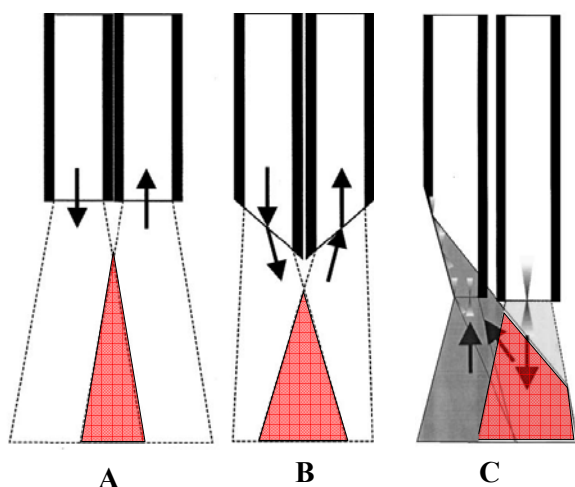
- Antgaliai su bukais galais (2.24 A pav.). Šviesa iš šviesolaidžio sklinda tiesiai. Koku kampu skečiasi išėjusi šviesa, lemia šviesolaidžio skaitinė apertūra.
- Antgaliai su nuožulniais galais. Šviesa išeina pro šviesolaidžio galą, tačiau skėstis ir kryptis yra lemiamą šviesolaidžio skaitinės apertūros bei nuožulnumo kampo (2.24 B, C pav.). Pasiekus tam tikrą kritinį kampą θ_{kr} , sukeliamas visiškas šviesos atspindys ir dalis spinduliuotės iš šviesolaidžio išeina pro jo šoną (2.24 D pav.). Tokiu atveju šviesolaidžio apsauginis apvalkalas turi būti nuvalytas paliekant tik skaidrius sluoksnius. Dar padidinus nuožulnumo kampą visa šviesa išeis tik pro šviesolaidžio šoną (2.24 E pav.). Siekiant padidinti atspindį nuo nuožulniosios

plokštumos, ji papildomai gali būti dengiama atspindinčia medžiaga. Taip pat yra galimybė sujungti abiejų tipų šviesolaidžio galus, taip padaromas mišraus tipo antgalis (2.24 F pav.).



2.24 pav. Šviesolaidinių zondu antgaliai: A – bukas; B-E – nuožulnus; F – mišrus

Tam tikras šviesolaidinių zondu antgalių pasirinkimas sąlygoja atitinkamas zondo savybes žadinant bei surenkant fluorescenciją. Jei optinės biopsijos žadinimo–surinkimo sistemoje yra tik vienas šviesolaidis, tam beveik visada yra naudojamas buko tipo antgalis, retkarčiais – mišraus tipo. Tačiau kai žadinimo–surinkimo sistemai yra naudojami du ir daugiau šviesolaidžių, tam tikrais atvejais yra naudinga naudoti arba bukus, arba nuožulnius, arba sujungti abiejų tipų šviesolaidžių antgalius. Nuo žadinimo–surinkimo sistemos tipo

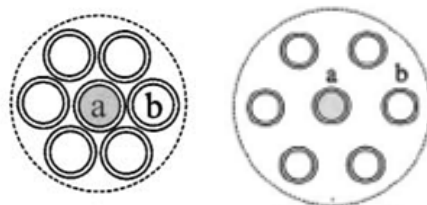


2.25 pav. Šviesolaidiniai zondai, sudaryti iš dviejų šviesolaidžių: A – abu šviesolaidžiai yra bukais galais, B – nuožulniais galais, C – vienas bukas, kitas mišriu galu. Raudonai pažymėta erdvė, kur persikloja žadinimo bei surinkimo spinduliai

naudojant mišraus ir buko tipo antgalius (2.25 C pav.). Tokio zondo, palyginus jį su bukų antgalių zondų, efektyvumas yra didesnis nuo 6,5 iki 20 kartų, priklausomai nuo nuožulnumo kampo. Siekiant dar labiau padidinti optinio signalo surinkimo efektyvumą, žadinimui–surinkimui galima naudoti ne vieną šviesolaidį.

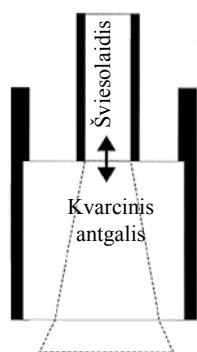
priklauso ir šios sistemos savybės, pavyzdžiui, zondas, sudarytas iš dviejų nuožulnių šviesolaidžių, yra maždaug 1,5 karto efektyvesnis nei zondas, sudarytas iš dviejų bukų šviesolaidžių. Taip yra todėl, kad apšvietimo ir surinkimo plotai persidengia daugiau (2.25 A, B pav.) ir didesnė dalis sužadintų molekulių fluorescencijos patenka į šviesolaidžių galimo surinkimo erdvę. Tačiau tūris, iš kurio nuožulniuojų zondų yra renkama informacija, yra mažesnis ir yra arčiau zondo. Dar vieno tipo zondas, kuriame fluorescencija yra surenkama netgi iš viso apšviečiamo ploto, gali būti sukonstruotas

Populiariausias tokio tipo zondas yra ratu išdėstyti surinkimo šviesolaidžiai aplink vieną žadinimo šviesolaidį (2.26 pav.). Surinkimo šviesolaidžiai galiausiai yra sujungiami į vieną šviesolaidį ir gaunamas tradicinis dviejų atšakų bifurkacinis šviesolaidis. Tokio zondo žadinimo šviesolaidžio apšviečiamas plotas persikloja su visų šešių aplink išdėstytų šviesolaidžių surinkimo plotais ir zondo efektyvumas būna beveik šešis kartus didesnis nei dviejų šviesolaidžių zondo. Kai reikia, centrinį šviesolaidį galima naudoti surinkimui, o žadinimui – aplink jį išsidėsčiusius šviesolaidžius. Taip pat yra galimi įvairūs kiti tokio tipo zondo variantai – šviesolaidžiai su bukais galais, nuožulniais



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

galais arba mišraus tipo galais, arba įvairių tipų šviesolaidžių deriniai. Reikia atkreipti dėmesį į tai, kad optinės biopsijos aparatuose fluorescencijos žadinimui ir surinkimui naudojant atskirus šviesolaidžius, kelyje iki surinkimo šviesolaidžio fluorescencijos signalas gali būti netikslus. Tai sąlygoja išspinduliuoto fotono kelyje pasitaikantys sugeriantys arba/ir sklaidantys elementai. Kuo didesnis atstumas tarp žadinimo ir surinkimo šviesolaidžių, tuo daugiau bus modifikuotas fluorescencijos signalas.

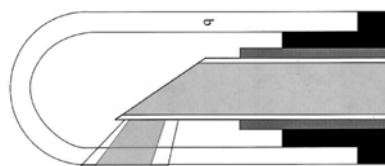


2.27 pav. Vieno šviesolaidžio sistema su kvarciniu antgaliu prieš šviesolaidį

Dar vienas būdas, leidžiantis padidinti apšvietimo bei surinkimo persidengimo plotą – tai šviesolaidinį zondą nuo audinio laikyti tam tikru atstumu, kai šis plotas yra didžiausias. 2.25 paveiksle matyti, kad, tolstant nuo šviesolaidžių antgalių, persidengimo plotas didėja. Praktikoje yra naudojami specialūs šviesolaidžiai su tam tikro storio kvarciniais antgaliais. Kvarcinio antgalio storis ir nulemia, koku atstumu zondas bus nutolęs nuo audinio. Tačiau tokiu atveju mažėja surinkimo efektyvumas $1/d^2$, kur d yra atstumas nuo zondo iki audinio. Buvo atlikti tokios sistemos tyrimai, kai optinei biopsijai buvo naudojama vieno šviesolaidžio sistema (2.27 pav.). Tyrimai atlikti su įvairių skersmenų šviesolaidžiais. Padidinus šviesolaidžio skersmenį nuo 0,1 mm iki 1 mm, fluorescencijos surinkimas padidėjo daugiau nei 3,5 karto, kai fluorescencija registruota prie pat audinio. Gylis, iš kurio buvo surinkta maždaug 80 % fluorescencijos signalo, priklausomai nuo skersmens, siekė nuo 0,175 mm iki 0,375 mm. Prieš zondą įdėjus 5 mm kvarcinį antgalį, gylis, iš kurio surinkta 80 % fluorescencijos, padidėjo iki 0,425 mm, kai tuo tarpu užregistruotos fluorescencijos intensyvumas sumažėjo nuo 5 iki 20 kartų (priklausomai nuo šviesolaidžio skersmens). Taigi zondą priglaudus tiesiai prie audinio užregistruojamas didesnis fluorescencijos intensyvumas,

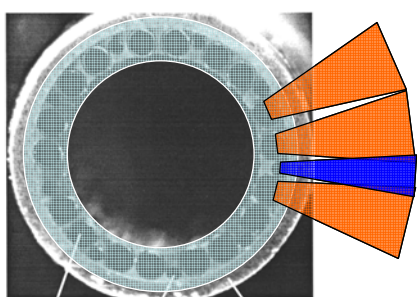
tačiau tiriamasis gylis yra mažesnis negu naudojant zondą su papildomu kvarciniu stikliuku. Panašų efektą galima pasiekti ir keičiant šviesolaidžio skaitinę apertūrą, tada nereikia naudoti papildomų kvarcinių antgalių.

Tam tikrais atvejais labai patogu naudoti nuožulnaus tipo antgalių zondus. Jie yra ypač patogūs, kai tiriamoji vieta yra šviesolaidžio šone, tada netgi nekraipant šviesolaidžio galima apšviesti



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

bandinį bei užregistruoti jo fluorescenciją. Pavyzdžiui, tiriant kraujagyslių sieneles, gimdos kaklelį ir kt. Tokie zondai vadinami šoniniais zondais (2.28 pav.). Šoninių zondų yra įvairių tipų: vieno šviesolaidžio, dviejų šviesolaidžių bei ratu išdėstytų daugelio šviesolaidžių.



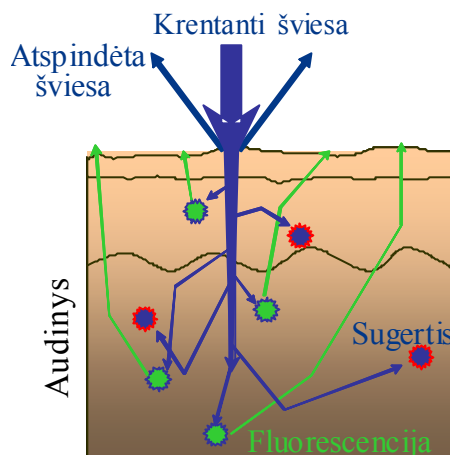
Terminio pažeidimo šviesolaidis Optinės biopsijos šviesolaidis Žiedinė prizmė

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

Fluorescencijos žadinimui bei surinkimui naudojant skirtingus šviesolaidžius, juos reikia suderinti taip, kad jų apšvietimo/surinkimo plotai persidengtų – pasukti juos tam tikru kampu vienas kito atžvilgiu. Kartais, kai naudojama ratu išdėstytų šviesolaidžių sistema, yra naudojami buko tipo šviesolaidžiai ir zondo gale dedama speciali žiedinė prizmė, kuri nukreipia spindulius į šoną. 2.29 paveiksle pavaizduotas zondas, kuriuo atliekami terminiai pažeidimai. Tarpuose tarp abliacijai skirtų šviesolaidžių, yra įterpti diagnostikos šviesolaidžiai, kuriais galima atlikti optinę biopsiją. Taip gaunamas zondas, kuriuo vienu metu visame tiriamos ertmės

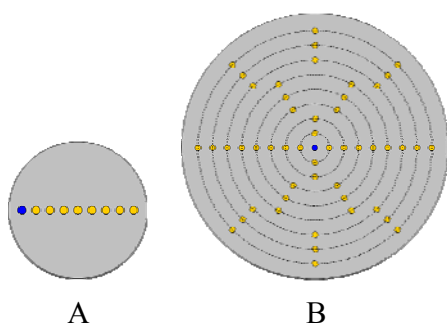
vidiniame paviršiuje galima ir gydyti, ir stebėti gydymo eigą.

Paprastais bifurkaciniais šviesolaidžiais registruojama fluorescencija yra mišinys iš įvairių sluoksnių ateinančių signalų, kuriuos sukelia sugerta spinduliuotė. Keičiant žadinimo bangos ilgį galima pasiekti didesnę šviesos išsiskverbimo gylį, kol ji bus visiškai sugerta, tačiau dėl specifinių audinio savybių (audinys stipriai sugeria bei sklaido spinduliuotę) didžioji fluorescencijos dalis bus kilusi iš audinio paviršiaus. Tuo tarpu daugelio ligų židiniai arba navikai kartais vystosi giliau audinyje ir klasikiniiais fluorescencijos metodais nepavyksta jų aptikti ar



2.30 pav. Šviesos spindulių eiga audinyje

nustatyti tikslios buvimo vietos. Remiantis sklaidos teorija, paviršiuje išfluorescuoti fotonai yra nedaug veikiami sklaidos ir todėl jie sklinda beveik tiesiai į paviršių – šalia žadinimo šviesolaidžio (2.30 pav.). Tuo tarpu giliau išfluorescuoti fotonai savo kelyje iki paviršiaus sutinka kur kas daugiau sklaidančiųjų dalelių, todėl audinį palieka tam tikru atstumu nuo žadinimo šviesolaidžio. Taigi surinkimo šviesolaidžiui esant šalia žadinimo arba netgi esant keliems surinkimo šviesolaidžiams, bet išdėstytiems tokiu pačiu atstumu, smarkiai išsklaidyti fotonai nėra užregistruojami, taigi ir nėra gaunama informacijos iš giliai esančių sluoksnių. Tačiau, panaudojus tam tikras šviesolaidines sistemas, galinčias užregistruoti įvairiu atstumu nuo žadinančiojo šviesolaidžio išlekiančius fotonus, galima būtų gauti informaciją ir iš gilesnių audinių sluoksnių. Tokia sistema, sudaryta iš vieno fluorescencijos žadinimo šviesolaidžio ir keleto skirtingais atstumais nuo jo išdėstytų surinkimo šviesolaidžių, vadinama daugianuotoline (2.31 pav.). Dėl tų pačių audinio optinių savybių, įgalinančių registruoti gilesnių sluoksnių fluorescenciją, į tolimiausius šviesolaidžius, kurie daugiausiai

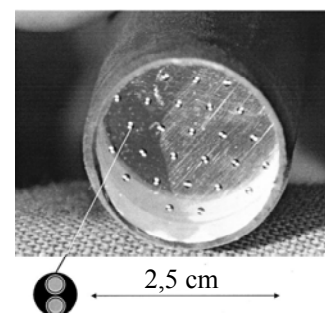


2.31 pav. Šviesolaidiniai zondai: A – daugianuotolinė sistema, sudaryta iš 1 žadinimo ir 8 surinkimo šviesolaidžių, išdėstytų 1–8 mm atstumu; B – padidėjusio jautrumo daugianuotolinė sistema

informacijos surenka iš gilesnių sluoksnių, ateina labai mažai fotonų. Todėl buvo sukurta didesnio jautrumo daugianuotolinė sistema, kurioje, tolstant nuo žadinimo šviesolaidžio, surinkimo šviesolaidžių daugėja (2.31 B pav.). 1 ir 2 mm atstumu nuo žadinimo šviesolaidžio esančios registravimo grupės sudarytos iš 4 šviesolaidžių. 3, 4 ir 5 mm atstumais nutolusios registravimo grupės yra sudarytos iš 6 šviesolaidžių, o 6, 7 ir 8 mm atstumais esančios grupės yra sudarytos iš 8 registravimo šviesolaidžių. Taigi, tolstant nuo žadinimo šviesolaidžio, yra daugiau registravimo šviesolaidžių,

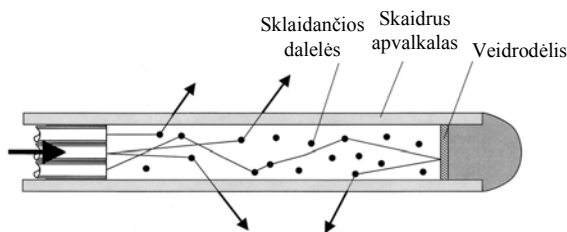
todėl užregistruojama ir daugiau fotonų, į paviršių išeinančių toliau nuo žadinimo šviesolaidžio. Būtent ši savybė ir lemia tai, kad toks zondas jautresnis fotonams iš gilesnių sluoksnių.

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



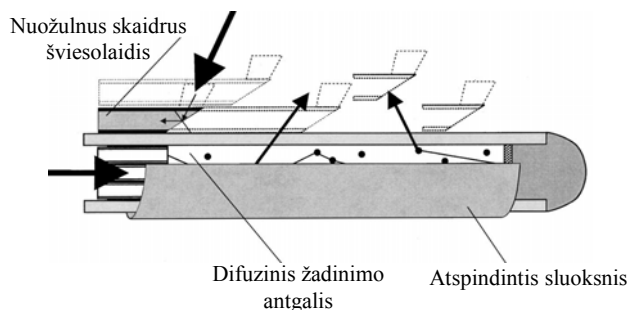
2.32 pav. Optinės biopsijos zondas, kuriame yra integruota 31 žadinimo–surinkimo sistema

sistemų. Paveiksle 2.32 pateikiamas optinės biopsijos zondas, kuriame yra integruota 31 žadinimo–surinkimo sistema. Kiekvieną sistemą sudaro vienas žadinimo ir vienas surinkimo šviesolaidis. Užregistravus šiuo zonu optinius signalus galima sudaryti audinio fluorescencinius „žemėlapius“, pagal kuriuos galima atlikti audinio fluorescencinį vaizdinimą. Šiuo metu yra sukurta sistema iš 120 žadinimo–surinkimo sistemų, tačiau, norint dar labiau padidinti tiriamų vietų skaičių, naudingiau yra naudoti spindulines žadinimo–surinkimo sistemas su audinio skenavimo galimybe.



2.33 pav. Difuzinis antgalis

naudojami difuziniai šviesolaidžių antgaliai, galintys homogeniškai apšviesti dideles ertmes arba didelius paviršiaus plotus. Tokie antgaliai taip pat gali būti naudojami fluorescencijos žadinimui optinės biopsijos metu. Difuziniai antgaliai yra gaminami į skaidrią terpę (pavyzdžiui, optinius klijus) įmaišant sklaidančių dalelių, tokių kaip titano oksidas (TiO_2) ar aliuminio oksidas (Al_2O_3). Yra galimi tiek lankstūs, tiek kieti difuziniai antgaliai. Toks difuzinis antgalis yra pavaizduotas 2.33 paveiksle. Difuzinis antgalis yra užmaunamas ant standartinio buko šviesolaidžio. Antgalio viršūnėje yra įmontuotas veidrodėlis, kuris atspindi praėjusią (neišsklaidytą į šonus) spinduliuotę atgal į sklaidančią aplinką, kur ji yra dar kartą sklaidoma, taip didinamas sklaidymo efektyvumas. Naudojant tokį difuzinį antgalį buvo pagaminta optinės biopsijos sistema, skirta įvairių kanalų tyrimui. Toks zondas vadinamas difuziniu diagnostiniu zonu. Pats difuzinis antgalis iš vienos pusės buvo padengtas atspindinčiu sluoksniu, kuris apriboja spinduliavimą tik į vieną pusę. Fluorescencijos detektavimui tiriamojo kanalo viduje buvo naudojami šoniniai zondai. Norint vienu tyrimu ištirti visą apšviečiamą paviršių, surinkimo šviesolaidžiai yra išdėstomi per visą sklaidančio antgalio ilgį (2.34 pav.).



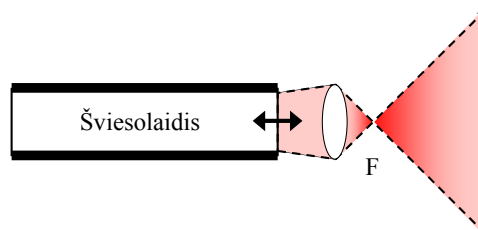
2.34 pav. Difuzinis diagnostinis antgalis

Taip pat gali būti naudojamas ir vienas surinkimo šviesolaidis, tada reikia, kad būtų galima keisti jo padėtį išilgai difuzinio antgalio. Kadangi ir žadinimo antgalis, ir surinkimo

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

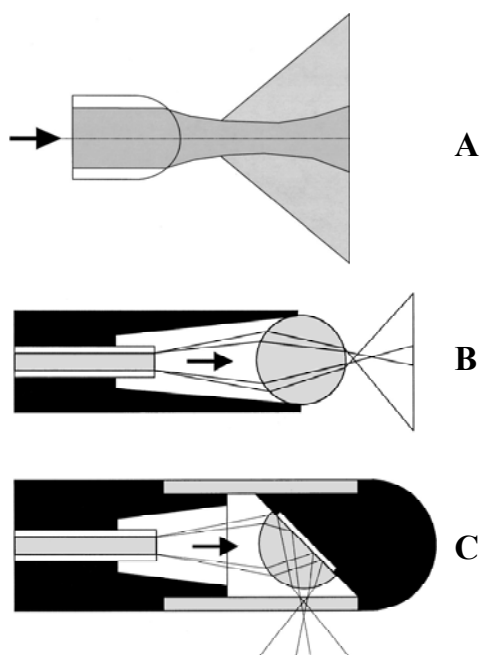
Atliekant diagnostiką dažnai pasitaiko atvejų, kai tyrimo metu pirmiausia reikia apšviesti didelį plotą, o norint pažiūrėti detaliau reikia sufokusuoti spindulį į konkrečią įtartiną vietą ir tik joje atlikti optinę biopsiją. Tokiu atveju reikia dviejų tipų skirtingų charakteristikų optinių zondu.

Tačiau kaip tai įgyvendinti, jeigu tyrimas atliekamas naudojant vidaus tyrimo prietaisus su vienu kanalu šviesolaidžio įvedimui? Taigi, ar gali prietaisas, kai yra tik vienas šviesolaidis, tiktai abiem atvejams: pirmiausia – apšviesti didelį plotą ir vėliau, išsirinčius reikiamą vietą, visą šviesą sufokusuoti į vieną tašką ir jame atlikti optinę biopsiją? Pasirodo, galima. Šiam tikslui ir buvo sukonstruoti



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

fokusuojamieji antgaliai. Tokio antgalio esmė ta, kad iš šviesolaidžio išėjusi spinduliuotė yra fokusuojama, ir tam tikru atstumu nuo šviesolaidžio yra taškas F, vadinamas židiniu, kuriame intensyvumas yra didžiausias. Iš optikos žinoma, kad spinduliai už fokuso plečiasi, todėl didėja apšvietimo plotas (2.35 pav.). Taigi, jei reikia apšviesti mažą plotelį, šviesolaidis nuo



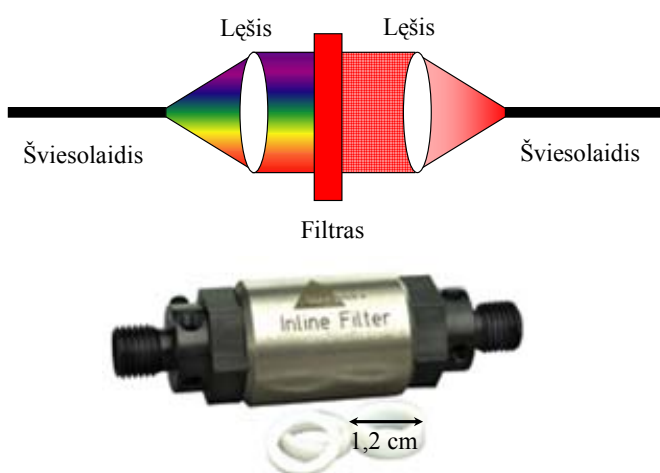
2.36 pav. A – šviesolaidis suapvalintu galu; B – šviesolaidis su sferine linze; C – šviesolaidis su pusiau sferine linze šoniniam apšvietimui

audinio atitraukiamas tiek, kad tiriamoji vieta būtų taške F. Šiame taške spinduliuotė yra fokusuota, todėl ir intensyvumas yra labai didelis, ir tai dažniausiai labai pagerina optinės biopsijos signalą. Be to, jei reikia apšviesti didelį plotą, tereikia šviesolaidį atitraukti dar toliau nuo audinio, kol bus apšviestas reikiamas plotas arba kol spinduliuotės intensyvumas visame plote dar bus pakankamas. Praktiškai toks šviesolaidis yra taikomas keliais būdais. Pirmas būdas: suapvalinant šviesolaidžio galą – tai atitinka pusiau sferinio lęšio pridėjimą prie šviesolaidžio galo (2.36 pav.). Tokio šviesolaidžio maksimalus intensyvumas taške F yra maždaug 3 kartus didesnis nei šviesolaidžio viduje. Zondas optinei biopsijai yra gaminamas iš vieno

šviesolaidžio. Tokio zondo tiriamoji sritis yra mažesnė nei šviesolaidžio skersmuo, o tinkamas surinkimo kampas didesnis nei paties šviesolaidžio, kurį nulemia skaitinė apertūra. Antras būdas – šviesolaidžio gale yra dedamas sferinis lęšis (2.36 B pav.). Sferos dažniausiai

yra gaminamos iš safyro. Tokio šviesolaidžio maksimalus intensyvumas fokuso taške yra daugiau nei 5 kartus didesnis negu pačiame šviesolaidyje. Tačiau didinant šviesolaidžio skersmenį dėl sferinės aberacijos vyks defokusavimas ir intensyvumas fokuso taške sumažės. Tokio tipo šviesolaidis taip pat gali būti gaminamas ir šoniniam apšvietimui (2.36 C pav.).

2.3.2.2. Filtrai.



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

Dar viena esminė šviesolaidinio optinės biopsijos prietaiso dalis yra filtrinė spektrinės sudėties modifikavimo sistema. Šios sistemos esmė – apytikriai filtruoti šviesos spektrinę sudėtį, dažniausiai tai yra leisti arba sulaikyti tam tikros spalvos šviesą. Tinkamo bangos ilgio (spalvos) šviesa apšviestas audinys duos optinį atsaką – fluorescenciją, kuri jau bus kitos spalvos nei žadinimo spinduliuotė, ir jei šis spalvinis skirtumas yra pakankamai didelis,

pavyzdžiui, jei žadinimui naudojama mėlyna šviesa, o fluorescencija matoma žalios arba raudonos spalvos, tai filtrinis spektrų atskyrimas bus gana efektyvus. Paprastoje optinėje biopsijoje tokios spektrinės sudėties modifikavimo sistemos visiškai pakanka. Tai yra labai paprasta sistema, kurią sudaro filtrų laikiklis bei pora lęšių spinduliuotės fokusavimui. Filtrinės spektrų modifikavimo sistemos schema pateikta 2.37 paveiksle. Kadangi ši sistema yra naudojama šviesolaidinėje sistemoje, tai ji turi būti tinkama jungimui su šviesolaidžiais bei atitikti tam tikrus reikalavimus, t. y. filtravimas turi būti atliekamas minimaliais intensyvumo nuostoliais. Būtent dėl to ir yra naudojami lęšiai. Sistemos veikimo principas labai paprastas: iš šviesolaidžio išėjusi spinduliuotė skečiasi tam tikru kampu, kurį apibrėžia šviesolaidžio skaitinė apertūra. Tam tikru atstumu nuo šviesolaidžio pastatytas glaudžiamasis lęšis iš besiskečiančio pluošto suformuoja lygiagretų pluoštą. Tada lygiagretaus pluošto kelyje yra dedamas filtras. Filtrą perėjęs pluoštas išlieka lygiagretus, o jo kelyje įdėtas dar vienas glaudžiamasis lęšis vėl sufokusuoja spinduliuotę ir ji vėl yra suvedama į šviesolaidį.

Kaip jau minėta anksčiau, filtrai taip pat yra naudojami ir spindulinėse sistemose. Jais yra kompensuojamas monochromatorių netobulumas – savybė praleisti spinduliuotę už pasirinkto bangos ilgio srities. Kai tiriamojo objekto spektrinės savybės yra apytikriai

žinomos, registruojamas intensyvumas yra didesnis būtent naudojant filtrus, o ne monochromatorius. Taip yra todėl, kad monochromatoriuose, siekiant tiksliai „išgryninti“ spalvas, intensyvumas prarandamas.

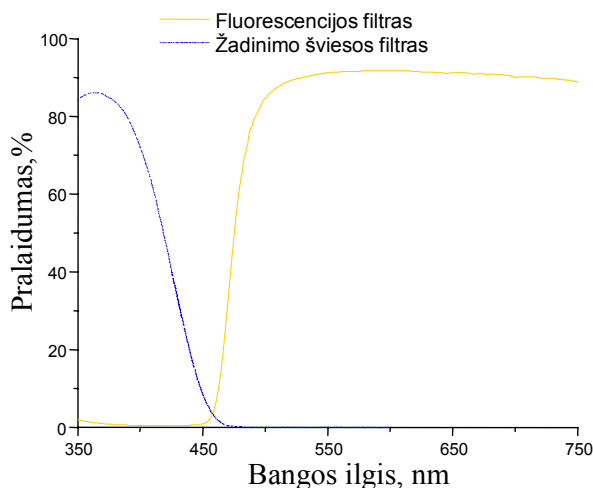
Pagal tai, kokią spektrinę sritį praleidžia ar sulaiko, filtrai gali būti skirstomi į juostinio pralaidumo (angl. *bandpass*) filtrus, kurie praleidžia tik tam tikros spektrinės srities spinduliuotę, nukirtimo (angl. *cut-off*) filtrus, kurie praleidžia spinduliuotę tik iki tam tikros srities, bei atkirtimo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

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

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

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

Šviesolaidinėje optinės biopsijos aparatūroje naudojamos filtrinės sistemos yra dviejų tipų – tai žadinimo spinduliuotės filtravimo sistema ir emisijos signalo (fluorescencijos) filtravimo sistema. Jos skiriasi savo pralaidumo charakteristikomis. Pirmoji sistema skirta išrinkti tinkamą žadinančiosios spinduliuotės bangos ilgį (jei naudojami plataus spektro šviesos šaltiniai, pavyzdžiui, lempos), o antroji sistema skirta nufiltruoti į surinkimo šviesolaidį patekusią žadinančiąją spinduliuotę. Kitaip tariant, šių sistemų pralaidumo charakteristikos turi nepersidengti – tos spektrinės srities, kurią praleidžia pirmoji sistema, antroji sistema turi nepraleisti. Optinėje biopsijoje naudojamų filtrų charakteristikų pavyzdys pateiktas 2.38 paveiksle.



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

2.4. Detektoriai

Paskutinis optinės biopsijos sistemos elementas, kuris yra būtinas norint užregistruoti audinių atsaką, yra detektorius. Tam tikrais atvejais, kai audinio fluorescencija yra labai intensyvi – dažniausiai tai yra pajautrinta (sensibilizuotoji) fluorescencija – ji gali būti matoma ir plika akimi. Taip gali būti atliekama audinių diagnostika – vaizdinimas.

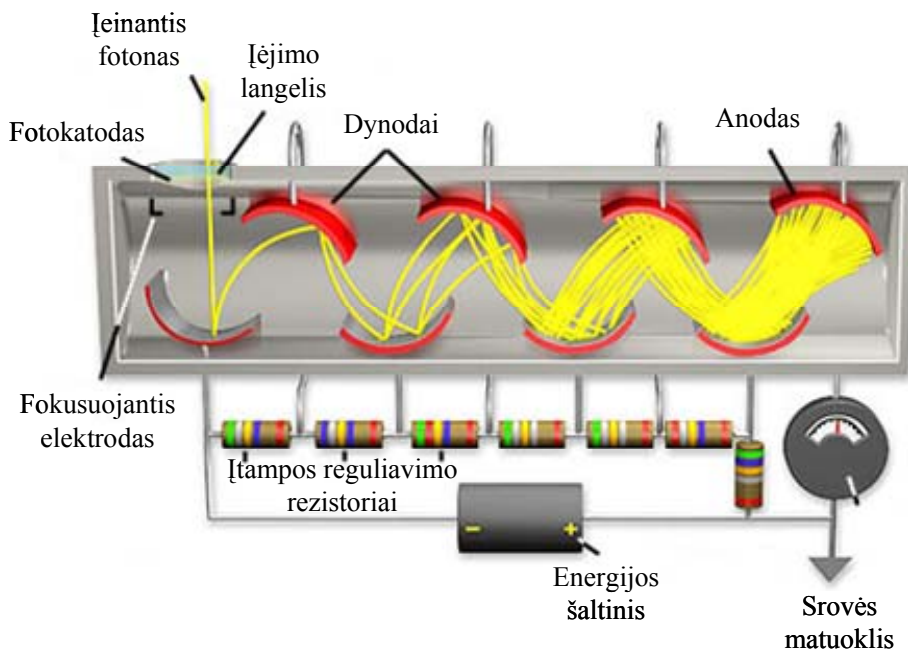
Deja, toks būdas yra tinkamas tik tada, kai pažeidimo lygis yra labai didelis arba pažeida jau yra išplitusi, o ankstyvojoje diagnostikoje, kurioje optinės biopsijos perspektyvos yra didžiausios, pažeida turi būti nustatoma kuo anksčiau – t. y. vos keleto ląstelių lygiu. Taigi šio nedidelio ląstelių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

2.4.1. Fotodaugintuvai

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

Fotodaugintuvas geriausiai gali būti suprantamas kaip šaltinis srovės, kurios stiprumas priklauso nuo į fotodaugintuvą patenkančios šviesos intensyvumo. Pagrindinės fotodaugintuvo dalys yra šviesai jautrus elementas (fotokatodas) ir stiprinimo sistema (dynodų grandinės). Fotokatodas ir dynodų seka yra įdėti į vakuuminį vamzdelį (2.39 pav.).

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



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

Fotodaugintuvai yra mažatriukšmiai stiprintuvai, t. y. lekiant elektronams fotodaugintuve papildomo triukšmo atsiranda mažai. Dėl to šio tipo detektoriai ir yra plačiai taikomi silpnos šviesos registravimui, tačiau būtent dėl didelio jų jautrumo fotodaugintuvais nerekomenduojama detektuoti itin didelio intensyvumo signalų. Šviečiant dideliu intensyvumu, elektrinis fotokatodo potencialas gali sumažėti dėl ribotos talpos (bus išmušta

labai daug fotoelektronų). Tai sumažina įtampos skirtumą tarp fotokatodo ir pirmo dynodo, kuris taip pat sumažina stiprinimą. Be to, besaikis švietimas taip pat gali sugadinti šviesai jautrius fotokatodus, o tai sukelia triukšmų atsiradimą ir stiprinimo sumažėjimą.

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

Fotodaugintuvo atsaką taip pat nulemia ir cheminė fotokatodo sudėtis. Daugelis fotokatodų yra jautrūs trumpų bangos ilgių spinduliuotei, kurią sulaiko įėjimo langelio medžiaga. Įprastai fotokatodai yra jautrūs UV, mėlynai ir žaliai (300 nm–500 nm) šviesai. Dažniausiai naudojamas bišarminis fotokatodas (sudarytas iš dviejų šarminių metalų), pasižymintis dideliu jautrumu ir maža tamsine srove (mažas triukšmas). Jo trūkumas – staigus jautrumo mažėjimas, kai bangos ilgesnės negu 600 nm. Taigi skirtumai tarp fotokatodo medžiagų pasidaro labai svarbūs, norint registruoti fluorescenciją ilgesnių nei 600 nm bangų srityje. Pastaruoju metu diagnostikai yra plačiai taikoma raudonoji ir artimoji IR fluorescencija, deja, dirbant šioje srityje bišarminis fotokatodas yra nelabai naudingas. Jautrumas ilgesnių negu 500 nm bangų šviesai padidinamas naudojant daugiašarmius fotokatodus, kurie gana jautrūs 700–800 nm ir ilgesnių bangų šviesai. Raudonai šviesai jautrūs fotodaugintuvai dažniausiai pasižymi ir didesniais triukšmais. Jautrumas ilgesniems bangos ilgiams (IR srityje) gali būti pasiektas naudojant Ag-O-Cs ar S-1 fotokatodus. Tačiau jų kvantinis našumas (fotoelektronų atsiradimas, į fotokatodą atsitrenkus fotonui) yra gana nedidelis, todėl naudojant šiuos detektorius dažnai sunku tikrąjį signalą išskirti iš triukšmų. Dėl šios priežasties, siekiant sumažinti triukšmų, raudonosios ir IR srities fotodaugintuvai dažnai yra papildomai aušinami.

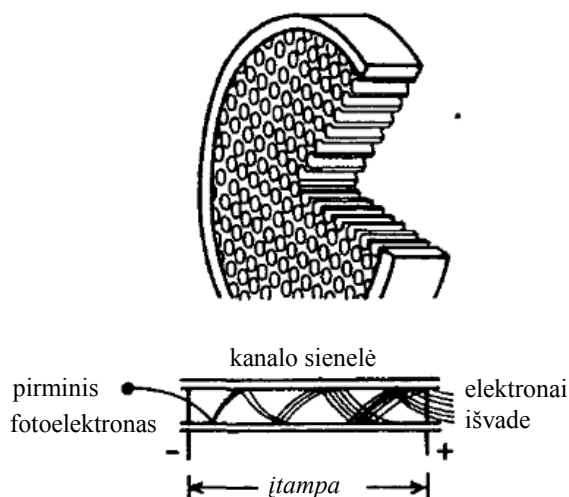
Visiems fotodaugintuvams yra būdinga tai, kad jie nevienodai efektyviai reaguoja į skirtingų bangos ilgių (spalvos) šviesą. Taigi detektoriai drauge su monochromatoriais, kurių efektyvumas taip pat yra nevienodas skirtingų bangos ilgių spinduliuotei, iškraipo tikrąjį fluorescencijos spektrą, kuris turi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

Dar viena svarbi fotodaugintuvų charakteristika yra jų laikinis atsakas. Tai yra laikas, per kurį fotono išmuštas fotoelektronas ir jo toliau išmušti kiti elektronai pereina visą

stiprinimo procesą. Kitaip tariant, po kiek laiko po pirmojo fotono atėjimo detektorius bus pasirengęs „priimti“ kitą fotoną. Toks parametras nėra svarbus atliekant nuostoviosios fluorescencijos matavimus. Tačiau dabartiniuose fotodaugintuvuose šis laikas yra labai trumpas, todėl jie puikiai tinka optinei biopsijai su laikine skyra.

Pagrindinės fotodaugintuvo laikinio atsako skaičiavimo charakteristikos yra šios: perėjimo laikas, stiprėjimo laikas ir laikinis išplitimas. Perėjimo laikas yra laiko intervalas tarp ateinančio į katodą fotono ir pirmo į anodą atlekiančio elektrono, paprastai apie 20–50 ns. Stiprėjimo laikas – laikas, per kurį fotodaugintuvo anodo signalas sustiprėja nuo 10 % iki 90 % didžiausios vertės. Stiprėjimo laikas priklauso nuo perėjimo laiko svyravimų, ir trunka apie vidutinį perėjimo laiką. Fotodaugintuvo laikinė skyra labiausiai priklauso nuo laikinio išplitimo, kuris atsiranda dėl skirtingų elektronų trajektorijų jiems lekiant iš dynodų link anodo. Tai reiškia, kad pirmiausia fotoelektronas gali išlėkti iš skirtingų fotokatodo vietų arba lėkti kita trajektorija. Toliau – iš dynodų išmuštų elektronų trajektorija per fotodaugintuvą taip pat šiek tiek gali skirtis. Laikinis išplitimas gali būti sumažinamas apšviečiant mažą plotą arba pakeičiant dynodų išdėstymą ir formą į tokia, kuri lemtų elektronų kryptį. Šiuo metu labiausiai paplitę detektoriai fluorescencijos su laikine skyra registravimui yra fotodaugintuvai su mikrokanaalų plokštelėmis dynoduose (2.40 pav.). Juose elektronai juda beveik viena trajektorija, todėl jų laikinis išplitimas yra 10 kartų mažesnis nei standartiniuose fotodaugintuvuose. Papildomi elektronai yra išmušami, kai pradinis elektronas lekia pagal įtampos gradientą mikrokanaalų plokštelėje ir atsitrenkia į kanalo sienelės. Dėl trumpo elektronų kelio ir apribotos jų krypties šio tipo detektorių yra trumpiausias laikinis atsakas ir jie dažniausiai naudojami atliekant laikinės skyros matavimus. Tačiau stiprinimas paprastai yra mažesnis nei fotodaugintuvų su pavienėmis dynodų grandinėmis, todėl mikrokanaaliai fotodaugintuvai galimi su vienos, dviejų ar trijų pakopų mikrokanaalų plokštelėmis.

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



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

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

Taigi iš visų išvardytų fotodaugintuvų savybių aiškėja jų privalumai ir trūkumai. Visų pirma jie šiuo metu yra patys jautriausi detektoriai, gebantys užregistruoti net ir pavienius fotonus. Kitas jų privalumas – mažas triukšmas, kuris gali būti dar labiau sumažintas papildomai šaldant, ir paskutinis tiek pat svarbus jų privalumas, – nepaprastai trumpas laikinis atsakas, įgalinantis registruoti labai trapius vyksmus ir atlikti įvairiausius laikinius matavimus, taip dar labiau praplečiant optinių diagnostikos metodų galimybes.

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

2.4.2. CCD detektoriai

Kaip ir daugelis naujai sukurtų prietaisų bei technologijų, krūvio kaupimo įrenginys (angl. *charge coupled device* – *CCD*) buvo sukurtas visai kitam tikslui. 1960 m. mokslininkai iš Bell Labs laboratorijos sukūrė naują atminties elementą, kurį pirmą kartą praktiškai panaudojo 1970 m. Tačiau tuoj ėmė aiškėti, jog dėl gebėjimo šviesą paversti elektriniu signalu šis išradimas kur kas naudingiau gali būti panaudotas vaizdų fiksavimui. CCD – tai

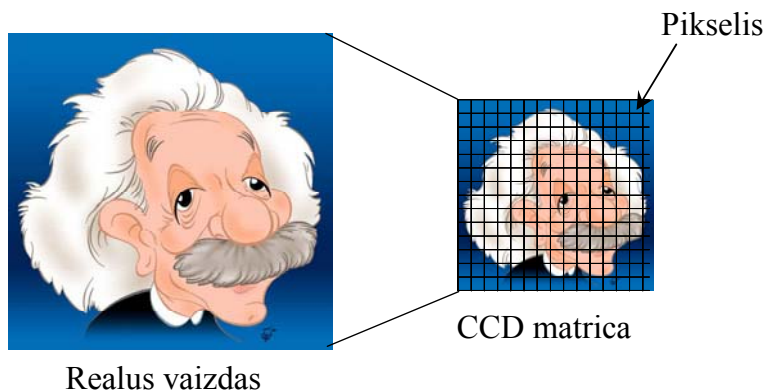
yra mažų, maždaug 10 – 50 μm dydžio, detektorių (pikselių), išdėstytų tam tikrame plote arba vienoje eilutėje, rinkinys. Pavadinimas CCD kilo iš to, kad vienoje zonoje (pikselyje) sukauptas krūvis yra perduodamas (arba sukaupiamas) šalia esančiai zonai. Iš esmės tai apibūdina duomenų perdavimą/nuskaitymą iš CCD matricos.

Vaizdinimas krūvio kaupimo įrenginiu susideda iš trijų pakopų:

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

Vaizdas yra formuojamas, kai šviesa fotonų pavidalu krinta ant mažyčių šviesai jautrių elementų – pikselių (2.41 pav.).

Kiekvienas pikselis gali būti išivaizduojamas kaip mažytis detektorius. Kritusi šviesa inicijuoja elektronų atsiradimą, kurių kiekis tiesiogiai priklauso nuo šviesos intensyvumo bei apšvietimo laiko. Be to, elektronų generavimo efektyvumas šiek tiek priklauso



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

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

Optinės biopsijos detektoriuose yra naudojami linijiniai CCD. Tai yra viena eile išdėstyti krūvio kaupimo įrenginiai. Kiekvienas šviesai jautrus elementas sudarytas iš p-n sandūrą turinčio fotodiodo. Krūvis, kuris atsiranda fotoelektrinės konversijos metu, kaupiasi kaip vidinis elemento krūvis ir yra perduodamas į postūmio registrą (angl. *shift register*). Juo

krūvis eina iki nuskaitymo įrenginio ir paeiliui yra nuskaitymos visų pikselių vertės. Pagal tai, kaip vertės nuskaitymos, linijiniai CCD yra skirstomi į:

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

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

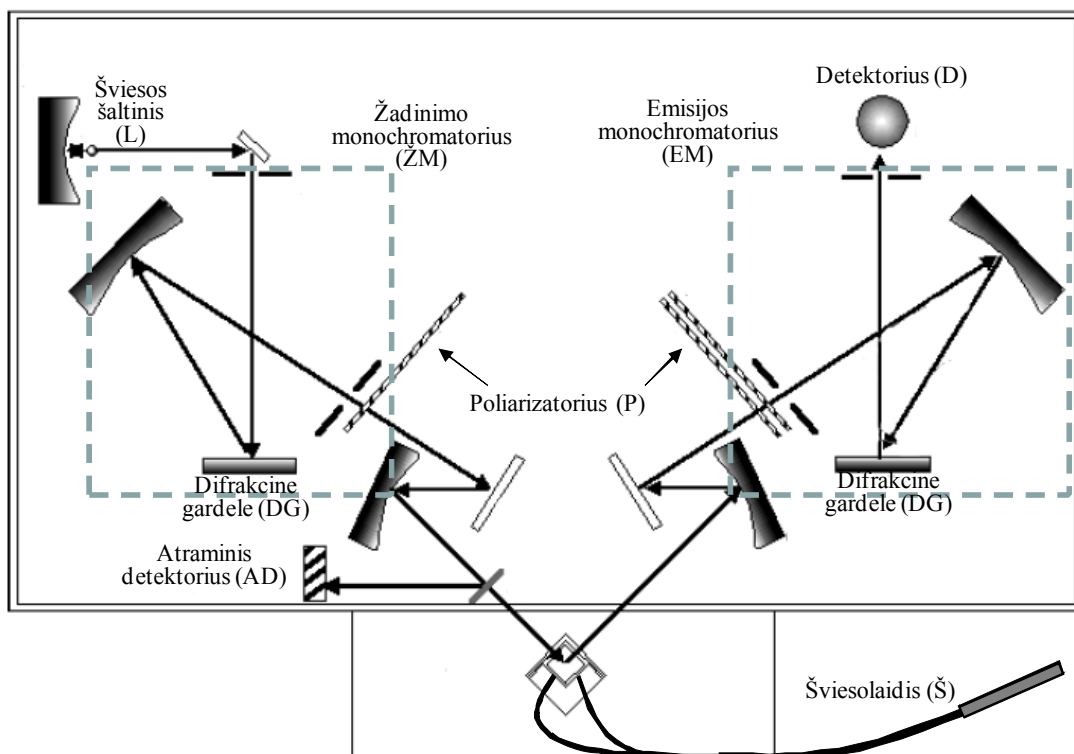
Pagrindiniai optinei biopsijai naudojamų linijinių CCD detektorių parametrai yra šviesai jautrių elementų (pikselių) skaičius, nuo kurio priklauso skiriama geba, jautrumas ir detektavimo sritis, kitaip dar vadinama spektriniu atsaku. Šiuo metu naudojamų CCD detektorių detektavimo sritis apima 200 nm–1100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

Spinduliuotei patekus į registravimo įrenginį, difrakcinės gardelės išskleista spinduliuotė krinta ant linijinio detektoriaus ir vienu metu yra registruojamas visų bangos ilgių (spalvų) spinduliuotės intensyvumas. Taigi didžiausias CCD detektorių privalumas yra tas, kad vienu metu yra registruojamas platus spektras. Dažniausiai platesnis nei yra audinio optinis atsakas; taigi optinė biopsija yra atliekama beveik akimirksniu. Nors CCD ir yra labai patogūs naudoti signalų registravimui nuostoviojoje optinėje biopsijoje, tačiau jų laikinis atsakas yra per lėtas laikinės skyros matavimams.

2.5. Optinės biopsijos prietaisai

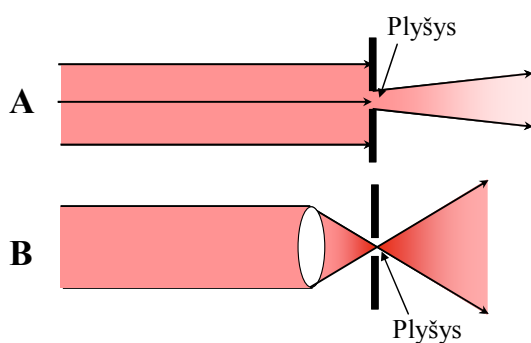
Optinės biopsijos prietaise yra visos aptartosios dalys – šviesos šaltinis, žadinimo–surinkimo sistema, spinduliuotės spektrinės sudėties modifikavimo sistema bei detektorius. Pats prietaisas, žinoma, yra sudarytas iš daug daugiau detalių, kurios reikalingos visoms išvardytoms dalims sujungti į vieną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

2.5.1. Spindulinis optinės biopsijos prietaisas



2.42 pav. Perkin Elmer fluorescencinis spektrometras, pritaikytas optinei biopsijai

Optinės biopsijos prietaisas yra tuo sudėtingesnis, kuo daugiau jame yra dėmenų, galinčių veikti spektrų parametrus. Visi prietaiso elementai yra skirti atlikti tam tikrai funkcijai – pasitelkiant juos yra atliekami atitinkami matavimai. Stengiamasi informaciją gauti kuo paprastesniu būdu, todėl dažniausiai optinė diagnostika atliekama panaudojant kuo mažiau papildomų elementų. Sudėtingas optinės biopsijos prietaisas remiasi spinduline



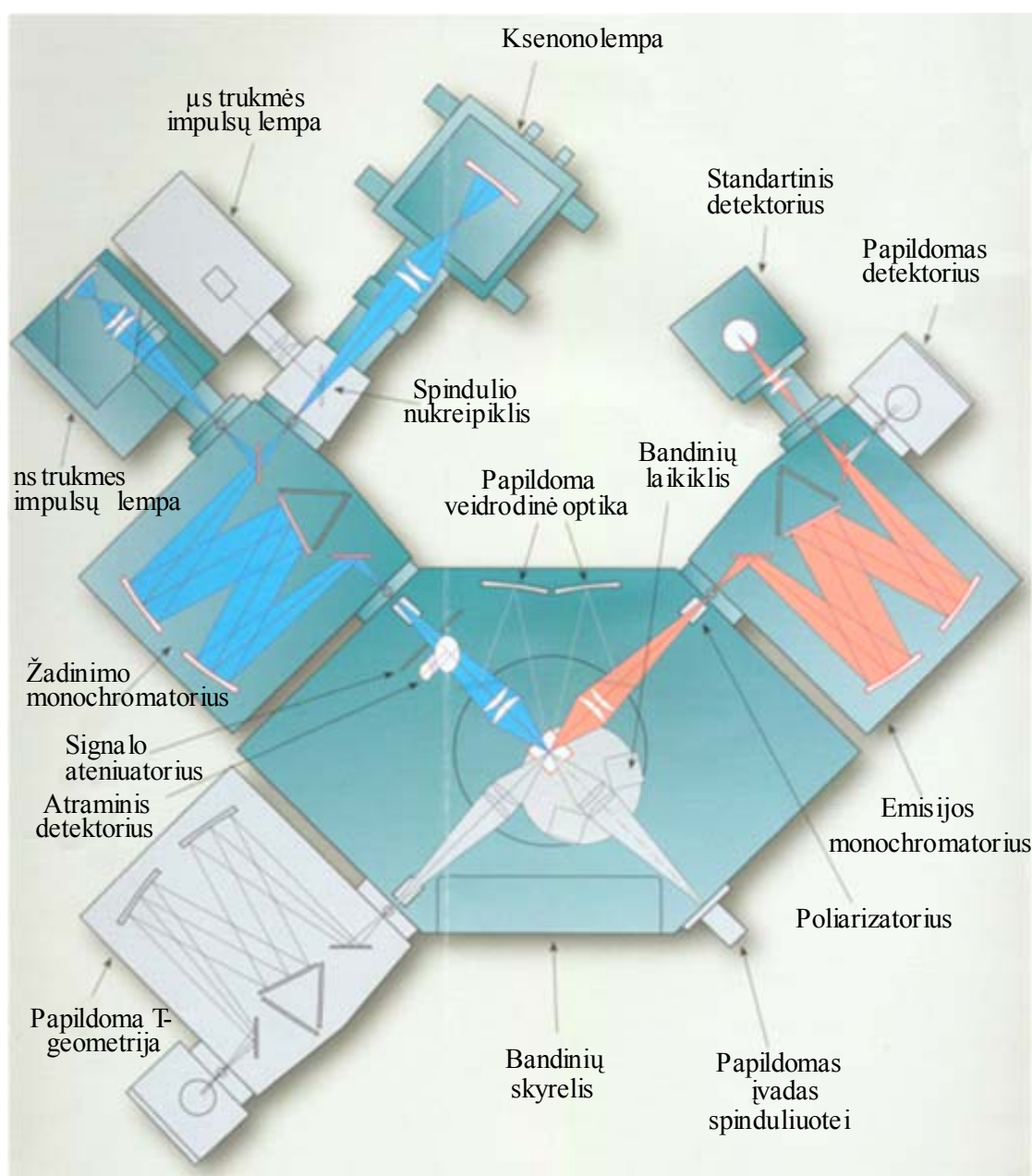
2.43 pav. A – nefokusuotai spinduliuotei sklindant pro plyšį, pereina tik nedidelė jos dalis, todėl smarkiai mažėja intensyvumas; B – kai židiny yra ties plyšiu, fokusuota spinduliuotė pereina visa ir intensyvumas neprarandamas

žadinimo–surinkimo sistema. Dažnai visa sistema apsiriboja klasikiniu fluorescencijos spektrometru bei papildomomis žadinimo–surinkimo sistemomis (2.42 pav.). Būtina visų optinių diagnostikos sistemų dalis yra šviesos šaltinis (L). Kadangi tokio tipo prietaisai yra plačiai taikomi, šiam tikslui naudojamos lempos. Dažniausiai tai yra ksenono lempos, užtikrinančios gerą fluorescencijos sužadinimą UV srityje. Lempos spinduliuotė yra fokusuojama į žadinimo monochromatoriaus (ŽM) įėjimo plyšį. Fokusuojimas užtikrina, kad beveik visa spinduliuotė praeis pro plyšį ir pateks į monochromatorių, t. y. nebus prarastas spinduliuotės intensyvumas (2.43 pav.).

Žadinimo monochromatoriuje šviesa krinta į difrakcinę gardelę (DG) ir yra išskaidoma į spektrą. Monochromatoriaus išėjime taip pat yra plyšys, vadinamas išėjimo plyšiu, pro kurį praeina tik siaura spektro dalis. Kuri spektro dalis pereis, galima pasirinkti sukant difrakcinę gardelę. Šiuolaikiniuose prietaisuose difrakcinę gardelę galima sukti didžiuliu tikslumu net iki 80 nm/s greičiu. Siekiant pakoreguoti skiriamąją gebą arba padidinti jautrumą, plyšių plotis gali būti keičiamas. Tad iš monochromatoriaus išėjusi šviesa yra fluorescencijos žadinimui reikiamo bangos ilgio. Vienas iš reikalavimų atliekant fluorescencinius matavimus yra žadinančiosios spinduliuotės pastovumas. Jei dėl kokių nors priežasčių per tyrimą šviesos intensyvumas svyruos arba pakis, tai atspindės ir fluorescencijos spektre, tačiau nustatyti, ar optinis signalas susilpnėjo dėl kokių nors audinio savybių, ar dėl prietaiso ypatybių, labai sunku. Todėl, prieš pasiekiant žadinančiąją spinduliuotę tiriamąją vietą, yra matuojamas jos intensyvumas. Tam reikalui naudojamas atraminis detektorius (AD). Siekiant išvengti pašalinės šviesos, kuri gali atsirasti monochromatoriuje dėl aukštesnės eilės difrakcijos, žadinančiosios spinduliuotės kelyje papildomai gali būti dedami filtrai (F). Kadangi pašalinė šviesa dažniausiai būna kitos spektrinės srities nei žadinančioji spinduliuotė, tai jos atskyrimui visiškai pakanka gana apytikrio spektrinės srities modifikavimo metodo. Taip pat, priklausomai nuo tyrimo tikslo, spinduliuotės kelyje gali būti dedamas poliarizatorius (P). Įprastiniuose spektrometruose žadinimo šviesa patenka į bandinių skyrelį, tačiau tokiu atveju galima atlikti tik *ex vivo* bandinių optinę biopsiją, todėl, kad būtų galima atlikti tyrimus *in vivo*, tokiuose prietaisuose būtina modifikuoti žadinimo–surinkimo sistemą. Dažniausiai tam yra naudojami šviesolaidiniai priedai (Š). Dėl to į bandinių skyrelį yra dedamas specialus priedas, kuris iš monochromatoriaus ateinančią spinduliuotę sufokusuoja į žadinimo šviesolaidį, o iš surinkimo šviesolaidžio ateinančią fluorescenciją perduoda į įprastą prietaiso detektavimo sistemą. Detektavimo sistema prasideda nuo fluorescencijos filtro (F), kuriuo atliekamas apytikris spinduliuotės spektrinės srities modifikavimas, bei surinkimo poliarizatoriaus – analizatoriaus (jei atliekami poliarizaciniai matavimai). Toliau spinduliuotė pro įėjimo plyšį patenka į emisijos monochromatorių (EM) (kaip ir žadinimo monochromatoriaus plyšio plotis gali būti keičiamas), kuriame surinkta spinduliuotė difrakcine gardele yra išskaidoma į spektrą. Iš emisijos monochromatoriaus spinduliuotė yra fokusuojama į išėjimo plyšį. Kuri spektrinė sritis išeis iš monochromatoriaus, taip pat yra parenkama sukant difrakcinę gardelę. Tokioje – monochromatoriaus – sistemoje vienu metu yra registruojamas tik vienos, labai siauros spektrinės srities intensyvumas, o norint sužadinti visą spektrą, reikia registruoti visų difrakcine gardele išskirtų spektrinių sričių intensyvumus.

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

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



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

Tam tikslui yra naudojamas modulinis spektrometras (2.44 pav.). Tai yra plačiausių galimybių pats sudėtingiausias spektrų registravimo įrenginys. Jei anksčiau aprašytame prietaise viskas yra surinkta viename korpuse, tai šiuo atveju kiekviena dalis, pavyzdžiui, lempa, monochromatorius ir t. t., yra atskiri moduliai. Visas prietaisas yra surenkamas iš tokių modulių. Natūralu, kad esant reikalui šiuos modulius galima lengvai keisti, tačiau modulinio spektrometro esmė ta, kad būtų galima sukonstruoti prietaisą sujungiant tiek modulių, kiek reikia, ir dirbant nebereiktų nieko keisti.

Svarbiausioji visų spektrometrų dalis yra šviesos šaltinis. Kad būtų galima atlikti įvairių tipų optinę biopsiją, reikalingas šviesos šaltinis, spinduliuojantis šviesą nuo ultravioletinės iki infraraudonosios spektrinės srities. Kadangi vieno šviesos šaltinio, kuris tolygiai spinduliuotų tokioje plačioje srityje, nėra, naudojamos kelių tipų lempos. Čia taip pat puikiai tinka ksenono lempa, kuri gali būti naudojama tiek UV, tiek VIS, tiek ir NIR spektrinei sričiai. Tam tikrais atvejais ksenono lempa gali būti naudojama netgi IR sričiai, tačiau jos emituojamas spektras nėra tolygus. IR sričiai labiau tinkamos kvarco–volframo halogeninės lempos. Abiejų tipų lempas galima prijungti prie spektrometro ir atliekant atitinkamą užduotį pasirinkti vienos arba kitos lempos spinduliuotę. Šios lempos – tai nuostoviosios optinės biopsijos šviesos šaltiniai. Taip pat galima prijungti ir šviesos šaltinius, skirtus optinei biopsijai su laikine skyra. Pirmiausia – tai impulsinė ksenono lempa, kurios impulso trukmė siekia kelias nanosekundes, tačiau tam tikrais atvejais tokia trukmė yra per ilga. Todėl papildomai reikia itin trumpų impulsų (kurių trukmė pikosekundžių eilės) šviesos šaltinių. Tam yra naudojami impulsiniai lazeriai, kurie taip pat yra prijungiami prie spektrometro per specialų lazerinės spinduliuotės įvadą. Tačiau, jei atliekant optinės biopsijos su laikine skyra tyrimus reikėtų pakeisti žadinimo bangos ilgį, reikėtų pakeisti lazerį. Ši procedūra yra labai paprasta ir užtrunka vos kelias minutes. Štai čia ir pasireiškia neginčijamas lempų privalumas – galimybė pasirinkti žadinimo bangos ilgį iš plataus jų emituojamo spektro. Visiems plataus spektro šviesos šaltiniams reikalinga spektrinės sudėties modifikavimo sistema. Taigi visos lempos yra jungiamos taip, kad padedant įvairioms optinėms sistemoms (lęšiams, veidrodžiams ir kt.) jų spinduliuotės būtų suvedamos į kitą modulį – monochromatorių. Svarbiausioji monochromatoriaus dalis, kuria šviesa yra išskaidoma į spektrą, yra difrakcinė gardelė, o pagrindinės monochromatorių apibūdinančios charakteristikos yra dispersija (arba išbarstymas), pralaidumo efektyvumas ir pašalinės šviesos kiekis. Moduliniame spektrometre monochromatorius yra kaip atskiras prietaisas, todėl juo šiuos reikalavimus galima išpildyti geriausiai. Dispersiją, arba kaip stipriai bus išskirtos šviesos spalvos, nulemia tiek pati gardelė, tiek monochromatoriaus matmenys. Kadangi tai yra atskiras modulis, jis gali būti daromas tiek mažas, tiek ir didelis. Pralaidumas

kiekvienam bangos ilgiui yra nevienodas, tai nulemia, kuriai spektrinei sričiai yra optimizuoti difrakcinės gardelės režiai. Taigi, dirbant skirtingose spektrinėse srityse (UV, VIS, NIR ar IR), reikėtų prietaiso su keliomis skirtingomis gardelėmis. Aptariamo prietaiso monochromatoriuje galima įmontuoti tris skirtingas gardeles ir vėliau pasirinkti tinkamą pagal spektrinę sritį, kurioje numatoma dirbti. Šitaip yra išlaikomas didelis monochromatoriaus pralaidumas plačiu spektriniu ruožu.

Paskutinis parametras, kuriuo apibūdinamas monochromatorius, yra šviesos kiekis už pasirinktos spektrinės srities (spalvos) ribų. Norint sumažinti pašalinės šviesos kiekį, reikėtų išskirtą tam tikros spalvos spinduliuotę dar kartą leisti per monochromatorių. Moduliniame spektrometre ir tai gali būti padaryta sujungiant du atskirus monochromatorius. Be to, monochromatoriai turi įėjimo ir išėjimo plyšius, kurių pločiai gali būti keičiami.

Kita modulinio spektrometro dalis – bandinių skyrius, kuris optinei biopsijai nėra svarbus, nes tyrimai atliekami tik su išpjautais bandiniais. Tačiau jame yra svarbūs kai kurie optiniai komponentai. Tai poliarizatorius, kuriuo yra poliarizuojama spinduliuotė, kai atliekami poliarizaciniai matavimai, ir intensyvumo reguliatorius, kuriuo galima keisti į audinį krintančios žadinančiosios spinduliuotės intensyvumą. Bandinių skyriuje taip pat yra įmontuotas spinduliuotės intensyvumo detektorius, kuris registruoja bet kokius žadinančiosios spinduliuotės svyravimus ir yra atitinkamai modifikuojamas fluorescencijos spektras. Kaip ir anksčiau aptartame prietaise, norint jį padaryti tinkamą optinei biopsijai, reikia modifikuoti žadinimo–surinkimo sistemą, taigi į bandinio vietą yra dedama speciali fokusavimo sistema, kuri spinduliuotę suveda į šviesolaidinę žadinimo–surinkimo sistemą. Bandinių skyriuje yra dar vienas įvadas šviesos šaltiniui, t. y. būdas aplenkiant monochromatorių. Jis yra skirtas lazeriniams šviesos šaltiniams, kurių spinduliuotė yra monochromatinė.

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

Taigi, norint atlikti optinę biopsiją tiek nuostoviąja spektroskopija, tiek su laikine skyra ir plačioje spektro srityje, reikia keturių detektorių. Jei yra pasirenkamas greitis detektorius, juo galima registruoti ir lėtus vyksmus, todėl dažnai pakanka tik dviejų

detektorių. Tačiau galima prijungti visus keturis detektorius ir neatliekant jokių pakeitimų prietaise registruoti įvairių tipų spektrus.

2.5.2 Šviesolaidinis optinės biopsijos prietaisas

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

specifiniai, nes jie sujungiami šviesolaidžiais. Aptarsime visas šviesolaidinio prietaiso dalis, pradėdami šviesos šaltiniu.

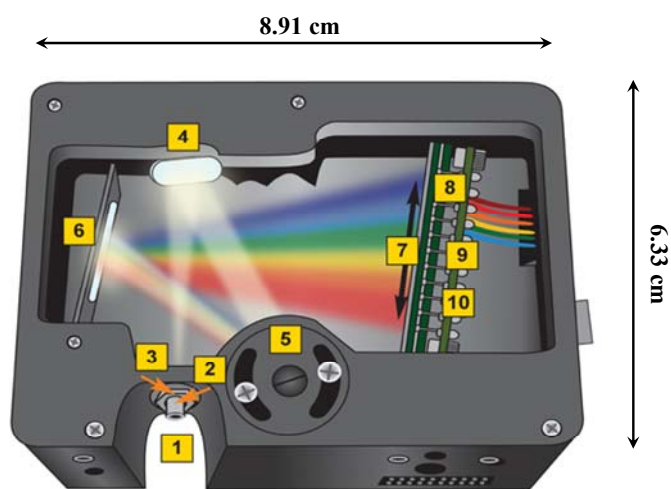
Dažniausiai fluorescencijos žadinimui yra naudojamas šviesą emituojantis diodas (LED). Jis yra įtvirtinamas specialiai parengtame korpuse, kuriame yra visi reikalingi optiniai ir mechaniniai elementai šviesolaidžio prijungimui prie šviesos šaltinio.



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

Paveiksle 2.45 pavaizduotas optinei biopsijai naudojamas šviesos šaltinis. Tai yra vieno bangos ilgio šviesos šaltinis, nors jo emituojamos spinduliuotės spektro plotis siekia 10–15 nm. Jo viduje įmontuotas 5 mm skersmens šviesos diodas, kurį galima pakeisti kito bangos ilgio šviesos diodu. Visi optinės biopsijos aparatūros elementai (šviesos šaltinis, spektrometras, spektrinės sudėties modifikavimo sistema) turi standartines jungtis, per kurias galima prijungti šviesolaidžius. Dažniausiai naudojama SMA 905 tipo jungtis. Prie šio šviesos šaltinio tiesiogiai jungiamas žadinimo šviesolaidis, kuriuo spinduliuotė nuvedama iki audinio. Kartais žadinančios spinduliuotės kelyje yra įmontuojama spektrinės sudėties modifikavimo sistema, užtikrinanti žadinančios spinduliuotės spektro siaurumą. Naudojant LED'us tai nėra būtina, nebent norima „nupjauti“ ilgabangį LED spinduliuojamos juostos kraštą, kad jis nepersidengtų audinio fluorescencijos juosta.

Fluorescencijos žadinimo–surinkimo sistemos pasirinkimas priklauso nuo tiriamos vietos bei keliamų tikslų. Dažniausiai tai būna bifurkacinė šviesolaidinė sistema su įvairių tipų antgaliais. Siekiant sumažinti šviesos intensyvumo nuostolius, šviesolaidinės žadinimo–surinkimo sistemos yra gaminamos su stacionariais antgaliais, todėl, norint atlikti kito tipo tyrimą, reikia keisti visą žadinimo–surinkimo sistemą (bifurkacinį šviesolaidį). Tam tikrais atvejais gali būti naudojami užmaunami vienkartiniai sterilūs (plastikiniai, stikliniai ir kt.) antgaliai. Audinio optinis atsakas – fluorescencija – surinkimo atšaka eina į detektorių. Čia būtinai yra reikalinga spinduliuotės spektrinės sudėties modifikavimo sistema, kurioje yra nufiltruojama žadinančioji spinduliuotė. Iš šios sistemos nufiltruotas optinis signalas eina į spektrų registravimo įrenginį. Šviesolaidiniame optinės biopsijos prietaise nėra spinduliuotės išskaidymo į spalvas įrenginio – monochromatoriaus, tačiau, norint užregistruoti spektrą, jis yra būtinas. Taigi, kaip tai atliekama? Šviesolaidiniame prietaise visi detektavimui reikalingi komponentai yra spektrų registravimo įrenginyje. Paveiksle 2.46 pavaizduotas USB2000+ (*Ocean Optics*) spektrų registravimo įrenginys. Spinduliuotė iš šviesolaidžio per SMA 905 jungtį (1) patenka į prietaisą. Šviesos srautas įėjime yra apribojamas specialaus plyšio (2), kurio plotis gali būti nuo kelių mikronų iki kelių šimtų mikronų. Nuo šio plyšio priklauso skiriamoji geba. Kuo siauresnis plyšys, tuo ji geresnė, tačiau tuo mažiau šviesos patenka į spektrų registravimo įrenginį, todėl mažėja prietaiso jautrumas. Daugeliu atvejų biologinio objekto fluorescencija yra silpna, todėl dažnai yra pasirenkamas didesnis plyšys (200–400 μm) sumažinant prietaiso skiriamąją gebą. Kartais, kai naudojami ploni šviesolaidžiai (200 μm), plyšio galima ir nemontuoti, mat paties šviesolaidžio skersmuo yra toks kaip plyšio plotis. Jeigu prietaisas bus naudojamas išskirtinai tik vienam tikslui, tada galima tiesiog į



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

įėjimą įtaisyti žadinančiosios spinduliuotės nepraleidžiantį fluorescencijos filtrą (3). Tokiu atveju fluorescencijos surinkimo atšakai bus nereikalinga spektrinės sudėties modifikavimo sistema. Toliau spinduliuotė besiskėsdama sklinda iki sferinio veidrodžio (4), kuris suformuoja lygiagretų pluoštą. Atspindėjusi (jau lygiagrečiu pluoštu) šviesa krinta į difrakcinę gardelę (5). Čia vyksta spinduliuotės

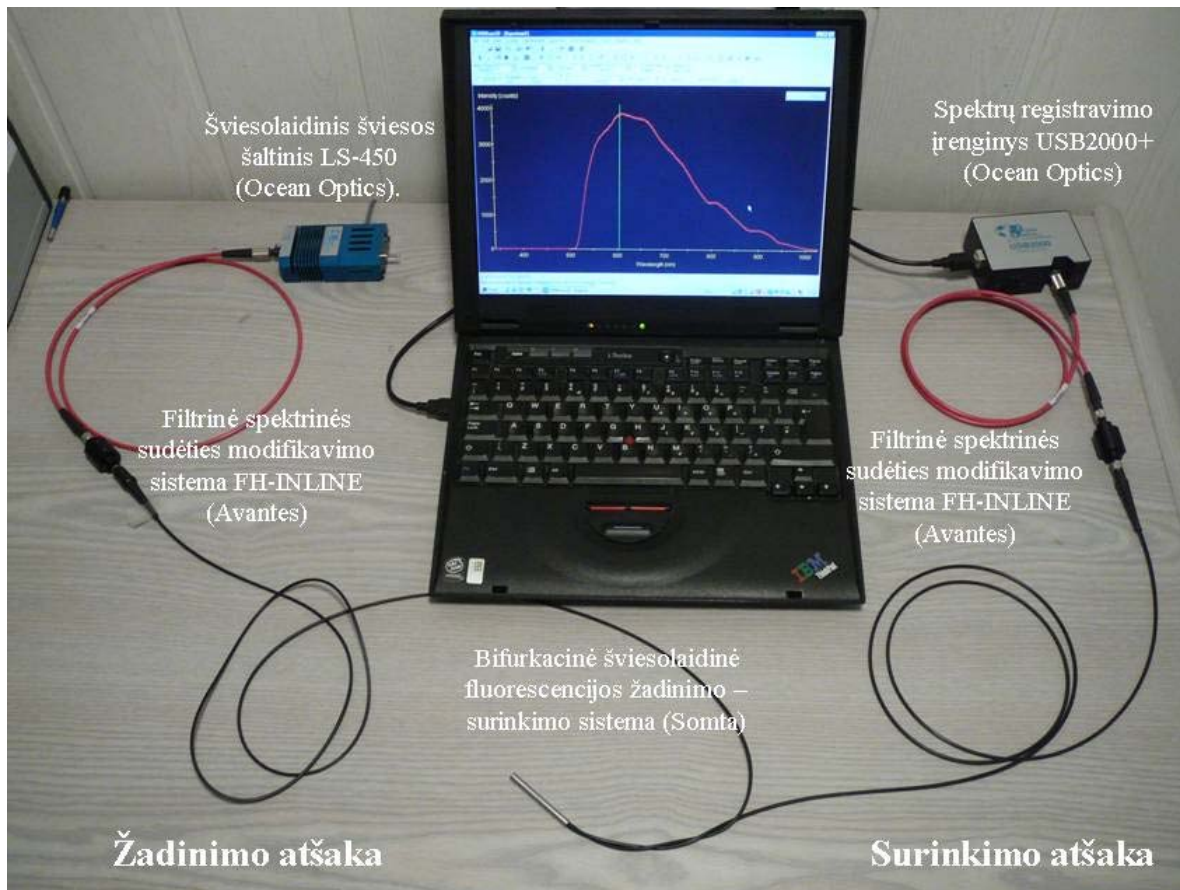
išskaidymas. Kaip minėta, difrakcinės gardelės paskirtis ir yra išskaidyti spinduliuotę į spalvas (bangos ilgius).

Renkantis spektrų registravimo įrenginį reikia nuspręsti, kurioje spektrinėje srityje bus registruojami spektrai, nes pagal tai reikia pasirinkti difrakcinę gardelę. Taip pat reikia pasirinkti ir režijų skaičių gardelėje, nes nuo to priklauso skiriamoji geba. Šiuo atveju didesnis režijų skaičius lems geresnę skiriamąją gebą, tačiau tokia gardele bus galima registruoti siauresnį bangos ilgių diapazoną. Pavyzdžiui, jei įėjime esame pasirinkę 200 μm pločio plyšį ir gardelę, kurioje yra 1200 režijų/mm, tai jos skiriamoji geba bus $\sim 1,5$ nm ir ja bus galima registruoti ~ 220 nm pločio spektrą (pavyzdžiui, nuo 400 nm iki 620 nm). Atitinkamai pasirinkus gardelę, kurioje yra 600 režijų/mm, turėsime ~ 4 nm skiriamąją gebą ir galėsime registruoti ~ 500 nm pločio spektrą. Difrakcinės gardelės į spalvas išskaidyta spinduliuotė toliau sklinda link veidrodžio (6) ir nuo jo atsispindėjusi krinta į detektorių (10) – CCD elementą. Šiuo atveju detektorių galima įsivaizduoti kaip daugybę mažų eilute išdėstytų detektoriukų. Viena CCD elemente gali būti 102, 256, 1024, 2048 arba 3648 registravimo elementai (detektoriukai). Išskleista spinduliuotė krinta ant visų registravimo elementų ir vienu metu yra užregistruojamas platus spektras. Taigi išryškėja dar vienas šviesolaidinės optinės biopsijos sistemos privalumas, palyginus ją su sudėtingais spinduliniais prietaisais, kuriuose vienu metu yra registruojamas tik vienas bangos ilgis. Šiuo atveju optinei biopsijai atlikti užtenka 1–3 sekundžių. Deja, jeigu tiriamoji vieta fluorescuoja labai silpnai, tokiais detektoriais dažniausiai nepavyksta užfiksuoti signalo. Registravimo elementų skaičius detektoriuje nulemia skiriamąją gebą. Kuo daugiau detektoriaus elementų, tuo geresnė skiriamoji geba, tačiau nukenčia jautrumas. Atitinkamai detektorius su mažesniu skaičiumi registravimo elementų pasižymi didesniu jautrumu ir prastesne skiriamąją geba. Tad renkantis prietaisą reikia nuspręsti, kurie prietaiso parametrai yra svarbesni. Kadangi patys registravimo elementai yra labai maži, tai tik dalis krintančios šviesos bus užregistruojama. Siekiant padidinti registravimo efektyvumą, priešais CCD elementą gali būti montuojamas specialus cilindrinis lęšis (7), kuris krintančią spinduliuotę sufokusuoja į registravimo elementą – taip yra užregistruojama beveik visa atėjusi spinduliuotė. Taip pat prieš detektorių gali būti montuojamas papildomas filtras (8), skirtas aukštesnių difrakcijos eilių šviesos, atsirandančios dėl difrakcinės gardelės ypatybių, eliminavimui. Aukštesnių difrakcijos eilių šviesa pasižymi tuo, kad antros eilės mėlyna spalva yra maždaug toje vietoje, kur pirmos eilės yra raudona spalva. Kadangi mus domina tik pirmos difrakcijos eilės šviesa, tai aukštesnių eilių šviesą reikia nufiltruoti.

Paskutinis parametras, kurį reikėtų apsvarstyti renkantis šviesolaidinės optinės biopsijos sistemos spektrų registravimo įrenginį, yra detektoriaus įėjimo langelis (9).

Skirtumas yra toks: jei spektrai bus registruojami, UV srityje yra naudojamas kvarcinis langelis, jei ne – paprasto stiklo.

Taigi nesudėtingiems optinės biopsijos taikymams labai patogi yra nedidelė, paprasta, mobili šviesolaidinė sistema (2.47 pav.). Tai ypač pravartu, kai reikia atlikti optinę biopsiją



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

nevaikščiojantiems arba sunkiai vaikščiojantiems pacientams. Turint tokį mobilų prietaisą, kuris nesunkiai gali būti nugabentas iš vienos vietos į kitą, smarkiai prasiplečia optinės biopsijos taikymo galimybės – ankstyvoji įtartinų vietų diagnostika gali būti atliekama net ir lankant pacientus namuose. Šviesolaidinė sistema taip pat labai patogi registruojant sensibilizuotąją fluorescenciją, kai registruojamo signalo intensyvumas yra gana didelis, tačiau kai, signalo intensyvumas yra labai mažas ir reikia itin jautrių detektorių, tenka grįžti prie sudėtingų stacionarių prietaisų.

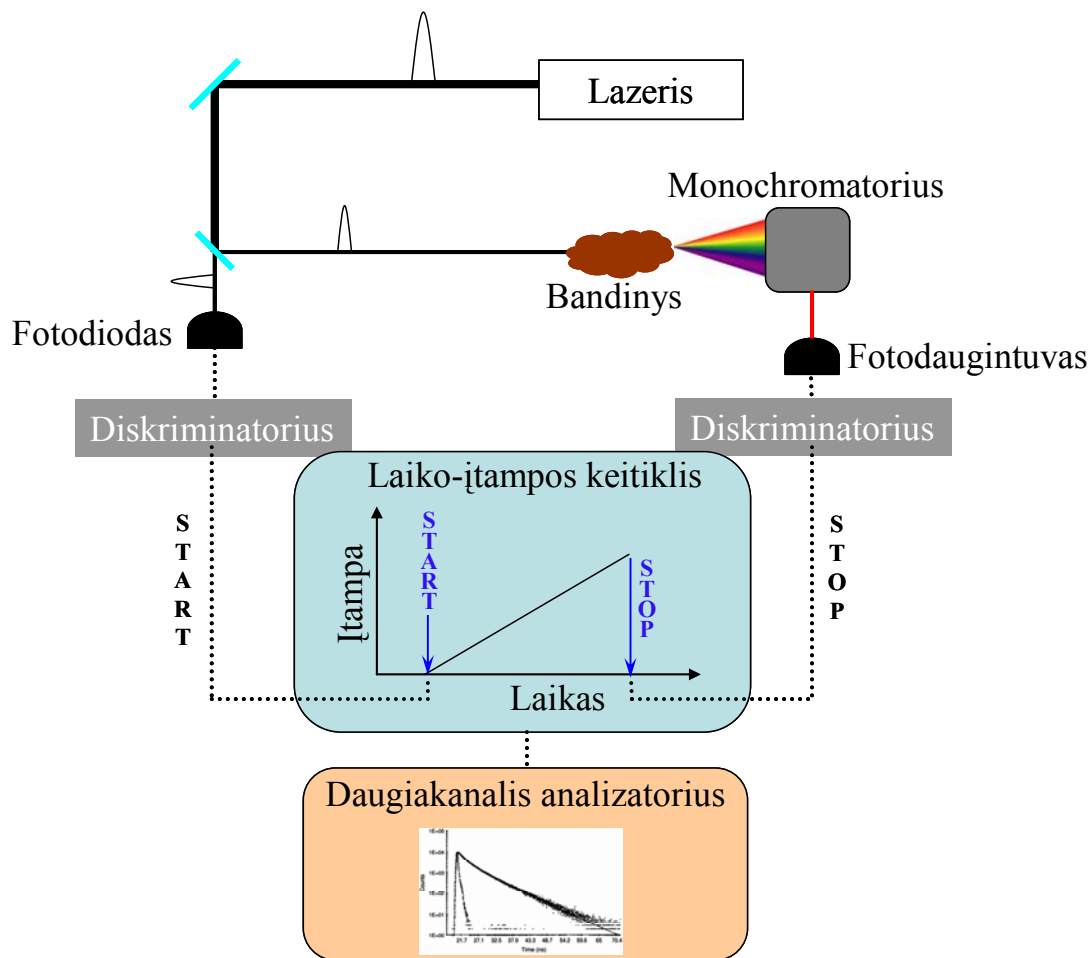
2.6. Optinė biopsija su laikine skiriamąja geba

Atskira optinės biopsijos sritis yra diagnostika su laikine skyra. Biologiniame objekte už optinį atsaką yra atsakingos kelios molekulės – fluoroforai, tad atskirti jas nuostoviosios

optinės biopsijos metodais yra labai sunku, nes jų fluorescencijos spektrai dengia vieni kitus. Tačiau kiekviena iš fluorescuojančių molekulių turi tik jai būdingą švytėjimo trukmę, t. y. viena molekulė gali fluorescuoti truputį ilgiau už kitą. Taigi, užregistravus bendrą švytėjimo trukmę, matematiniais metodais galima įvertinti, kiek skirtingų tipų molekulių (kiekvienas tipas turi būdingą švytėjimo trukmę) sukėlė fluorescencijos spektrą.

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

Šiuo metu fluorescencijos gyvavimo trukmių matavimams dažniausiai yra naudojami impulsiniai metodai. Iš visų impulsinių metodų plačiausiai taikomas per laiką koreliuotų pavienių fotonų skaičiavimas (angl. *time correlated single photon counting* TCSPC).



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

Aptarsime jį plačiau ir susipažinsime su fluorescencijos gyvavimo trukmių registravimo aparatūra. Principinė TCSPC schema pavaizduota 2.48 paveiksle. Tyrimas prasideda žadinimo impulso generavimu. Didelio pasikartojimo dažnio lazeris siunčia ultratrumpuosius impulsus į bandinį. Dalis lazerio impulso šviesos atskeliama pluošto dalikliu ir kreipiama į fotodiodą, kuris generuoja elektroninį impulsą. Šis impulsas toliau patenka į diskriminatorių, kuris iš diodo impulso generuoja skaitmeninį elektroninį impulsą, vadinamą „starto“ impulsu. „Starto“ impulsas patenka į vadinamąjį laiko–įtampos keitiklį ir jį paleidžia. Laiko–įtampos keitiklis yra prietaisas, išskiriantis įtampą, proporcingą laiko tarpui tarp dviejų elektroninių

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

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

TCSPC metodas – elektroninis metodas, taigi pagrindinis jo trūkumas – nelabai gera laikinė skyra. Pažymėkime, kad ją riboja ne detektorių (fotodiodo, fotodaugintuvo) atsako laikas: diskriminatoriai registruoja ne patį atsaką, bet generuoja sinchronizacijos impulsą tada, kai detektoriaus įtampa pasiekia tam tikrą procentą maksimalios įtampos. taigi, net jei diodo atsakas į lazerio impulsą užtrunka kelias mikrosekundes, jei tik jo forma tobulai pasikartoja tarp skirtingų impulsų, paklaidos nebus ir bus galima registruoti nanosekundžių ir pikosekundžių trukmės vyksmus. Paklaidas sąlygoja vadinamasis „tirtėjimo“ (angl. *jitter*) triukšmas, t. y. detektoriaus atsako formos kitimas nuo impulso iki impulso. Praktikoje TCSPC metodika leidžia pasiekti apie 50 ps laikinę skyrą. Kaip dar vieną trūkumą, galima paminėti tai, jog metodas yra iš esmės vienspalvis: vienu metu registruojamas fluorescencijos

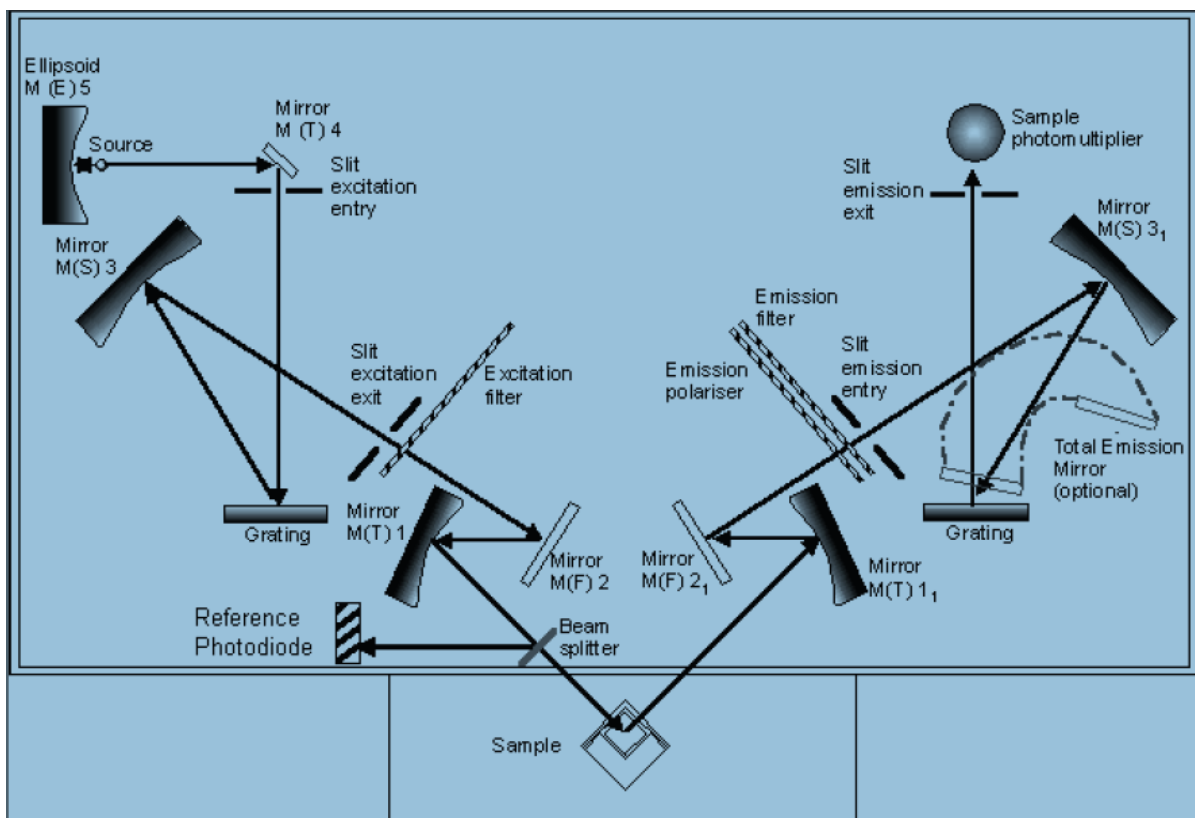
gesimas ties vienu bangos ilgiu, o norint registruoti platų spektrą, reikia matuoti daugelį bangos ilgių paeiliui.

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

3. METODINIS PRIEDAS

3.1. Fluorescencijos spektroskopijos principai

Fluorescencijos ir fluorescencijos žadinimo spektrų registravimui panaudojamas prietaisas Perkin Elmer LS 55. Jo principinė optinė schema atvaizduota 2.42 pav. ir 3.1 pav.



3.1 pav. Spektrofotometro LS 55 optinė schema (žr. 2.42 pav.)

Šviesos šaltinis - ksenono lempa, generuojanti intensyvius ir trumpus šviesos impulsus. Šviesa fokusuojama elipsoidiniu veidrodžiu M(E)5 ir toroidiniu veidrodžiu atspindima į sužadinančios šviesos monochromatoriaus įėjimo plyšį. Monochromatorius sudarytas iš įėjimo plyšio, gardelės (angl. *grating*), sferinio veidrodžio ir išėjimo plyšio. Pro monochromatoriaus išėjimo plyšį išeina beveik monochromatinė šviesa su gardelės apibrėžtu centriniu bangos ilgiu. Gardelės kampas valdomas žingsniniu varikliuku. Dauguma žadinančio spindulio toroidiniu veidrodžiu M(T)1 fokusuojama į mėginio vietą, tik maža dalis spindulio energijos dichroiniu veidrodžiu (angl. *beamsplitter*) atspindima į etaloninį (standartinį) (angl. *reference*) fotodiodą. Atsakymas koreguojamas etaloninio diodo pagal rodamino korekcinę kreivę, kuri įrašyta prietaiso atmintyje. Rodamino dažai sugeria energiją nuo 230 iki 630 nm ir išspinduliuoja apie 650 nm su beveik pastoviu kvantiniu efektyvumu.

Mėginio išspinduliuota energija yra fokusuojama toroidiniu veidrodžiu M(T)1₁ į emisijos monochromatoriaus įėjimo plyšį. Emisijos monochromatorių, kaip ir žadinančiosios šviesos monochromatorių, sudaro įėjimo plyšys, sferinis veidrodis M(S)3₁, gardelė ir išėjimo plyšys. Pro emisijos monochromatoriaus (taip pat kaip ir pro žadinimo šviesos

monochromatoriaus) išėjimo plyšį išeina beveik monochromatinė šviesa su gardelės apibrėžtu centriniu bangos ilgiu. Gardelės kampas valdomas žingsniniu varikliuku. Žadinimo ir emisijos monochromatoriai gali skenuoti savo srityse nepriklausomai, sinchroniškai ar tik pažymėtus taškus jų srityse.

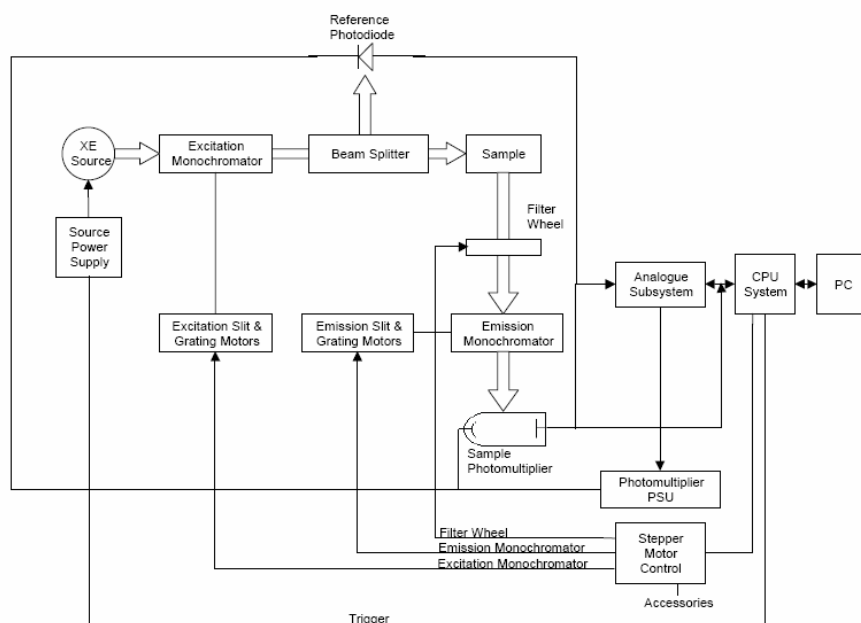
Sinchroniškai skenuoti galima pasirinkus bet kurį pastovų bangos ilgių skirtumą ar pastovų energijos skirtumą tarp žadinimo ir emisijos monochromatorių. Monochromatorių spektro sritis:

- Sužadinimo – nuo 200 nm iki 800 nm ir nulinė parinktis (angl. *order*);
- Emisijos – nuo 200 nm iki 900 nm ir nulinė parinktis. (Jautrios spektro srities viršutinė vertė padidinta nuo 650 nm iki 900 nm pakeitus standartinį fotodaugintuvą į labiau raudonoje srityje jautrų fotodaugintuvą R928)

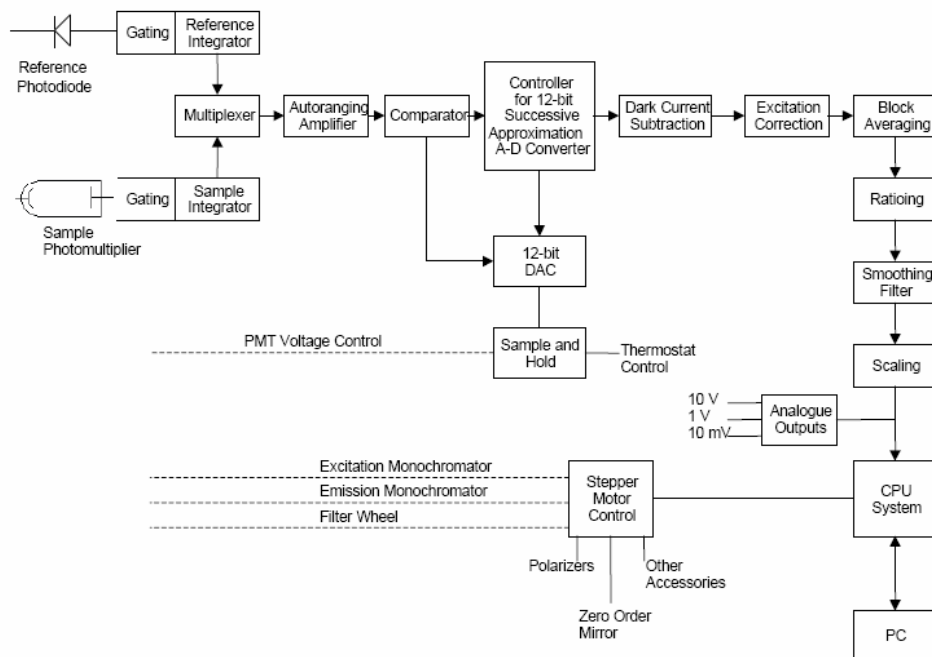
Pastaba: Ksenono šaltinių UV spinduliuotės išeiga greitai mažėja srityje < 230 nm. Nauji šaltiniai turi daugiau energijos šioje srityje.

Plyšio plotis gali būti keičiamas duodant skiriamąją gebą nuo 2,5 nm iki 15 nm sužadinimo monochromatoriui ir nuo 2,5 nm iki 20 nm emisijos monochromatoriui. Žingsnio ilgis 0,1 nm. Taip pat gali būti parinkta nulinė vertė tiek sužadinimo, tiek emisijos monochromatorių plyšiuose ir duoti skiriamąją gebą < 2 nm.

Elektronikos sistema ir signalo apdorojimas. Visi spektriniai duomenys fiksuojami fotodaugintuvu. Duomenų signalai prieš patekdami į kompiuterį pereina integravimą, konvertavimą, vidurkinimą, skaitmenį filtrą ir normavimą. Duomenų signalų kelias per LS 55 parodytas elektroninėje schemoje ir signalo apdorojimo schemoje.



3.2 pav. Spektrofotometro elektronikos schema



3.3 pav. Spektrofotometro signalo apdorojimo schema

Instrumento darbo režimai

Fluorescencija

Kai prietaisas dirba fluorescencijos režime, kiekvienas duomenų rinkinio ciklas integruojamas keturis kartus: du kartus emisijos kanale ir du kartus žadinimo kanale. Integravimas atliekamas pastovų laiko tarpą, atsižvelgiant į paskutinį šaltinio blyksnį. Šaltinio spinduliuotės piko plotis mažiau nei 10 μ s, o integravimas trunka 80 μ s, kad būtų surinktas visas signalas. Efektinė tamsinė srovė (kuriamas signalas, kai į fotodaugintuvą nepatenka šviesa) yra pašalinama trumpam uždariant abu kanalus prieš kitą šviesos blyksnį. Tamsinės srovės signalas yra atimamas iš pagrindinio fluorescencijos signalo.

Fosforescencija

Kada prietaisas dirba fosforescencijos režime, emisijos integravimo laikas nėra fiksuotas ir yra nustatomas vartotojo. Integravimas gali būti atidėtas iki 9 s po šviesos blyksnio. Tai vėlinimo ar užlaikymo(delay) trukmė. Rinkimo (gate) trukmė – trukmė, per kurią atliekamas integravimas – gali būti keičiama nuo 0,01 ms iki 500 ms. Jei užlaikymo ir rinkimo trukmė viršija 13 ms, ciklo trukmė turi būti padidinta, kad leistų ilgesnį duomenų sekos periodą.

Šaltinis gali pulsuoti nuo 1 iki 10 kartų, optimizuojant mėginio sužadimą ir duomenų seką. Sužadinant impulsas visada būna duomenų sekos ciklo pradžioje. Rinkimo ir

užlaikymo trukmės yra matuojamos nuo paskutinio impulso pradžios sužadinto impulso voroje. Inicijuojant fosforescencijos matavimus, tamsinė srovė yra pamatuota, jos vertė išsaugota ir atimama iš visų mėginio signalų.

Chemi- ir Bio-liuminescencija

Prietaisui dirbant chemi- ar bio-liuminescencijos režime, šviesos šaltinis yra išjungtas. Iš mėginio ateinančią šviesą fiksuoja fotodaugintuvas. Integravimo laiko intervalas yra toks pat kaip fosforescencijos režime, bet signalas nėra normuojamas. Inicijuojant fosforescencijos matavimus, tamsinė srovė yra pamatuota, jos vertė išsaugota ir atimama iš visų mėginio signalų.

Signalų konversija

Po integravimo fotodaugintuvo signalai yra sutankinami, paduodami į stiprintuvą (auto-ranging amplifier) ir 12-bitų nuoseklos aproksimacijos analoginį skaitmeninį (A-D) konverterį. Stiprintuvas sustiprina signalą ir taip optimizuoja A-D konversiją. Konversija gaunama naudojant 12 bitų DAC (digital to analogue) keitiklį ir palyginimo bloką, kur 12 bitų žodis yra nuosekliai aproksimuojamas į analoginį signalą su valdoma kilpa prižiūrėta borto mikroprocesorių. Tamsinė srovė yra skaitmeniškai atimama iš etaloninio signalo ir taip pat iš mėginio signalo, kad duotų tikrą nulį.

DAC taip pat naudojimas valdyti analogines išeigas, kaip diagramų išsaugojimo įtaisas ir kitiems priedams.

Bloko vidurkinimas

Skenuojant, signalas iš duomenų sekos ciklo yra vidurkinamas. Vidurkinimo laipsnis priklauso nuo skenavimo greičio pasirinkimo ir duomenų intervalo. Jei duomenų sekos skaičius nėra sveikas, tada bloko vidurkio verte imamas mažesnis sveikas skaičius. Su 0,5 nm pagrindiniu duomenų intervalu, duomenų sekos skaičius, kuris yra suvidurkintas esant įvairiems skenavimo greičiams, yra parodytas žemiau esančioje lentelėje.

Scan Speed nm/min	Block Average Width (50 Hz)	Block Average Width (60 Hz)
30	50	60
120	12	15
480	3	3
1500	1	1

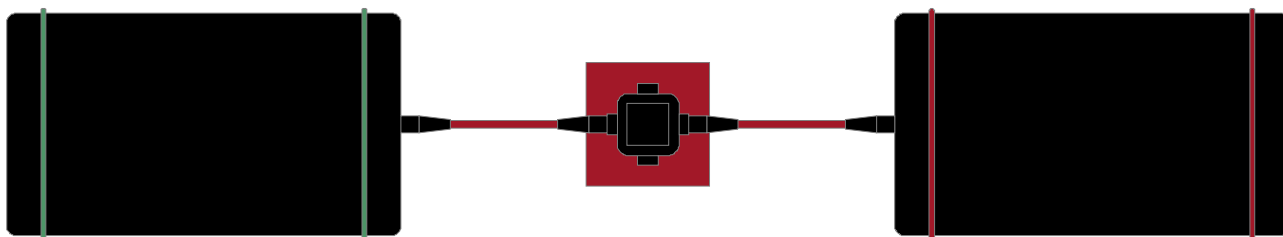
Laiko valdymas

Laiko valdymo režime bloko vidurkinimų suma yra tiksliai apibrėžta laiko vertės. Bloko vidurkių suma yra suderinta sukurti 2% ir 98% reakcijos signalus per apibrėžtą reakcijos laiką. Pagrindinis reakcijos laikas yra 0,5 sekundės.

Normavimas ir pataisos

Kai mėginio ir standartinis kanalai atlieka bloko vidurkinimą, tada jie normuojami, kad išskirti signalą iš triukšmų ir pašalinti šaltinio artefaktus. Tada normuotas signalas, pagal pasirinkimą, išvedamas į bangos ilgio ar laiko skalę, gaunant tinkamą atsakymą. Rezultatas sudauginamas su rodamino korekcine kreive, kuri išsaugota prietaise, pataisant iš fotodaugintuvo gautą kreivę.

3.2. Sugerties spektroskopijos principai



3.4 pav. Sugerties matavimo schema

Darbas su spektrometru

Įvairiems spektriniams matavimams laboratorijoje naudojama eksperimentinė schema susideda iš šių komponentų:

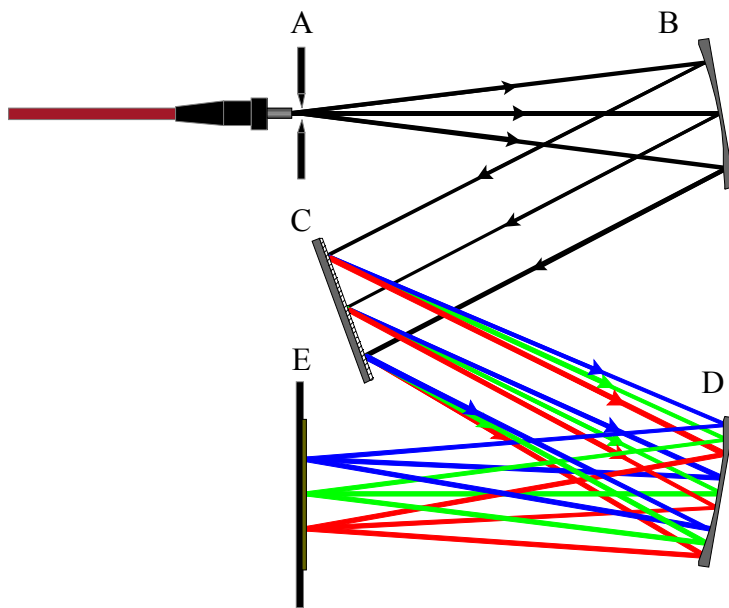
- Šviesolaidinio spektrometro
- Šviesolaidinio šviesos šaltinio
- Keturių langelių kiuvečių laikiklio
- Jungiamųjų šviesolaidžių

Šia sistema, atlikus nedidelius pakeitimus, galima atlikti sugerties, fluorescencijos ir deguonies koncentracijos matavimus. 3.4 pav. pateikta paprasčiausia sugerties matavimo schema.

Schemas komponentų funkcijos ir veikimo principai

Panagrinėsime sistemos komponentus detaliau.

Šviesolaidinis spektrometras Avantes AvaSpec-3648



3.5 pav. Czerny-Turner monochromatoriaus optinė schema

Eksperimente naudojamo šviesolaidinio spektrometro optinė schema yra Cherny-Turner tipo (3.5 pav.). Ji veikia šitaip: šviesa šviesolaidžiu pro įėjimo plyšį (A) patenka į spektrometrą. Pirmasis kolimuojantis sferinis veidrodis (B) patekusią šviesą kolimuoja ir nukreipia į difrakcinę gardelę (C). Nuo jos skirtingų bangos ilgių šviesa atsispindi skirtingais kampais. Šią šviesą antrasis kolimuojantis sferinis veidrodis (D) nukreipia ir fokusuoja į detektorių (CCD ar diodų liniuotę) (E), kuria spektras yra registruojamas ir perduodamas į kompiuterį USB 2.0 sąsaja vaizdavimui ar apdorojimui. Keičiant įėjimo plyšio (A) plotį galima parinkti į spektrometrą patenkančios šviesos kiekį, t.y. valdyti gaunamo spektro intensyvumą. Kampas, kuriuo atspindi gardelė, bei jos konstanta nustato vidutinį bangos ilgį ir spektrinio lango plotį. Gardelės konstanta bei įėjimo plyšio plotis taip pat sąlygoja prietaiso skyrą: juo mažesnis plyšys ir didesnė gardelės konstanta, tuo geresnė prietaiso skyra, tačiau siauresnis spektrinis langas ir mažesnė spektro integralinė galia. Eksperimente naudojamo spektrometro plyšių pločiai, gardelė ir jos posūkio kampas yra parinkti gaminant spektrometrą ir vartotojo nekeičiami. Tokio tipo spektrometrinio įrenginio jautrumas yra ribojamas kelių faktorių. Visų pirma, bet koki reali optinė sistema turi ydų. Jautrumą daugiausiai riboja foninė šviesa. Skiriamos kelios jos atsiradimo priežastys: aplinkos apšvieta, nuo optinių ar mechaninių elementų nepageidaujama kryptimi atsispindėjusi ar išsklaidyta šviesa bei aukštesnių eilių spektrai. Pirmoji priežastis nesunkiai pašalinama spektrometrą patalpinant šviesai nelaidžioje dėžėje. Trečioji priežastis tampa svarbi tada, kai spektrinio lango plotis pakankamai didelis. Jos sprendimo būdai yra keli – galima riboti spektrinio lango plotį arba, jeigu reikia pastarojo reikia plataus, prieš detektorių optiniame kelyje pastatyti aukštesnių (paprastai pakanka

antros) eilių spektrų filtrus. Antroji problema sudėtingiausia ir ją galima spręsti tik tobulinant optinių ir mechaninių elementų gamybos ir mazgų surinkimo technologiją. Klasikiniuose monochromatoriuose (2 pav. pateiktoji schema būtų klasikinė, jeigu vietoj detektoriaus (E) būtų išėjimo plyšys) su šia priežastimi kovojama nuosekliai sujungiant kelis monochromatorius. Šiuolaikiniams spektriniams matavimams tokia schema yra gana brangi – visų elementų reikia turėti po du. Avantes spektrometrai visi yra uždaro tipo, o eksperimente naudojamame yra ir antros eilės spektro filtras.

Kadangi spektro registravimui naudojame elektroninę sistemą, reikia atsižvelgti ir į jos sukkeliamus triukšmus bei signalo diskriminavimo paklaidas. Reikšmingi triukšmų šaltiniai yra keli: šiluminiai triukšmai bei skaitymo triukšmai (labiau pasireiškia kai detektorius yra CCD liniuotė). Šiluminių triukšmų priežastis, suprantama, yra aukštesnė už absoliutųjį nulį temperatūra. Gana efektyvus būdas jiems sumažinti yra detektoriaus šaldymas termoelektroniniu elementu ar suskystintomis dujomis. Šios galimybės eksperimente naudojamas šviesolaidinis spektrometras neturi. Skaitymo triukšmai iš esmės yra neišsprendžiama problema, tačiau naudojant ypač aukštos kokybės elektroniką ir mažinant skaitymo dažnį galima pasiekti, jog šios rūšies triukšmai būtų ne pagrindinis elektronikos paklaidos šaltinis. Praktikoje su triukšmais paprastai susidorojama statistiškai apdorojant duomenis – tiek šiluminės tiek elektroninės kilmės triukšmai galima sakyti yra atsitiktinio pobūdžio lyginant su signalu, taigi sukaupus daug to paties proceso matavimų, juos statistiškai apdorojus galima gauti pakankamai gerą signalo/triukšmo santykį turintį rezultatą. 3.1 lentelėje pateikti pagrindiniai šviesolaidinio spektrometro Avantes AvaSpec-3648 parametrai.

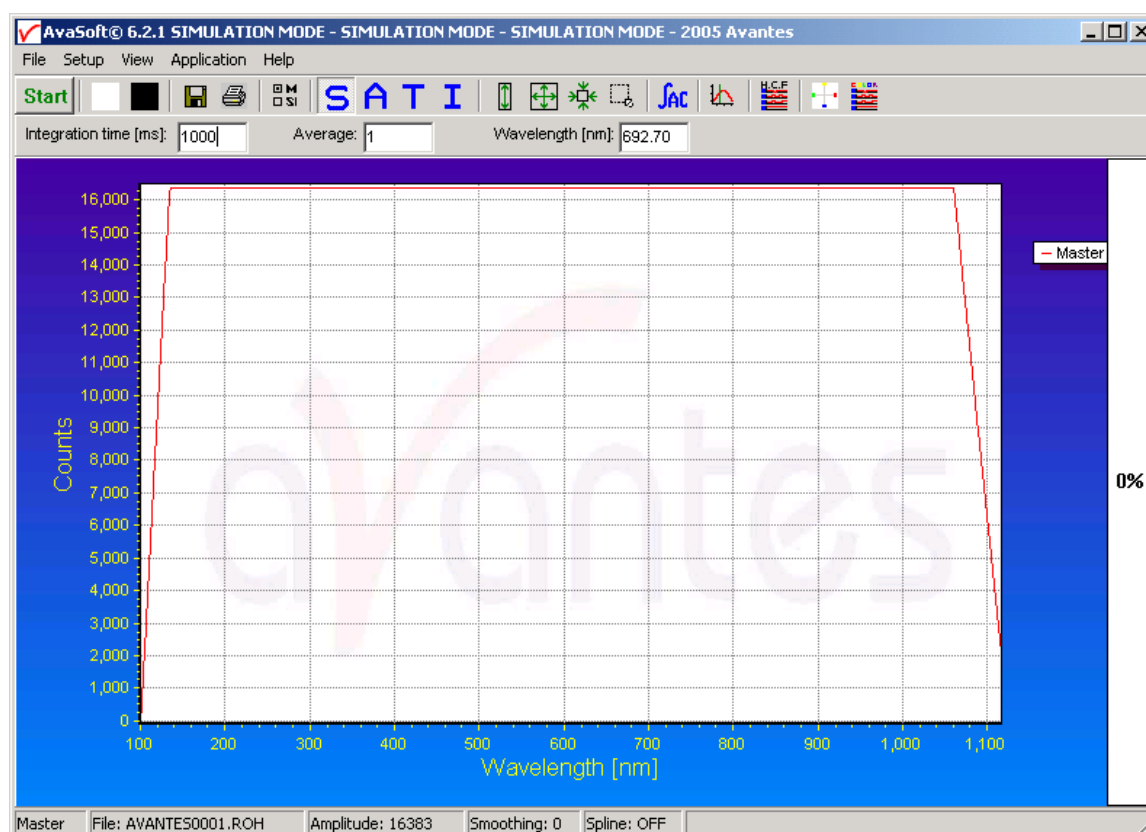
3.1 lentelė. Pagrindiniai šviesolaidinio spektrometro AvaSpec-3648 parametrai

Optinė schema	Simetrinė Czerny-Turner, optinio kelio ilgis 75 mm
Spektrinis langas	200 – 1100 nm
Skyra	
Foninė apšvieta	< 0.1 %
Jautrumas (naudojant AvaLight-HAL ir 8 μm šviesolaidį)	14000 s.v./μW (integravimo laikas 1 ms)
Detektorius	CCD liniuotė, 3648 vaizdo elementai
Signalų ir triukšmo santykis	350:1

AD keitiklis	16 bitų, 1 Mhz taktinio dažnio
Galima integravimo trukmė	10 μ s .. 10 min
Spektrų registravimo sparta su vidurkinimu	3,7 ms vienam matavimui

Darbas su spektrometru

Spektriniai matavimai atliekami programa *AvaSoft*. Jos nuoroda yra ant darbalaukio ir paleidimo meniu. Paleidę programą turėtumėte matyti šitokį vaizdą:



3.5 pav. Pradinis AvaSoft programos lango vaizdas

Vartotojo sąsają sudaro šie elementai: meniu juosta, įrankių juosta, nustatymų juosta, informacijos juosta ir matavimo rezultatų langas.

Matavimo režimai



3.6 pav. Režimo parinkimo mygtukai

Yra keturi matavimo režimai (3.6 pav.):

- Paprasto vaizdavimo (**Scope**)
- Sugerties (**Absorbtion**)
- Pralaidumo (**Transmittance**)

- Spinduliavimo (**Irradiance**)

Eksperimente ketvirtas režimas nebus naudojamas.

Matavimo režimai parenkami įrankių juostoje arba iš **View** meniu.

Integravimo trukmė ir vidutinio spektro matavimas

Skyriuje apie spektrometrą buvo užsiminta apie įėjimo plyšio įtaką integraliniam spektro intensyvumui. Kadangi šio spektrometro įėjimo plyšio plotis yra nekeičiamas, reikiamas signalo intensyvumas pasiekiamas integruojant. Integravimo trukmė milisekundėmis įrašoma nustatymų juostos skiltyje **Integration time [ms]**:. Šį parametą galima keisti tik sustabdžius spektro matavimą (įrankių juostoje turi būti žalias užrašas **Start**). Patarimas: jei integruojama pakankamai ilgai, **View** meniu patogų pažymėti **Progress Bar Enable** – galėsite matyti kokia sparta vyksta matavimas ir kiek jo dar liko.

Vidutinio spektro matavimas yra naudinga programos funkcija, statistinėmis priemonėmis leidžianti išskirti signalą iš triukšmo. Visada prieš matuodami atraminius spektrus arba prieš darydami kiekybines išvadas suskačiuokite kelių ar keliolikos spektrų vidutinę vertę.

Paprasčiausias matavimas ir tamsos spektras

Paprasto vaizdavimo režimas pateikia niekaip neapdorotus spektrus, sudėtingesni spektrai paprastai gaunami iš kelių tokiu būdu pamatuotų spektrų.

Pamatuokime taip vadinamą „tamsos“ spektrą. Į šį spektrą įeina įvairi pašalinė apšvieta, nesusijusi su tiriamu procesu. Tamsos spektras matuojamas surinkus eksperimentinę schemą bei sujungus visus šviesolaidžius – lygiai tomis pačiomis sąlygomis, kuriomis bus vykdomas eksperimentas. Pakeitus eksperimento schemą, šviesos šaltinį, kokį nors optinį elementą, bandinį ar integravimo trukmę, tamsos spektras matuojamas iš naujo. Turėdami tamsos spektrą galite kaskart matuodami jį atimti iš gaunamo spektro ir taip rezultatuose neatsižvelgti į parazitinę šviesą.

Matavimas vykdomas šitaip:

1. Surinkite eksperimentinę schemą
2. Įjunkite **Scope** režimą
3. Nustatymų juostoje įrašykite reikiamas integravimo ir vidurkinimo (pvz. 5) vertes.
4. Pamatuokite spektrą spausdami **Start**. Rezultatas turėtų būti nedidelio intensyvumo (ne daugiau 100 s.v.), išreikštų maksimumų neturintis spektras.
5. Rodomas spektras išsaugomas kaip tamsos keliais būdais:
 - a. Meniu juostoje parenkant **File > Save > Dark**

b. Nuspaudžiant įrankių juostoje juodą kvadratą (**Save Dark** (3.7 pav.))

c.



3.7 pav. Tamsos spektro nustatymo mygtukas

6. Norėdami nustatyti, jog kaskart matuojant išsaugotasis spektras būtų atimamas, parinkite meniu juostoje **Setup > Subtract Saved Dark**

Sugerties spektro matavimas

Sugerties spektras yra šviesos šaltinio spektro ir registruojamo spektro skirtumas. *AvaSoft* programoje šiam tikslui yra specialus režimas – Sugerties (**Absorbance**).

Matavimas vykdomas šitaip:

1. Surinkite sugerties matavimo eksperimentinę schemą (3.1 pav.). Į kiuvetės laikiklį įdėkite iš tokios pat medžiagos pagamintą ir to paties tirpiklio pripildytą kiuvetę, kaip ir bandinio.
2. Įjunkite **Scope** režimą, paleiskite matavimą
3. Įjunkite šviesos šaltinį
4. Parinkite tokią integravimo trukmę, kad maksimali intensyvumo vertė būtų apie 16000 s.v., tačiau detektorius nebūtų persotintas, kaip vaizduojama (3.5 pav.).
5. Vidurkinimo vertę parinkite pagal tai, kiek spektras triukšmingas.
6. Išjunkite šviesos šaltinį ir pamatuokite tamsos spektrą. Nustatykite jo kompensavimą.
7. Įjunkite šviesos šaltinį ir pamatuokite spektrą. Gautasis spektras yra vadinamas atraminiu.
8. Rodomas spektras išsaugomas kaip atraminis keliais būdais:
 - a. Meniu juostoje parenkant **File > Save > Dark**
 - b. Nuspaudžiant įrankių juostoje baltą kvadratą (**Save Reference** (3.7 pav.))
9. Įdėkite bandinį į laikiklį
10. Įjunkite **Absorption** režimą
11. Dabar galite matuoti bandinio sugerties spektrus. Atminkite, jog pakeitę integravimo laiką turite iš naujo išmatuoti tamsos ir atraminius spektrus, tačiau galite keisti bandinius, jei jie ištirpę tame pačiame tirpiklyje ir įpilti į to paties tipo kiuvetes.