

Laboratorinis darbas

Audinių fluorescencinių savybių tyrimas

2008
Vilnius

Audinių fluorescencinių savybių tyrimas

1. Darbo tikslas.

Fluorescenciniais metodais ištirti biologinių audinių fluoroforinę sudėtį bei nustatyti žadinimo bangos ilgį taikytinus audinių optinei diagnostikai.

2. Darbo uždaviniai.

1. Užregistruoti eksperimentinio gyvūno (žiurkės) įvairių organų fluorescencijos žadinimo bei fluorescencijos spektrus.
2. Užregistravus fluorescencijos žadinimo bei fluorescencijos spektrus sudaryti žadinimo – emisijos matricas kiekvienam organui.
3. Pagal žadinimo - emisijos matricas sugrupuoti audinius, kurių žadinimo - emisijos sritys yra panašios ir nustatyti šių grupių pagrindinius fluoroforus.
4. Remiantis nustatytais žadinimo bangos ilgiais užregistruoti keleto skirtingų biologinių objektų fluorescencijos spektrus *in vivo*.
5. Palyginti skirtingų objektų fluorescencijos spektrus išmatuotus *in vivo* ir paaikškinti stebimus skirtumus. Taip pat palyginti su spektrais išmatuotais *ex vivo*.

3. Teorinė dalis.

I. Fluorescencija

Pastaruoju metu, sparčiai besivystant naujoms technologijoms, vis dažniau diagnostikai bei gydymui yra taikomi optiniai metodai. Jų privalumas tas, kad jie yra neinvaziniai, taigi ir neskausmingi, be to, tyrimas atliekamas labai greitai ir informacija gaunama nedelsiant. Dėl savo potencialo

diagnozuojant įvairius susirgimus optiniai metodai yra pristatomi kaip optinė biopsija. Plačiausiai biologinių objektų optinių savybių ir juos sudarančių biomolekulių ar juose vykstančių metabolinių vyksmų bei audinių morfologinių pakitimų tyrimui naudojamas metodas yra fluorescencinė spektroskopija. Biologiniam audiniui būdinga savitoji (auto) fluorescencija, kurią sąlygoja jame esantys natūralūs chromoforai. Daugumos endogeninių fluoroforų fluorescencija yra susijusi su struktūrine audinių matrica ir biologiniame objekte vykstančiais metaboliniais vyksmais, todėl savitoji audinių fluorescencija gali atspindėti tiek ligos pažeistą audinį, tiek išryškinti audinio morfologinius ar metabolinius specifiskumus, kurie sunkiai detektuojami kitais būdais.

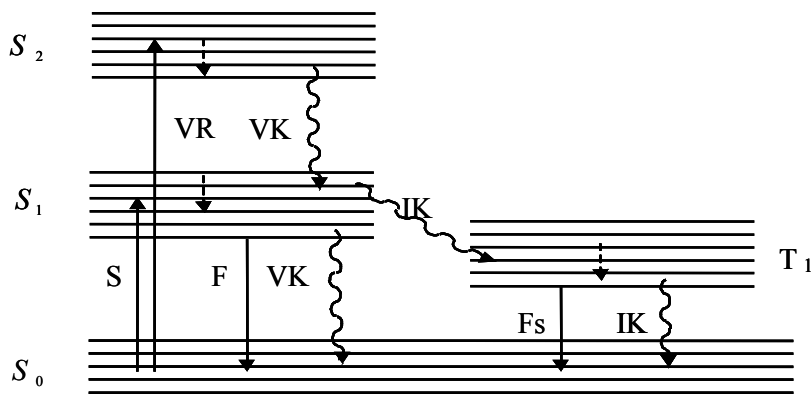
Fluorescencija yra vienas iš atskirų liuminescencijos atvejų. Pagal dalelių sužadinimo pobūdį liuminescencija būna kelių rūšių:

- fotoluminescencija – medžiaga švyti sugėrusi ultravioletinę ar regimąją spinduliuotę;
- chemiluminescencija – kai švytėjimą sukelia savitos cheminės reakcijos;
- rentgenoluminescencija – švytėjimas sugėrus rentgeno spinduliuotę;
- elektroluminescencija – sužadinama stipriu elektriniu lauku.

Pagal švytėjimo trukmę liuminescencija skirstoma į fluorescenciją bei fosforescenciją. Tiek fluorescencija, tiek ir fosforescencija pašalinus sužadinančiąją šviesą išnyksta ne akimirksniu, bet trunka ilgesnį arba trumpesnį laiką. Laikas, per kurį švytėjimas susilpnėja e kartų, vadinamas švytėjimo trukme. Fluorescencijos trukmė yra apie 10^{-9} - 10^{-8} s, o fosforescencija trunka nuo 10^{-6} iki 1s. Abu šie reiškiniai aiškinami molekulos relaksacija iš sužadinto singuletinio ir tripletinio lygmenų.

Molekulė, sugėrusi šviesos kvantą, tampa sužadinta – išorinės orbitalės elektronas peršoka į vieną iš laisvų molekulos elektroninių lygmenų. Tokia molekulos būseną yra nestabili, todėl per labai trumpą laiką ji grįžta į pagrindinę būseną, perteklinę energiją atiduodama aplinkinėms molekulėms, transformuodama ją į savo atomų virpesinę ir rotacinę energiją, arba

išspinduliuodama energiją šviesos kvanto pavidalu, t.y. liuminescuodama. Relaksacija iš aukštesnių sužadintų būsenų vyksta pakopomis (1 pav.).



(S – sugertis, F – fluorescencija, VR – virpesinė relaksacija, VK – vidinė konversija, IK – interkombinacinė konversija, Fs – fosforescencija)

1 pav. Molekulės energijos lygmenų diagrama.

Pradžioje sužadintos molekulės nespinduliniu keliu per $\sim 10^{-13}$ s relaksuoja į pirmo sužadinto elektroninio lygmens nulinį virpesinį polygmenį. Toks nespindulinis šuolis tarp elektroninių lygmenų vadinamas vidine konversija. Iš žemiausio sužadinto energinio lygmens S_1 galimi trys relaksacijos vyksmai: vidinė konversija iš $S_1 \rightarrow S_0$ (energija atiduodama aplinkai), interkombinacinė konversija $S_1 \rightarrow T_1$ (pakinta būsena – iš singlito į tripletą) ir fluorescencija – molekulės grįžimas į pagrindinę būseną išspinduliuojant fotoną. Šių vyksmų tikimybės priklauso nuo molekulės simetrijos ir taip pat nuo S_1 ir S_0 lygmenų energijų skirtumo. Kuo ΔE didesnis, tuo vidinės konversijos $S_1 \rightarrow S_0$ tikimybė mažesnė, o fluorescencijos tikimybė didesnė. Taigi fluorescencijos tikimybė (tuo pačiu ir kvantinis našumas) priklauso nuo konkuruojančių vyksmų, kurie mažina sužadintojo S_1 lygmens užpildą.

Bet kuri fluorescuojanti molekulė pasižymi tik jai būdingu spektru, kurio forma nepriklauso nuo žadinančios bangos ilgio. Kaip taisyklė, molekulė fluorescuoja iš žemiausio virpesinio pirmosios sužadintos elektroninės S_1

būsenos lygmenis. Iš aukštesniųjų elektroninių lygmenų paprastai vyksta tik nespinduliniai šuoliai.

Dėl šiluminių energijos nuostolių, atsirandančių vidinės konversijos metu, fluorescencijos spektras pasislenka į raudonąją pusę sugerties spektro atžvilgiu, tačiau fluorescencijos juosta dalinai persikloja su sugerties juosta. Tai sritis, kurioje molekulė išspinduliuoja didesnės energijos kvantą nei sugėrė. Pagal energijos tvermės dėsnį taip gali atsitikti tik tada, kai trūkstamą energijos dalį molekulė kompensuoja virpesinės energijos sąskaita.

Kiekvienas daugiaatomių molekulių elektroninis energijos lygmuo turi daug virpesinių, rotacinių polygmenų. Spinduliniai šuoliai galimi iš S_1 sužadinto elektroninio lygmens žemiausio virpesinio polygmens į pagrindinio S_0 lygmens skirtingus virpesinius polygmenis. Šių šuolių energija skiriasi, todėl fluorescencijos spektrų juostos yra išplitusios.

Sugertos energijos kiekis pagal Lamberto – Bugero – Bero dėsnį lygus:

$$I = I_0 10^{-\varepsilon c l} \quad (1)$$

čia $\varepsilon c l = D$ – bandinio optinis tankis.

Iš viso sugerto šviesos kiekio, fotonų dalis, priklausanti nuo fluorescencijos kvantinio našumo φ , bus išspinduliuota įvairaus bangos ilgio bangų pavidalu įvairiomis kryptimis. Šviesos filtrais arba monochromatoriumi galima išskirti gerokai siauresnės spektrinės srities šviesą, kuri gali būti registruojama kaip fluorescencijos intensyvumas:

$$I_{fl} = K \varphi I_0 (1 - 10^{-\varepsilon c l}) \quad (2)$$

I_{fl} proporcingas žadinančios spinduliuotės intensyvumui I_0 , kvantiniam našumui φ , sugerties koeficientui $(1-T)$. Konstanta K priklauso nuo fluorescencijos surinkimo kampo, spektro pločio, atkertamo monochromatoriumi arba filtrais ir detektoriaus jautrumo.

Bendru atveju fluorescencijos intensyvumas, kaip ir sugerties koeficientas, nėra proporcingas koncentracijai c , tačiau toks proporcingumas

įmanomas bandiniuose, turinčiuose mažą optinį tankį ($D \leq 0,1$). Esant tokioms sąlygoms galima naudoti artinį, kuris gaunamas I_{fl} išraišką išskleidus eilute ir paėmus pirmąjį jos narį:

$$I_{fl} \approx I_0 \cdot 2,3K\phi D = I_0 \cdot 2,3K\phi \epsilon c l \quad (3)$$

Tokiu būdu, esant mažam medžiagos optiniam tankiui, fluorescencijos intensyvumas proporcingas fluorescuojančios medžiagos koncentracijai. Tuo ir yra grindžiama kiekybinė fluorescencinė analizė. Eksperimento metu matuojamas fluorescencijos intensyvumas I_1 medžiagos, kurios koncentracija c_1 yra žinoma, tada matuojamas tiriamojo bandinio fluorescencijos intensyvumas I . Bandinyje esančių fluorescuojančių dalelių koncentracija lygi:

$$c = c_1 \frac{I}{I_1} \quad (4)$$

Dėka skirtingos fluoroforų koncentracijos audiniuose, stebimi skirtingo intensyvumo tų audinių fluorescencijos spektrai.

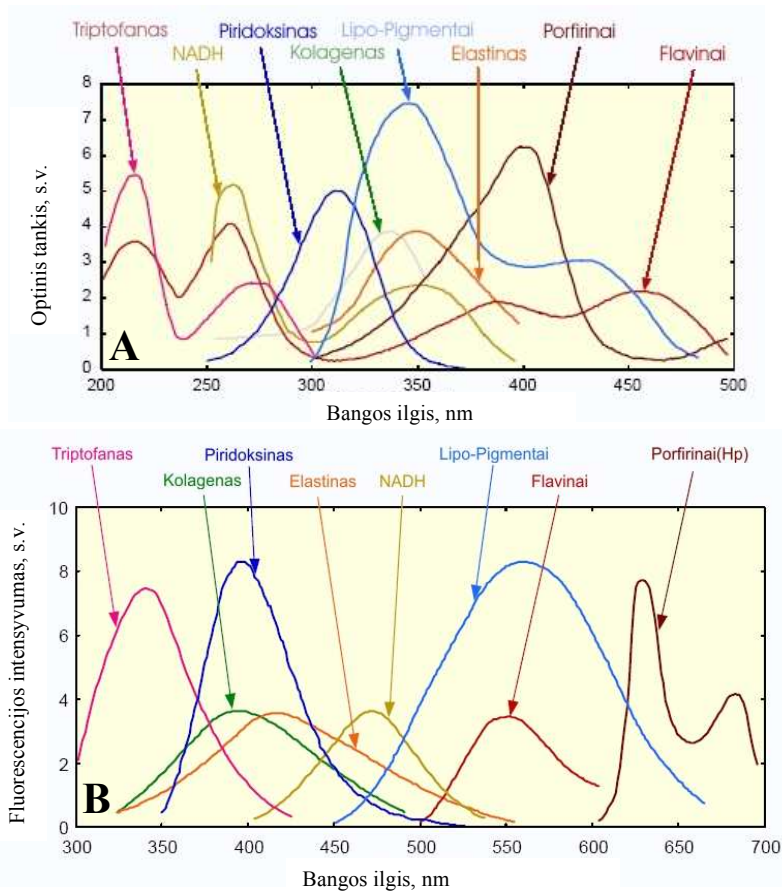
II. Audinių liuminescencija

Audiniai liuminescuoja dėl juose esančių fluorescuojančių molekulių – fluoroforų. Fluoroforai – tai natūralūs arba įvesti iš išorės fluorescuojantys audinio komponentai. Pagrindinių audinio fluoroforų sugerties bei fluorescencijos spektrai pateikti 2 paveiksle. Fluoroforai pagal savo pobūdį skirstomi į tokią grupę:

I. Endogeniniai fluoroforai.

II. Egzogeniniai fluoroforai.

Endogeniniai fluoroforai. Endogeniniai fluoroforai atsakingi už natūralaus audinio savitąją fluorescenciją. Dauguma endogeninių fluoroforų yra susiję su tarpląstelinės medžiagos sandara bei ląstelės medžiagų apykaita. Vieni pagrindinių biologinio audinio komponentų, kurių fluorescenciją galima panaudoti diagnostikoje, yra baltymai. Baltymų fluorescencijos branduolį



2 pav. Pagrindinių audinio fluoroforų sugerties (A) bei fluorescencijos (B) spektrai.

Fluoroforas	Sugerties smailė [nm]	Fluorescencijos žadinimo smailė [nm]	Fluorescencijos smailė [nm]
Fenilalaninas	260		280
Tirozinas	275		300
Triptofanas	280	280	350
Piridoksinas	324	332	400
Kolagenas	325	330	390
Elastinas		350	410
NADH	260/340	290/340	440/450
FAD		450	515
Lipofuscinas		340-395	430-460/540-640
Ceroidas		340-395	430-460/540-640

1 Lentelė. Endogeninių fluoroforų optiniai parametrai (fiziologiniame pH).

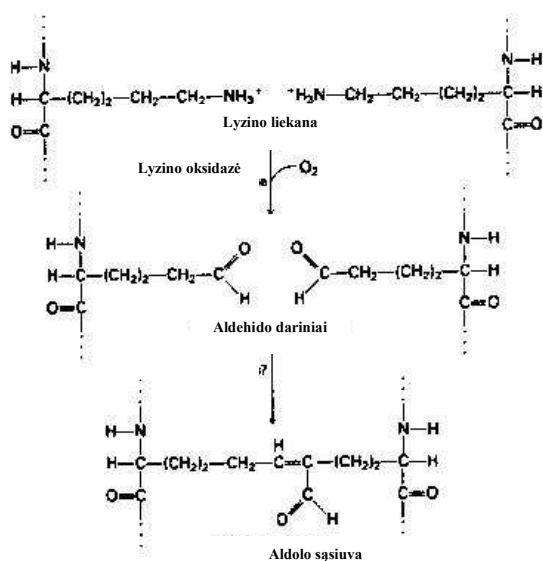
sudaro baltymuose esančios aromatinės amino rūgštys – fenilalaninas (Phe), tirozinas (Tyr) ir triptofanas (Trp). Jei fluorescuotų visos 20 amino rūgščių, gali būti, kad baltymų fluorescencija būtų per sudėtinga analizavimui. Svarbi

baltymų struktūros ypatybė yra ta, kad trys fluorescuojančios amino rūgštys baltymuose yra santykinai retos. Trp, kuris yra pagrindinis fluoroforas, sudaro apie 1% amino rūgščių kiekio. 1 lentelėje pavaizduoti endogeninių fluoroforų optiniai parametrai.

Phe sugeria ir fluorescuoja trumpiausių bangų ilgių šviesą. Jo sugerties juosta yra ties 255 nm, o fluorescencijos juostos smailė yra ties 282 nm. Tyr vandeninio tirpalo sugerties juosta yra ties 275 nm, fluorescencijos juosta – ties 303 nm. Tyr ir Phe sugeria trumpesnių bangos ilgių šviesą ir sugertą energiją dažniausiai perduoda to paties baltymo Trp liekanoms, kurio sugerties juosta yra ties 280 nm. Dėl to Phe ir Tyr fluorescencijos paprastai nepaisoma, tačiau tam tikromis sąlygomis Tyr pasižymi sudėtingomis spektrinėmis savybėmis. Tyr liekana sužadintoje būsenoje gali netekti aromatinės hidroksilo grupės protono. Pagrindinėje būsenoje šio hidroksilo pK yra apie 10. Sužadintoje būsenoje pK sumažėja iki 4. Neutraliame tirpale per sužadintos būsenos gyvavimo trukmės laiką hidroksilo grupė gali disocijuoti. Tai sukelia Tyr fluorescencijos juostos gesinimą ties 303 nm, bet atsiranda silpna tirozinato fluorescencija ties 345 nm, kuri klaidingai gali būti priskirta Trp fluorescencijai. Intensyviausiai iš visų amino rūgščių fluorescuoja Trp. Jis sugeria didžiausio bangos ilgio spinduliuotę ir turi didžiausią ekstinkcijos koeficientą. Trp vandeninių tirpalų fluorescencijos juostos smailė yra ties 350 nm, o jos padėtis labai priklauso nuo tirpiklio poliškumo ir aplinkos. Triptofaninių liekanų fluorescencijos relaksacijos trukmė yra 1-6 ns eilės. Jo fluorescencijos spektras žymiai pastumtas į ilgų bangų pusę dėl H ryšio, kurį sudaro amino grupės sudėtyje esantis azoto atomas. Detalią baltymų fluorescencijos analizę apsunkina daugybė aplinkos faktorių, veikiančių Trp fluorescenciją, ir tai, kad daugumoje baltymų yra ne viena, o keletas Trp liekanų. Jei kiekviena Trp liekana yra skirtingoje aplinkoje, jų spektrinės savybės gali skirtis. Kai visų liekanų spektrai persikloja, sunku išskirti kiekvienos iš jų indėlį į daug Trp liekanų turinčio baltymo spektrą. Kitas faktorius, apsunkinantis Trp spektrų

analizė, yra dviejų artimų energijų sužadintų būsenų 1L_a (S_{nr}^*) ir 1L_b ($S_{\pi\pi}^*$) buvimas. Elektroniniai šuoliai į šiuos du lygmenis pasižymi skirtinga sugertimi ir fluorescencija, bei skirtingai reaguoja į tirpiklio poliškumą. Tačiau nepaisant šių sudėtingumų, baltymų turinčių Trp liekaną fluorescencija vis plačiau naudojama tiriant baltymų funkcijas, jų struktūrą, dinamiką ir įvairius juose vykstančius procesus, struktūrinius biomolekulių pokyčius tirpaluose, izoliuotose biologinėse membranose ir ląstelėse.

Struktūrinių baltymų kolageno ir elastino fluorescencija yra sąlygojama sąsiuvų – kovalentinių ryšių, susidarantių tarp tam tikrų juose esančių amino rūgščių. Kolageno baltyme šie ryšiai, vadinami adolo sąsiuvomis, susidaro tarp lizino liekanų, paveikus jų šonines grandines atitinkamais viršląstelinio matrikso fermentais (3 pav.). Elastino baltyme tas pats fermentas liziną paverčia



3 pav. Kolageno spirales stabilizuojanti adolo sąsiuva tarp dviejų lizino grandinių.

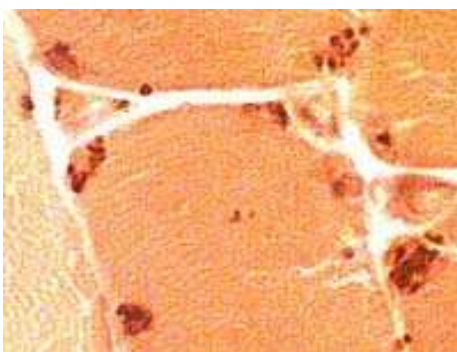
alizinu, kuris sąveikoje su nepakeistu lizinu sudaro heterociklines struktūras – būdingas tik elastinui amino rūgštis desmoziną (sudarytas iš 4 lizino liekanų) ir izodesmoziną, tarp kurių susidaro sąsiuvos, sujungiančios polipeptidines elastino skaidulas.

Lipidai, membranos, sacharidai iš esmės nefluorescuoja, o

dezoksiribonukleininės rūgšties (DNR) fluorescencija yra per silpna, kad ją būtų galima panaudoti praktiškai. Tačiau yra tam tikrų išimčių – tRNA^{phe} iš mielių turi intensyviai fluorescuojantį pagrindą, visiems žinomą kaip Y-pagrindas, kuris turi fluorescencijos smailę arti 470nm, o gyvavimo trukmė ~6 ns.

Piridoksinas (vitaminas B₆) reikalingas daugeliui fermentų ir dalyvauja amino rūgščių apykaitoje. Visi piridoksino apykaitos produktai fluorescuoja 420 nm srityje (sužadinami ties 330 nm).

Audiniuose yra nustatytos kelios grupės fluorescuojančių pigmentų, susijusių su audinių senėjimu ir įvairiais patologiniais procesais. Šie pigmentai yra siejami su lipidų apykaitos produktais, dėl to vadinami lipopigmentais. Yra du artimai susiję lipopigmentų tipai – ceroidas ir lipofuscinas. Lipofuscinas sudaro nuo 1 iki 5 μm skersmens pigmentines granules (4 pav.), randamas

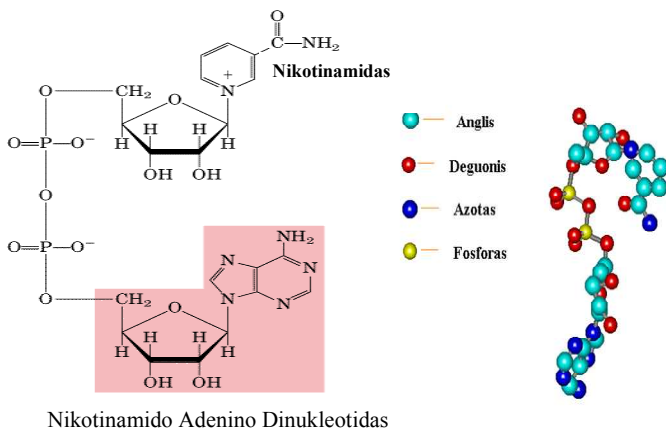


4 pav. Lipofuscino granulės, išryškintos esterazės dažikliu.

pomitotinėse, metaboliškai aktyviose, ilgai gyvuojančiose, nesidalinančiose ląstelėse, tokiose, kaip neuronai ir širdies miocitai. Jį sudaro pažeistos ląstelės membranos, fagocituotos į ląstelę. Panašios struktūros, susiformavusios dėl įvairių patologijų, vadinamos ceroidu, kuris gali būti ankstesnis lipidų apykaitos produktas nei

lipofuscinas, kuris yra galutinis produktas. Lipopigmentų fluorescencija intervaluose 430-460 nm ir 540-640 nm yra sužadinama 340-390 nm srityje. Tačiau audinių, turinčių daug lipofuscino, tyrimai parodė, kad dažniausiai yra užregistruojama tik viena fluorescencijos smailė 430-460 nm srityje. Cheminė šių fluoroforų sandara dar nėra pilnai žinoma.

Piridino nukleotidai ir flavinai yra labai svarbūs ląstelių energijos apykaitoje. Kofermentas NAD⁺ (Nikotinamido-Adenino-Dinukleotidas) – oksidacijos - redukcijos reakcijose dalyvaujančio fermento dehidrogenazės kofermentas, universalus vandenilio nešiklis. Tai sudėtinga molekulė, susidedanti iš dviejų nukleotidų, kurių vieno azotinė bazė - Adeninas, o kito - Nikotinamidas (=nikotino rūgštis, =niacinas, =vitaminas PP) 5 pav. Abiejų nukleotidų cukrus - ribozė. Nukleotidai jungiasi dviem fosforo rūgštis



5 pav. Nikotinamido Adenino Dinukleotidas (NAD).

liekanomis. Nikotinamido žiedas yra aktyvusis NAD'o molekulės fragmentas, kuris gali prisijungti ir vėliau atiduoti vandenilį ir elektronus.

Aerobinio kvėpavimo mitochondrijose metu nuo

PVR atskilusį vandenilį ir elektronus prisijungia fermento dehidrogenazės kofermentas NAD^+ kuris virsta NADH. (NAD^+ – oksiduotas, NADH – redukuotas – prisijungęs vieną elektroną ir vieną vandenilį). NADH fluorescuoja intensyviai, jo sugerties ir fluorescencijos smailės yra atitinkamai 340 ir 450 nm ruože. Tuo tarpu NAD^+ beveik nefluorescuoja. NADH fluorescencijos gyvavimo trukmė vandeniniame buferyje yra apie 0.4 ns. Fluorescencine grupe laikomas redukuotas nikotinamido žiedas, be to jo fluorescencija yra dalinai užgesinta dėl ryšio su adenino liekana. Sujungimo NADH su baltymais metu jo fluorescencijos kvantinis našumas padidėja keturis kartus. Tokį našumo padidėjimą dažniausiai interpretuoja kaip pasekmę NADH sujungimo ištempioje konformacijoje, kas pasitvirtina nagrinėjant rentgeno spindulių difrakciją hidrogenazėse.

Flavino adenino dinukleotidas (FAD) taip pat yra elektronų akceptorius, bet fluorescuoja, kol yra oksiduotoje formoje. FAD, Riboflavinas ir flavino mononukleotidas (FMN) sugeria šviesą matomoje srityje (~450nm) ir fluorescuoja apie 515nm. Gyvavimo trukmės FMN ir FAD atitinkamai yra 4.7 ir 2.3ns. Kaip ir NADH, flavino fluorescencija yra gesinama adenino. Flavoproteinai dažniausiai nefluorescuoja, bet yra ir išimčių. Tiek NADH, tiek FAD koncentracijos audiniuose nedidelės, be to fluorescencija užgęsta vos tik sustojus kvėpavimo grandinei, todėl *ex vivo* tyrimuose ji nepasireiškia.

Taip pat galima išskirti dar vieną grupę fluoroforų – tai audinyje susintetinti fluoroforai. Dažniausiai atsiranda po išorinio pirmtakės molekulės įvedimo. Pvz. 5-amino levulininės rūgšties (ALA) įvedimas į organizmą inicijuoja protoporfirino IX (PpIX) gamybą. Tiek ALA, tiek PpIX yra natūralūs žmogaus organizmo kraujo hemo biosintezės tarpiniai produktai.

Egzogeniniai fluoroforai. Dažnai iš endogeninių fluoroforų gautos informacijos nepakanka, todėl į organizmą tenka įvesti egzogeninius fluoroforus bei fotosensibilizatorius. Pastarieji nors ir yra pašaliniai, bet turi tinkamas specifiniams taikymams spektrines savybes. Trumpai aptarsime kai kuriuos iš jų:

a) Fluoresceino ir rodamino izocianatai ir izotiacianatai. Šiuos dažus plačiai naudoja baltymams žymėti. Imunoglobulinai pažymėti fluoresceinu – komerciniai reaktyvai; juos dažnai naudoja fluorescencinėje mikroskopijoje. Šias medžiagas parenka būtent dėl to, kad jos turi didelį kvantinį našumą ir yra fotochemiškai stabilios. Be to, dėl ilgesnių fluorescencijos ir sugerties bangos ilgių, stebima mažesnė foninė fluorescencija, todėl nereikia naudoti kvarcinės optikos. Izocianatinė ir izotiacianatinė grupės dažniausiai būna arba meta-, arba para- padėtyje karboksi- grupės atžvilgiu. Komerciniai žymėtieji reagentai yra izomerų mišinys. Šie dažikliai visų pirma reaguoja su cisteinine baltymų vieta. Dažiklių fluorescencijos gyvavimo trukmės yra apie 4ns ir jų fluorescencijos spektrai yra mažiau jautrūs tirpiklio poliškumui.

b) Dansilchloridas. Dansilchloridą (DNS- C.1) plačiai naudoja baltymams žymėti ypač tada, kai vyksta poliarizacijos matavimai. Ši medžiaga jau seniai yra žinoma ir turi palyginti ilgą fluorescencijos gyvavimo trukmę (~10ns). Dansilininės grupės fluorescencijos spektrui didelę įtaką turi tirpiklio poliškumas.

c) Naftilaminosulfoninės rūgštys. 1-Anilino-8-naftalinsulfoninė rūgštis (1,8-ANS arba TNS), 2-n-toluidinilnaftalin-6-sulfoninė rūgštis (2,6-TNS arba

TNS) ir jų dariniai dažnai naudojami kaip nekovalentiškai sujungti zondai baltymams ir membranoms. Šie zondai beveik nefluorescuoja vandenyje, bet intensyviai fluorescuoja kai yra ištirpinti nepoliniuose tirpikliuose, arba kai yra sujungti su makromolekulėmis.

d) Hidrofobiniai membraniniai zondai. Lipidai dažniausiai nefluorescuoja. Membranas dažniausiai žymi tokiais zondais kaip perilenas, 9-vinilantracenas ir 1,6-difenilheksatrienas (DPH). Šie zondai netirpsta vandenyje ir susijungia į hidrofobines membranų grandinėles. Nepakeisti daugiabranduoliniai aromatiniai angliavandeniai ir DPH mažai jautrūs tirpiklio poliškumui. Pagal fluorescencijos poliarizuotumo pokyčius jų pagalba įvertina vidinį dvigubų sluoksnių klampumą.

e) Nukleininės rūgštys. Įvedant etileninį tiltelį ATP ir jo darinių fluorescencija tampa žymiai intensyvesnė. Tokie dariniai kaip ϵ -ATP jautrūs tirpiklio klampumui, turi didelę ribinę fluorescencinę poliarizaciją ir jų fluorescencijos gyvavimo trukmė yra apie 23ns. Nukleotidiniai analogai aktyvūs daugelyje reakcijų, kurios yra katalizuojamos fermentais. Šie analogai fluorescuoja ir sugeba sudaryti nemodifikuotų nukleotidų vandenilines jungtis.

f) Kvantiniai taškai. Kvantiniai taškai tai puslaidininkiniai nanokristalai 2 nm – 10 nm dydžio. Lyginant su organiniais žymekliais ir fluorescuojančiais baltymais, Kt – visiškai nauja fluorescuojančių medžiagų klasė, stipriai pralenkianti kitus fluorescuojančius žymeklius pagal daugumą charakteristikų (fluorescencinio signalo stipris, fotostabilumas, siauras fluorescencijos spektras, platus sugerties spektras, ilga fluorescencijos gyvavimo trukmė). Sritis, kurioje Kt fluorescuoja, priklauso nuo jų dydžio. Pagrindinė šių nanodarinių problema yra biosuderinamumas. Dažniausiai tai yra toksiškos nanodalelės, tačiau pastaruoju metu gerokai patobulėjus jų sintezės metodams kvantiniai taškai padengiami tam tikrais sluoksniais, kurie padaro juos tinkamus taikyti biologiniuose objektuose. Dar daugiau – jie padengiami specialiais sluoksniais,

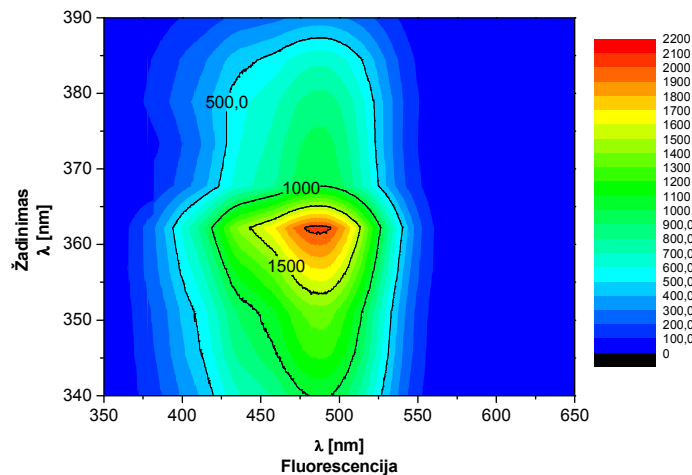
kurių pagalba kvantiniai taškai kaupiasi tik tam tikrose, iš anksto numatytose vietose.

Be kvantinių taškų taipogi galima paminėti koloidines aukso nanodaleles, kurios be jokių modifikacijų yra tinkamos taikymui biologiniuose objektuose. Dėl specifinių aukso savybių šios dalelės yra lengviau modifikuojamos, taip dar labiau praplečiant jų taikymo perspektyvas biologinių objektų žymėjimui.

III. Fluorescencijos taikymas diagnostikoje

Informacija apie audinių optines savybes gaunama dviem metodais – matuojant audinių fluorescencijos bei fluorescencijos žadinimo spektrus. Fluorescencinio spinduliavimo spektroskopijoje eksperimento metu žadinimo bangos ilgis yra pastovus, o fluorescencijos intensyvumas registruojamas plačioje spektrinėje srityje. Fluorescencijos žadinimo spektroskopijoje intensyvumas registruojamas ties vienu pasirinktu bangos ilgiu, o žadinančios spinduliuotės bangos ilgis keičiamas pasirinktoje audiniui būdingoje sugerties spektro srityje. Idealiu atveju, jei nėra energijos pernašos tarp audinyje esančių fluoroforų, žadinimo spektras turėtų atitikti sugerties spektrą. Kadangi audinyje yra labai didelis kiekis sugeriančiųjų bei sklaidančiųjų elementų, tai sugerties spektroskopijai reikalingi specialiai paruošti itin ploni bandiniai, o fluorescencijos žadinimo metodika yra neinvazinis tyrimo metodas kurį labai patogu taikyti ieškant audinių sugerties spektrų *in vivo*.

Tiriant bandinį, fluorescencijos žadinimo šviesos bangos ilgis parenkamas atsižvelgiant į tai, kokių fluoroforų tiriamame audinyje daugiausia bei kurie fluoroforai atsakingi už spektro charakteringumą. Dažnai šiam tikslui yra matuojamas fluorescencijos žadinimo spektras. Sudėtingesniems bandiniams, tokiems kaip biologiniai audiniai, dažnai yra sudaromos žadinimo – emisijos matricos. Žadinimo emisijos matrica yra vadinama dviejų dimensijų (2D) matrica, kurios elementai $I(\lambda_z, \lambda_{fl})$, yra fluorescencijos intensyvumai priklausantys nuo žadinimo bei emisijos bangos ilgių (6 pav). Vienmolekulių



6 pav. NADH-želatinos komplekso žadinimo-emisijos matrica. x ašyje atidėtas fluorescencijos bangos ilgis, y ašyje – žadinimo bangos ilgis, spalvos atitinka intensyvumą: mėlyna spalva žymi bangos ilgių sritis, kuriose fluorescencijos intensyvumas mažiausias, raudona spalva – sritis, kuriose intensyvumas didžiausias.

tirpalų, žadinimo emisijos - matrica yra unikalus molekūlės fluorescencinis antspaudas. Paprastai ji yra užrašoma kiuvetėje, griežtai apibrėžtomis sąlygomis (pvz. pH, temperatūra ir t.t.) bei tiksliai nusakyta žadinimo - registravimo geometrija. Daugiakomponenčių medžiagų, tokių kaip ląstelės ar biologiniai audiniai, žadinimo emisijos matrica parodo kiekvienos molekūlės, sudarančios tiriamąjį objektą, indėlį. Tokios matricos audiniuose sudarymas yra sudėtingas, kadangi fluoroforai yra pasiskirstę heterogeniškai, taip pat fluorescencijos registravimą apsunkina sugeriantys bei sklaidantys elementai. Todėl sudaryta žadinimo - emisijos matrica priklausys nuo to, kurioje audinio vietoje ji bus registruojama, o taip pat nuo žadinimo – surinkimo geometrijos (platus ar siauras žadinimo spindulys, surinkimas vyksta prie pat audinio ar tam tikru atstumu – nuo to priklauso detektavimo gylis). Neprisirišant prie konkretaus organo ar audinio apibendrinant galima pasakyti, kad dažniausiai fluorescencijos žadinimui yra naudojami tam tikri „specialūs“ bangos ilgiai, pvz. 325, 337, 366, 370, 405, 410, 442, 488, 514 nm. Dažniausiai tai atitinka

egzistuojančių fluorescencijos žadinimo šaltinių – lazerių – emisijos bangos ilgius.

Pagal diagnostikoje naudojamų audinio fluoroforų prigimtį fluorescencinės diagnostikos metodus galima suskirstyti į dvi pagrindines grupes:

- I. Savitoji fluorescencija – metodų visuma, pagrįsta audiniuose esančių endogeninių fluoroforų fluorescencijos registravimu. Registruojant endogeninių fluoroforų fluorescenciją galima charakterizuoti pakitusios sistemos (lyginant su atitinkama normalia sistema) fiziologinę būseną, detektuoti mikroskopinius piktybinius audinių pakitimus, nepakenkiant aplinkiniams audiniams.
- II. Sensibilizuota fluorescencija – metodai, kuriuose audinių (pvz. navikų) fluorescencija sensibilizuojama (jautrinama) panaudojant selektyviai juose besikaupiančius egzogeninius fluoroforus arba medžiagas, indukuojančias endogeninių fluoroforų sintezę (pvz. ALA inicijuota PpIX sintezė). Sensibilizuotos diagnostikos metodai dažniausiai taikomi kartu su fotosensibilizuota navikų terapija (FNT) ir padeda sekti fotosensibilizatoriaus kaupimąsi navikuose po injekcijos, stebėti FNT sukeltos audinių nekrozės ir paties sensibilizatoriaus dinamiką švitinimo metu, nustatyti naviko išplitimą, matmenis bei išryškinti (vizualizuoti) naviko kraštus. Sensibilizuotos fluorescencijos taikymą riboja galimi ir dar neištirti pašaliniai efektai, kuriuos gali sukelti paties sensibilizatoriaus, jo fotolizės arba audinio nekrozės produktų toksinis poveikis.

Pagrindinės fluoroforų savybės, į kurias reiktų atsižvelgti analizuojant audinių fluorescencijos spektrus:

- kiekvienas fluoroforas turi specifinius sugerties bei fluorescencijos spektrus.

- bet kuriame audinyje yra mišinys įvairių fluoroforų su skirtingomis koncentracijomis.
- fluoroforai yra netolygiai pasiskirstę audinyje, ypač skiriasi fluoroforų koncentracijos einant gilyn į audinį. Taigi, audinio fluorescencijos spektras, bus sudarytas iš skirtingo fluoroforų indėlio kiekviename sluoksnyje.

Priešvėžinių ar ankstyvų vėžinių susirgimų diagnostika naudojant autofluorescencijos metodą priklauso nuo vieno ar kelių veiksnių:

- 1) fluoroforų koncentracijos, arba pasiskirstymo tam tikrame tūryje pakitimo.
- 2) medžiagų apykaitos pakitimų (pvz.: NADH fluorescuoja tik redukuotas).
- 3) biocheminės/biofizikinės audinio mikroaplinkos pakitimų, kurie įtakoja fluoroforų skaičių, fluorescencijos spektro smailių pakitimus ir juostų pločius.
- 4) audinio architektūros pakitimai, pavyzdžiui raumeninio sluoksnio plonėjimas.
- 5) fluorescencijos signalo silpnėjimas, susijęs su molekulių bespinduline relaksacija.

Fluorescenciniai diagnostiniai metodai taikomi:

- a) Šlapimo pūslės tyrimams. Įvedama 5 – (δ) aminolevulino rūgštis (ALA), kuri inicijuoja protoporfirino IX (PpIX) gamybą. Pašvietus spinduliuote, kurią sugeria sensibilizatorius, naviko fluorescencija matoma plika akimi.
- b) Ankstyvųjų vėžio stadijų aptikimui bronchuose. Taip pat naudojami sensibilizatoriai – hematoporfirino dariniai (HpD) arba fotofrinas. Šiuo metu mėginama naudoti ALA aerozolio pavidalo.
- c) Virškinamojo trakto susirgimų detekcijai bei diferenciacijai. Jų gydymui naudojama FNT.

- d) Galvos ir kaklo navikų aptikimui. Registruojama audinių savitoji fluorescencija. Taip pat pastebėti ALA indukuoto PpIX fluorescencijos intensyvumo skirtumai sveikame ir navikiniame audinyje.
- e) Ginekologijoje. Pagrindinė sritis yra gimdos kaklelio ankstyvųjų vėžinių susirgimų aptikimas.
- f) Krūties vėžio diagnostikai. Krūties vėžys atsiranda gilesniuose audinių sluoksniuose, ir neinvaziniais metodais negalima gauti tikslios informacijos. Fluorescencijos metodas dažniausiai taikomas naviko aptikimui bei jo ribų nustatymui.
- g) Smegenų navikų aptikimui. Labai dažna mirties nuo smegenų vėžio priežastis yra pakartotinis naviko atsiradimas operuotoje vietoje, todėl spektroskopiniais diagnostikos metodais stengiamasi kuo tiksliau nustatyti naviko ribas. Tam naudojama ALA indukuota PpIX fluorescencija.
- h) Odos susirgimų diagnostikai bei klasifikacijai. Šiuo metu odos susirgimai dažniausiai nustatomi labai paprastu būdu – vizualiai apžiūrint, ir, jeigu audinys atrodo įtartinas, imama biopsija arba iš karto atliekama operacija. Tik nedaugeliu atvejų taikomi fluorescenciniai metodai, nes odos fluoroforų autofluorescencija dar nėra tinkamai ištirta. Pastaruoju metu atliekama eilė eksperimentų, skirtų odos savitosios fluorescencijos tyrimui.
- i) Aterosklerotinių pažeidimų aptikimui kraujagyslėse. Kadangi aterosklerozė yra lėtinė arterijų liga, tai jos aptikimas pradinėje, dar nepavojingoje stadijoje, padėtų išvengti didesnių kraujotakos sutrikimų bei sudėtingų operacijų.
- j) Širdies laidžiosios sistemos (ŠLS) tyrimams. Visa laidžioji sistema, įskaitant sinusinę bei atrioventrikulinę mazgus, sudaryta iš vizualiai nuo širdies miokardo nesiskiriančio audinio, todėl yra didelė tikimybė operacijos metu pažeisti kurį nors laidžiosios sistemos elementą, dėl ko

sutrikę ritmingas širdies darbas. Taip pat įmanomas aritmijos židinių aptikimas spektroskopiniais metodais.

Pagrindinė visų fluorescencinių tyrimo metodų problema ta, kad šiuo metu dar nėra pilnai suprasti biocheminiai ir biofizikiniai reiškiniai, kurie lemia fluorescencijos spektrų pokyčius sveikame ir navikiniame audinyje, taigi sunku atrasti sąlygas, kurioms esant vienareikšmiškai galima būtų atskirti navikinį audinį nuo sveiko ar vieną audinio tipą nuo kito.

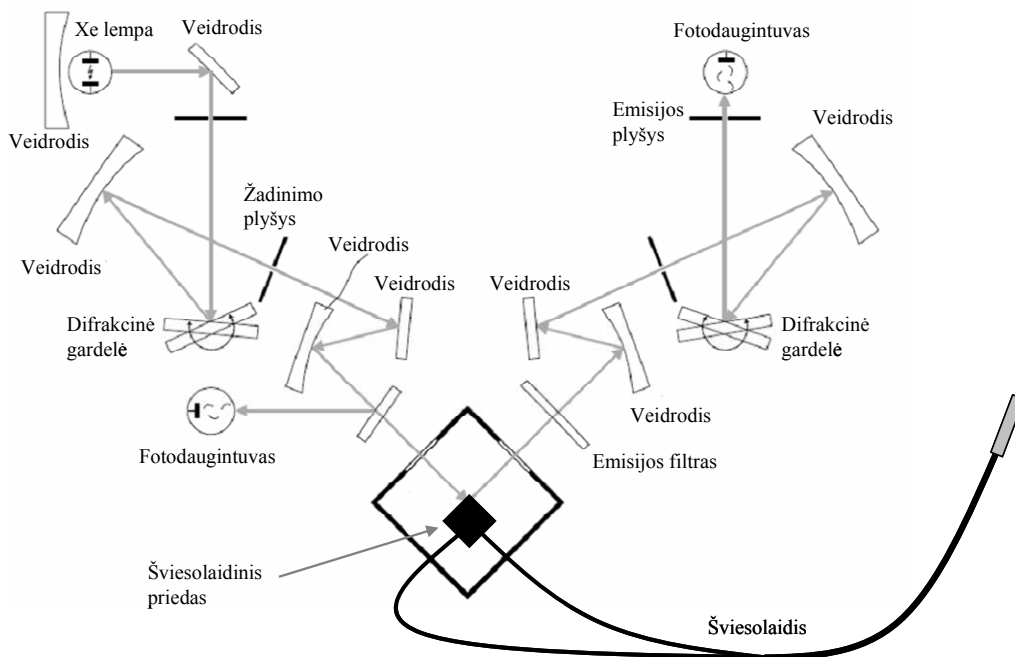
Ieškant tinkamų tyrimo sąlygų yra sukurta sistema, kuria galima *in vivo* registruoti fluorescencijos spektrus, keičiant žadinimo spinduliuotės bangos ilgį. Gauti rezultatai suvedami į fluorescencijos žadinimo – emisijos matricą ir gaunamas spektras, kuris pilnai apibūdina įvairių fluoroforų indėlių į registruojamą fluorescencijos spektrą. Šio metodo esmė yra surasti žadinimo bangos ilgį, kuriuos būtų galima panaudoti navikų aptikimui. Dirbant su eksperimentiniais gyvūnais (žiurkėnais) fluorescenciją žadinant aštuoniolikos skirtingų bangos ilgių spinduliuote 330 nm – 500 nm srityje nustatyta, kad beveik visi charakteringi fluorescencijos spektrai gaunami žadinant trimis bangos ilgiais: 360 nm, 370 nm ir 420 nm. Autoriai pažymi, kad panašių bangos ilgių spinduliuotė (350 nm, 380 nm, 400nm) naudojama žmogaus burnos ertmės navikų fluorescencijos žadinimui.

IV. Fluorescencijos registravimo sistemos.

1. Spindulinis optinės biopsijos prietaisas.

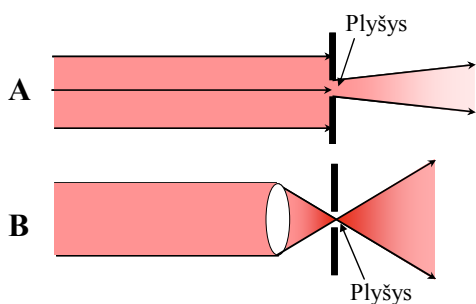
Pirmiausia aptarsime sudėtingus aparatus. Optinės biopsijos prietaisas yra tuo sudėtingesnis, kuo daugiau sudedamųjų dalių, galinčių įtakoti spektrą, jame yra. Visi prietaiso elementai yra skirti atlikti tam tikrą funkciją – jų pagalba yra atliekami atitinkami matavimai. Tačiau realiai stengiamasi informaciją gauti kuo paprastesniu būdu, todėl dažniausiai optinė diagnostika atliekama panaudojant minimaliai papildomų elementų. Sudėtingas optinės biopsijos prietaisas remiasi spinduline žadinimo – surinkimo sistema. Dažnai visa sistema

apsiriboja klasikiniu fluorescencijos spektrometru bei papildomomis žadinimo – surinkimo sistemomis (7 pav.). Pirmoji visų optinių diagnostikos sistemų dalis



7 pav. Spindulinis fluorescencinis spektrometras, pritaikytas optinei biopsijai.

yra šviesos šaltinis. Tokio tipo prietaisuose, kadangi jie yra plataus pritaikymo, šiam tikslui yra naudojamos lempos. Dažniausiai tai yra ksenono lempos užtikrinančios gerą fluorescencijos sužadimą UV srityje. Lempos spinduliuotė yra fokusuojama į žadinimo monochromatoriaus įėjimo plyšį. Fokusavimas



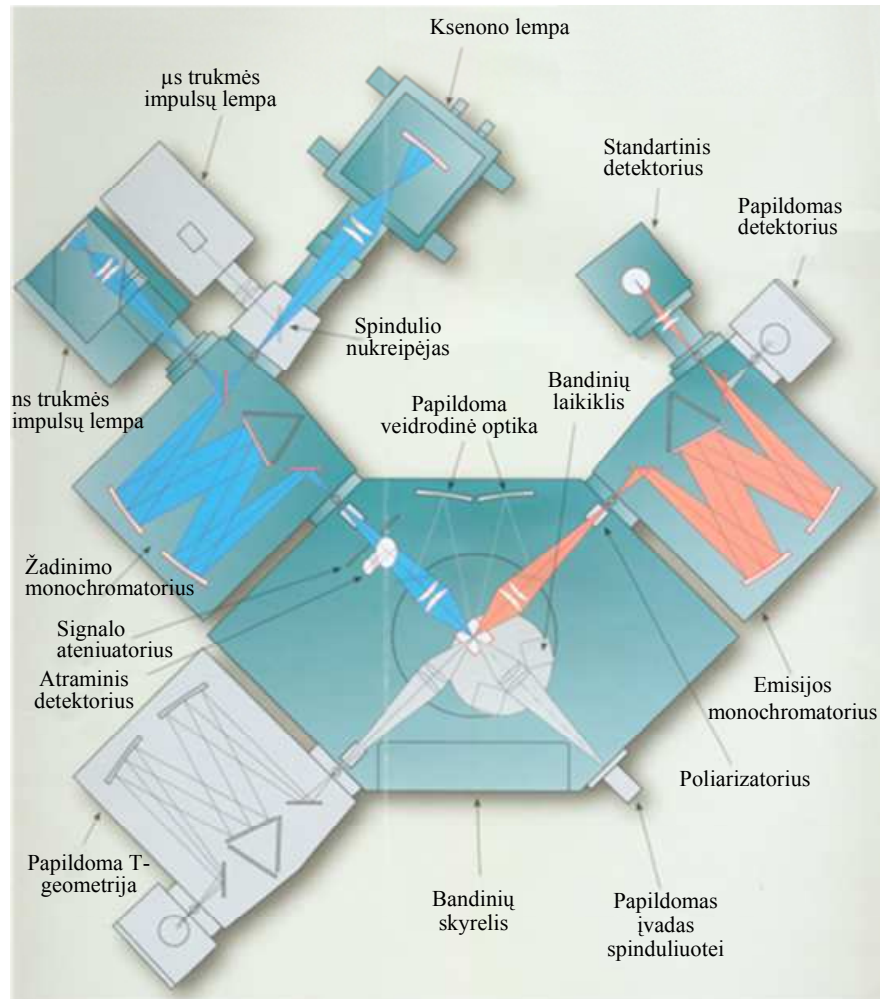
8 pav. A) nefokusuotai spinduliuotei einant pro plyšį praeina tik nedidelė jos dalis, taigi smarkiai krenta intensyvumas. B) fokusuota spinduliuotė, kai fokusas yra ties plyšiu, praeina visa ir neprarandamas intensyvumas.

užtikrina, kad beveik visa spinduliuotė praeis pro plyšį ir pateks į monochromatorių, t.y. neprarasime spinduliuotės intensyvumo (8 pav.). Žadinimo monochromatoriuje šviesa krenta į difrakcinę gardelę ir yra išskaidoma į spektrą. Monochromatoriaus išėjime taip pat yra plyšys, vadinamas išėjimo plyšiu,

pro kurį praeina tik siaura spektro sritis. Kuri spektro sritis praeis – pasirenkame sukdami difrakcinę gardelę. Dabartiniuose prietaisuose difrakcinę gardelę galima sukurti net iki 80nm/s greičiu su neįtikėtinu tikslumu. Plyšių plotis gali būti keičiamas siekiant pakoreguoti skiriamąją gebą arba padidinti jautrumą. Taigi, iš monochromatoriaus išėjusi šviesa jau yra reikiamo bangos ilgio fluorescencijos žadinimui. Vienas iš reikalavimų atliekant fluorescencinius matavimus yra žadinančiosios spinduliuotės pastovumas. Jei dėl kokių nors priežasčių tyrimo eigoje šviesos intensyvumas fliktuos arba pakis, tai atsispindės ir fluorescencijos spektre, tačiau nustatyti, ar optinis signalas susilpnėjo dėl kokių nors audinio savybių, ar dėl prietaiso ypatybių, labai sunku. Todėl, prieš pasiekiant žadinančiajai spinduliuotei tiriamąją vietą, yra išmatuojamas jos intensyvumas. Tam reikalui naudojamas atraminis detektorius. Žadinančiosios spinduliuotės kelyje siekiant išvengti pašalinės šviesos, kuri gali atsirasti monochromatoriuje dėl aukštesnės eilės difrakcijos, papildomai gali būti statomi filtrai. Kadangi pašalinė šviesa dažniausiai būna kitos spektrinės srities nei žadinančioji spinduliuotė, tai jos atskyrimui pilnai pakanka gana grubaus spektrinės srities modifikavimo metodo. Taipogi, priklausomai nuo tyrimo tikslo, spinduliuotės kelyje gali būti statomas poliarizatorius. Įprastiniuose spektrometruose žadinimo šviesa patenka į bandinių skyrelį, tačiau tokiu atveju optinę biopsiją galima atlikti tikai *ex vivo* bandinių, todėl tokiuose prietaisuose būtina modifikuoti žadinimo – surinkimo sistemą, kad būtų galima atlikti tyrimus *in vivo*. Dažniausiai tam yra naudojami šviesolaidiniai priedai. Tuo tikslu 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 pirmiausia prasideda nuo fluorescencijos filtro, kuriuo vėlgi atliekamas grubus spinduliuotės spektrinės srities modifikavimas bei surinkimo poliarizatoriaus – analizatoriaus (jei atliekami poliarizaciniai matavimai). Toliau spinduliuotė pro

įėjimo plyšį patenka į emisijos monochromatorių (kaip ir žadinimo monochromatoriuje 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 – monochromatorinėje – sistemoje vienu metu yra registruojamas tik vienos, labai siauros spektrinės srities intensyvumas, o norint turėti visą spektrą – reikia užregistruoti visų difrakcine gardele išskirtų spektrinių sričių intensyvumus. Taigi paskutinis registravimo sistemos elementas yra detektorius. Dažniausiai tokiose sistemose yra naudojami jautrūs, tačiau negreiti detektoriai (čia reikia atskirti detektorius, skirtus fluorescencijos su laikine skyra matavimams). Aptartuose prietaisuose yra naudojama tik vieno tipo lempa bei vienas detektorius, todėl jų taikymas yra apribotas tik tam tikroje spektrinėje srityje, pvz ultravioletinėje (UV) ir regimojoje (VIS), arba regimojoje ir artimojoje infraraudonojoje (NIR), arba tik infraraudonojoje (IR). Norint tiksliau ištirti įtartą vietą, kartais tenka atlikti kelių tipų optinę biopsiją, todėl būtų labai patogiu jei visus tyrimus būtų galima atlikti tuo pačiu prietaisu.

Tam tikslui yra naudojamas modulinis spektrometras (9 pav.). Tai yra plačiausių galimybių bei pats sudėtingiausias spektrų registravimo įrenginys. Jei aukščiau aprašytame prietaise viskas yra surinkta viename prietaiso korpuse, tai šiuo atveju kiekviena dalis, pvz. lempa, monochromatorius ir t.t. yra atskiras modulis. Prietaisas, kaip konstruktorius, yra surenkamas iš tokių modulių. Natūralu, kad šiuos modulius reikalui esant galima nesunkiai keisti, tačiau modulinio spektrometro esmė, kad būtų galima pasidaryti prietaisą sujungiant tiek modulių, kiek yra reikalinga ir dirbant nieko keisti nereiktų. Taigi pirmoji visų spektrometrų dalis yra šviesos šaltinis. Kad būtų galima atlikti įvairių tipų optinę biopsiją reikalingas šviesos šaltinis spinduliuojantis šviesą nuo ultravioleto iki infraraudonosios spektrinės srities. Kadangi vieno šviesos šaltinio, kuris tolygiai spinduliuotų tokioje plačioje srityje nėra, tai yra



9 pav. Edinburgh Instruments spektrometras FL920, kuris naudojamas įvairių tipų optinėje biopsijoje.

naudojamos kelių tipų lempos. Čia vėlgi puikiai tinka ksenono lempa, kuri gali būti naudojama tiek UV, tiek VIS, tiek ir NIR srityje. Tam tikrais atvejais netgi IR srityje gali būti naudojama ksenono lempa. Tačiau jos emituojamas spektras nėra tolygus. IR sričiai labiau tinkamos kvarco-volframo halogeninės lempos. Abiejų tipų lempas galima pajungti prie spektrometro ir atliekant atitinkamą užduotį pasirinkti vienos arba kitos lempos spinduliuotę. Šios lempos – tai nuostoviosios optinės biopsijos šviesos šaltiniai. Taipogi galima prijungti ir šviesos šaltinius skirtus optinei biopsijai su laikine skyra. Pirmiausia tai yra impulsinė dujų išlydžio 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 pajungiami prie spektrometro per specialų lazerinės spinduliuotės įvadą. Tačiau, jei optinės biopsijos su laikine skyra tyrimuose reiktų pakeisti žadinimo bangos ilgį, tam jau reiktų 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 įvairių optinių sistemų pagalba (lęšiai, veidrodžiai ir pan.) jų spinduliuotės būtų suvedamos į kitą modulį – monochromatorių. Pagrindinė monochromatoriaus dalis, kuria šviesa yra išskaidoma į spektrą, yra difrakcinė gardelė, o pagrindinės monochromatorių apibūdinančios charakteristikos yra skiriamoji geba, pralaidumo efektyvumas ir pašalinės šviesos kiekis. Moduliniame spektrometre monochromatorius yra kaip atskiras prietaisas, todėl šiuos reikalavimus galima išpildyti geriausiai. 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 yra nevienodas kiekvienam bangos ilgiui, tai vėlgi nulemia, kuriai spektrinei sričiai yra optimizuoti difrakcinės gardelės režiai. Taigi dirbant skirtingose spektrinėse srityse (UV, VIS, NIR, IR) reikėtų prietaiso su keliomis skirtingomis gardelėmis. Mūsų aptariamame prietaise monochromatoriuje galima įmontuoti tris skirtingas gardeles ir vėliau pasirinkti tinkamą pagal spektrinę sritį, kurioje numatome dirbti. Tokiu būdu yra išlaikomas aukštas monochromatoriaus pralaidumas plačiame spektriniame ruože. Paskutinis parametras, kurio apibūdinamas monochromatorius yra šviesos kiekis už pasirinktos spektrinės srities (spalvos) ribų. Norint sumažinti pašalinės šviesos kiekį reiktų išskirtą tam tikros spalvos spinduliuotę dar kartą praleisti pro monochromatorių. Moduliniame spektrometre ir tai gali būti padaryta

sujungiant du atskirus monochromatorius. Be abejo, monochromatoriai turi įėjimo bei išėjimo plyšius, kurių pločiai gali būti keičiami.

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

Surinktas fluorescencijos signalas toliau tęsia savo kelionę į detektorių. Emisijos atšaka yra labai panaši į žadinimo atšaką: taipogi yra poliarizatorius, kuris šioje atšakoje yra vadinamas analizatoriumi, viengubas arba dvigubas monochromatorius ir detektoriai. Monochromatoriuose yra įmontuotos kitokios difrakcinės gardelės nei žadinimo atšakoje, nes fluorescencija vyksta kitoje spektrinėje srityje nei žadinimo spinduliuotė. Detektorių skaičių vėlgi apsprendžia tai, kokioje spektrinėje srityje ir kokio tipo yra atliekamas tyrimas. Bendrai galima išskirti tris detektorius – vienas UV – VIS sričiai, kitas NIR ir IR sričiai, ir trečias, labai greitas – fluorescencijai su laikine skiriamąja geba. Šie greiti detektoriai taip pat yra skirtingi skirtingoms sritims. Taigi, norint atlikti optinę biopsiją tiek nuostoviąją, tiek su laikine skyra ir plačioje spektrinėje srityje, reikalingi keturi detektoriai, tačiau greituoju detektoriumi

taipogi galima registruoti ir lėtus procesus, todėl dažnai užtenka tik dviejų detektorių. Tačiau reikalui esant galima prijungti visus keturis detektorius ir neatliekant jokių pakeitimų prietaise registruoti įvairių tipų spektrus.

2 Šviesolaidinis fluorescencijos registravimo prietaisas.

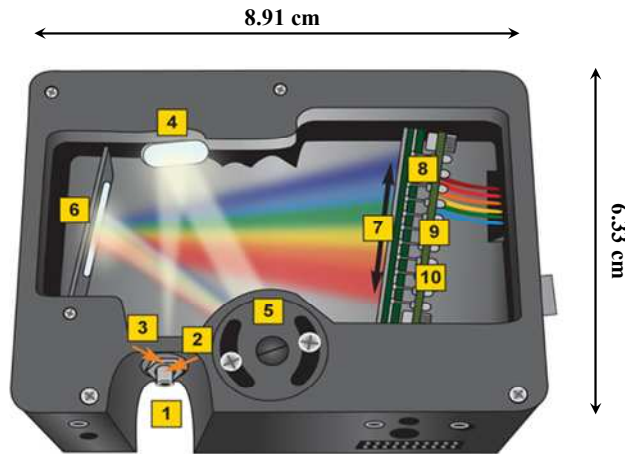
Šviesolaidinės sistemos yra labai patogios, kuomet tenka dirbti su gyvais biologiniais audiniais. Optinės biopsijos taikymuose dažnai yra apsiribojama vieno ar kelių fluorescencijos metodų taikymu, todėl sudėtingos sistemos naudojimas ne visada pasiteisina. Ypač dėl to, kad darbui su aukščiau minėtais prietaisais reikia pakankamai daug patirties bei fizikinių žinių. Sudėtingos sistemos dažniausiai yra naudojamos pavieniams, ypač sudėtingiems tyrimams atlikti, tuo tarpu kasdieniniuose tyrimuose optinė biopsija dažniausiai yra atliekama šviesolaidiniais optinės biopsijos prietaisais. Tokie prietaisai turi nenuginčijamą privalumą – jie yra mobilūs diagnostikos aparatai, kuriuose yra minimaliai komponentų, t.y. tik būtinos optinei biopsijai atlikti dalys. Visi komponentai yra specifiniai, kadangi jie yra sujungiami šviesolaidžiais. Taigi aptarsime visas šviesolaidinio prietaiso dalis. Kaip visada, pradėsime nuo šviesos šaltinio.

Dažniausiai fluorescencijos žadinimui yra naudojamas šviesą emituojantis diodas (LED). Jis yra įtvirtinamas specialiai paruoštame korpuse, kuriame yra visi reikalingi optiniai ir mechaniniai elementai šviesolaidžio prijungimui prie šviesos šaltinio. 10 paveiksle pavaizduotas šviesos šaltinis, naudojamas optinėje biopsijoje. Iš esmės tai yra vieno bangos ilgio šviesos šaltinis, nors jo emituojamos spinduliuotės spektro plotis siekia 10 – 15 nm. Jo viduje



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

įmontuotas 5 mm skersmens šviesos diodas, kurį, reikalui esant, galima pakeisti kito bangos ilgio šviesos diodu. Visi optinės biopsijos aparatūros elementai (šviesos šaltinis, spektrometras, spektrinės sudėties modifikavimo sistema) turi standartines jungtis, įgalinančias prijungti prie jų šviesolaidžius. Dažniausiai sutinkama SMA 905 tipo jungtis. Prie šio šviesos šaltinio tiesiogiai jungiasi žadinimo šviesolaidis, kuriuo spinduliuotė yra nuvedama iki audinio. Kartais žadinančiosios spinduliuotės kelyje yra įmontuojama spektrinės sudėties modifikavimo sistema, kuri užtikrina žadinančiosios spinduliuotės spektro siaurumą. Naudojant LED'us tai nėra būtina, nebent norima „nupjauti“ ilgabangį LED spinduliuojamos juostos kraštą, kad nepersidengtų su audinio fluorescencija. 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 sklindant šviesolaidžiu dažniausiai šviesolaidinės žadinimo – surinkimo sistemos yra gaminamos su stacionariais antgaliais, todėl norint atlikti kito tipo tyrimą, kuriam reikalingas kitoks antgalis, reikia keisti visą žadinimo – surinkimo sistemą (bifurkacinį šviesolaidį). Tam tikrais atvejais gali būti naudojami užmaunami vienkartiniai sterilūs (plastikiniai, stikliniai ir pan.) antgaliai. Audinio optinis atsakas – fluorescencija – surinkimo atšaka keliauja į detektorius. Šiame kelyje būtinai yra reikalinga spinduliuotės spektrinės sudėties modifikavimo sistema, kurioje yra nufiltruojama žadinančioji spinduliuotė. Iš šios sistemos nufiltruotas optinis signalas keliauja į spektrų registravimo įrenginį. Kaip pastebėjote, 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. 11 paveiksle pavaizduotas USB2000+ (Ocean Optics) spektrų registravimo įrenginys. Spinduliuotė iš šviesolaidžio per SMA 905 jungtį (1) patenka į



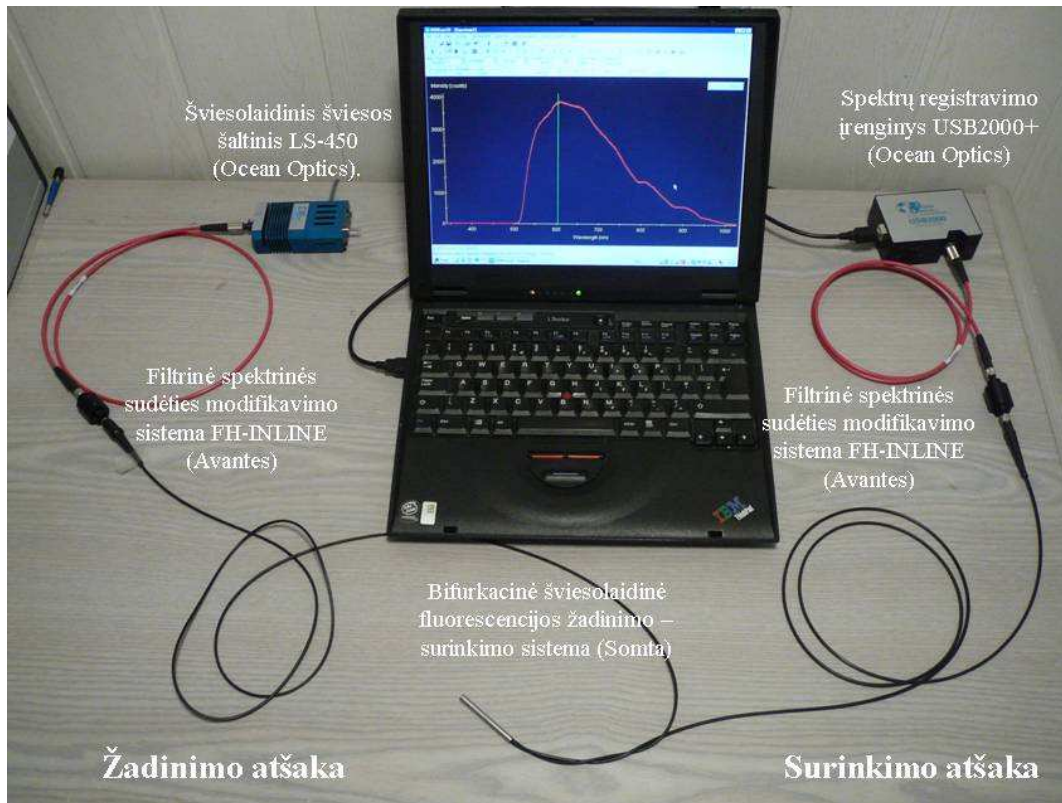
11 pav. USB2000+ (Ocean Optics) šviesolaidinis spektrų registravimo įrenginys.

prietaisą. Šviesos srautas įėjime yra apribojamas specialaus plyšio (2), kurio plotis gali būti nuo kelių mikronų iki kelių šimtų mikronų. Šis plyšys įtakoja skiriamąją gebą. Kuo siauresnis plyšys, tuo geresnė yra skiriamoji geba, 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, kuomet yra naudojami ploni šviesolaidžiai (200 μm skersmens), plyšio galima ir nemontuoti, kadangi paties šviesolaidžio skersmuo yra toks kaip plyšio plotis. Jeigu prietaisas bus naudojamas išskirtinai tik vienam tikslui, tuomet galima tiesiog įėjime įtaisyti žadinančiosios spinduliuotės nepraleidžiantį fluorescencijos filtrą (3), tokiu atveju fluorescencijos surinkimo atšakoje bus nereikalinga spektrinės sudėties modifikavimo sistema. Toliau spinduliuotė besiskėsdama sklinda iki sferinio veidrodžio (4), kuris suformuoja lygiagrečių pluoštą. Atsispindėjusi spinduliuotė (jau lygiagrečiu pluoštu) krinta į difrakcinę gardelę (5). Šioje vietoje vyksta spinduliuotės išskaidymas. Difrakcinės gardelės dėl savo atitinkamos rėžių formos yra optimizuotos tik tam tikrai spektrinei sričiai. Rėžių skaičius difrakcinėje gardelėje įtakoja skiriamąją gebą. Didesnis rėžių skaičius nulems geresnę skiriamąją gebą, tačiau tokia gardelė bus galima registruoti siauresnį bangos ilgių diapazoną. Pvz., jei prietaiso įėjime yra 200 μm pločio plyšys ir yra įmontuota gardelė, kurioje yra 1200 rėžių/mm, tai jos skiriamoji geba bus $\sim 1,5$ nm ir ja bus galima registruoti ~ 220 nm pločio spektrą (pvz. nuo 400 nm iki 620 nm). Atitinkamai jei yra gardelė, kurioje yra

600 rėžių/mm, turėsime ~ 4 nm skiriamąją gebą bei galėsime registruoti ~ 500 nm pločio spektrą. Difrakcinės gardelės į spalvas išskaidyta spinduliuotė toliau sklinda link veidrodžio (6) ir nuo jo atsispindėjusi krenta į detektorių (10) – CCD elementą. Viename CCD elemente gali būti 102, 256, 1024, 2048 arba 3648 registravimo elementai (detektoriukai). Išskleista spinduliuotė krenta ant visų registravimo elementų ir vienu metu yra užregistruojamas platus spektras. Registravimo elementų skaičius detektoriuje taipogi įtakoja skiriamąją gebą. Kuo daugiau detektoriaus elementų, tuo geresnė skiriamoji geba, tačiau nukenčia jautrumas. Atitinkamai detektorius su mažesniu skaičiumi registravimo elementų pasižymi didesniu jautrumu bei prastesne skiriamąją geba. Kadangi patys registravimo elementai esantys CCD yra labai maži, tai tik dalis krentančios šviesos bus užregistruojama. Siekiant padidinti registravimo efektyvumą, priešais CCD elementą gali būti montuojamas specialus cilindrinis lęšis (7), kuris krentančią spinduliuotę sufokusuoja į registravimo elementą – tokiu būdu yra užregistruojama beveik visa atėjusi spinduliuotė. Taip pat prieš detektorių gali būti montuojamas papildomas filtras (8), skirtas aukštesnių difrakcijos eilių šviesai, kuri atsiranda dėl difrakcinės gardelės ypatybių, eliminuoti. Aukštesnių difrakcijos eilių šviesa pasižymi tuo, kad jos mėlyna spalva yra maždaug toje vietoje, kur pirmos eilės šviesos yra raudona spalva. Kadangi mus domina tik pirmos difrakcijos eilės šviesa, tai aukštesnių eilių šviesą reikia nufiltruoti. Ir paskutinis parametras, kuris gali įtakoti registruojamą spektrą, tai detektoriaus įėjimo langelis (9). Skirtumas yra toks – jei spektrai bus registruojami UV srityje yra naudojamas kvarcinis langelis, jei ne – naudojamas paprastas stiklas.

Taigi nesudėtingiems optinės biopsijos taikymams labai patogi yra nedidelė, paprasta, mobili šviesolaidinė sistema (12 pav.). Tai ypač pravartu kai reikia atlikti diagnostiką 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 –



12 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.

ankstyvoji įtartinų vietų diagnostika gali būti atliekama net ir lankant pacientus namuose. Šviesolaidinė sistema taip pat labai patogi registruojant sensibilizuotą fluorescenciją, kuomet registruojamo signalo intensyvumas yra pakankamai didelis, tačiau kai signalo intensyvumas yra labai mažas ir reikalingi itin jautrūs detektoriai tenka grįžti prie sudėtingų, stacionarių prietaisų.

4. Praktinės užduotys.

1. Nubraižyti Jablonskio diagramą.
2. Išvardinti pagrindinius fluoroforus bei jų žadinimo ir emisijos bangos ilgius.
3. Nubraižyti spindulinio fluorescencijos registravimo prietaiso schemą.

4. Nubraižyti šviesolaidinio spektrų registravimo įrenginio schemą.

5. Aparatūra ir darbo metodika.

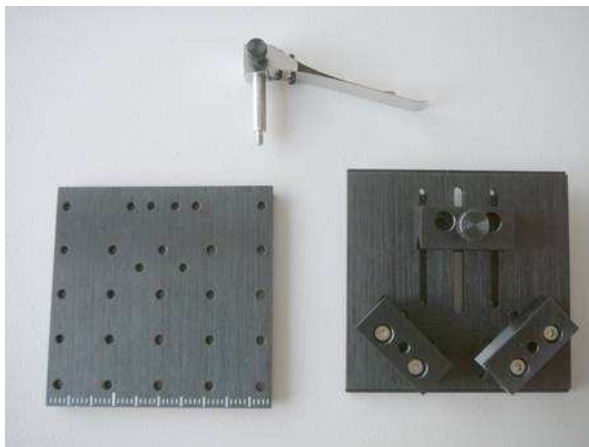
Laboratorinio darbo metu bus registruojami įvairių audinių *ex vivo* bei *in vivo* fluorescencijos bei fluorescencijos žadinio spektrai. Matavimai bus atliekami spinduline fluorescencijos registravimo sistema Varian Cary Eclipse



13 pav. Spindulinis spektrofotometras Cary Eclipse, Varian.

13 pav. Spindulinis spektrofotometras Cary Eclipse, Varian.

fluorescencijos matavimams nėra būtina visiškai tamsi patalpa. Taipogi žadinant bandinį impulsais yra pasiekiamas geresnis fotostabilumas (tiriamasis bandinys gauna mažesnę dozę spinduliuotės, todėl jame esantys fluoroforai



14 pav. Įvairių tipų kietų bandinių laikikliai.

mažiau išblykšta). Organų fluorescencija bus matuojama naudojant kietų mėginių laikiklį (14 pav.). Organo preparatas yra pritvirtinamas prie laikiklio ir įstatomas į specialiai šiam laikikliui modifikuotą bandinių skyrelį.



15 pav. Priedas kietų bandinių laikikliui.

Kietų bandinių laikiklis įsistato į standartinių kiuvečių laikiklio vietą 15 pav. Atlikus visų audinių matavimus kietų bandinių laikiklis bus pakeičiamas į šviesolaidinį priedą 16A pav. Tam reikalui yra nuimamas viršutinis bei priešakinis bandinių skyrelio dangtis. Atliekant matavimus šviesolaidžiu bus naudojamas specialus viršutinis dangtis, su išėjimo anga šviesolaidžiui. Įstačius šviesolaidinį priedą į jį



16 pav. Cary eclipse spektrofotometras su šviesolaidiniu priedu. A – bandinių skyrelyje įmontuotas šviesolaidinis priedas. B – pakeistas spektrometro viršutinis dangtis ir jame įtvirtintas šviesolaidis.

įtvirtinamas šviesolaidis ir uždengiami abu dangčiai 16B pav. Dabar spindulinį spektrometrą modifikavome taip, kad su juo galima atlikti tyrimus *in vivo* bei registruoti spektrus mėginių, netelpančių į bandinių skyrelį. Prie šviesolaidžio antgalio yra mygtukas, kuriuo galima paleisti spektrų registravimą.

Tyrimams laboratoriniame darbe bus naudojamos Wistar linijos žiurkės arba pelės. Eksperimentiniai gyvūnėliai bus žudomi nejautos sąlygomis ir išpreparuojami vidaus organai.

6. Darbo eiga.

Laboratorinis darbas susideda iš keturių etapų – tai preparatų paruošimo, preparatų fluorescencijos bei fluorescencijos spektrų registravimo, žadinimo – emisijos matricų sudarymo bei fluorescencijos spektrų *in vivo* tyrimo.

1. Pirmame etape iš išpreparuotų žiurkės organų bus ruošiami preparatai tinkami fluorescencijos registravimui. Tam reikalui turi būti atpjunami nedideli audinių kiekiai ir pritvirtinami prie spektrometro kietų bandinių laikiklio. Laboratorinio darbo metu rekomenduojama ištirti kuo daugiau skirtingų organų (skrandis/stemplė, inkstai, kepenys, plaučiai, smegenys, blužnis, oda, raumenys) kadangi dėl specifinės sandaros bei skirtingų atliekamų funkcijų kiekviename organe gali būti skirtingas rinkinys fluorescuojančių medžiagų.

2. Pritvirtintas preparatas prie laikiklio dedamas į kietų bandinių laikiklį ir pradedamas fluorescencinis tyrimas. Nors spektrometras gali veikti ir dienos šviesoje, visgi siekiant išlaikyti vienodas sąlygas visiems matavimams rekomenduojame matavimo metu bandinių skyrelį laikyti uždarytą. Darbas su Cary Eclipse spektrometro programa pateiktas prie spektrometro esančiame apraše. Fluorescencijos bei fluorescencijos spektrų registravimui naudojamas “Scan“ modulis. Preparatų fluorescencija bus registruojama 480 – 700 nm bangos ilgių intervale, o fluorescencijos žadinimui naudosime 280 – 450 nm bangos ilgių intervalą. Iš šio intervalo išrinksime 18 bangos ilgių: 280, 290, 300 nm, ... ir taip toliau kas 10 nm iki 450 nm. Taigi kiekvienam audiniui užregistruosime 18 fluorescencijos spektrų esant skirtingiems žadinimo bangos ilgiams.

3. Iš šių spektrų yra konstruojamos žadinimo – emisijos matricos. Tai gali būti atliekama programa Origin, į matricą importuojant vieno audinio duomenis (18 fluorescencijos spektrų), tuomet matrica yra transponuojama, nustatomas linijų (kiek žadinimo bangos ilgių) ir stulpelių (bangos ilgių, ties kuriais buvo registruojamas fluorescencijos intensyvumas mūsų pasirinktame intervale nuo 480 nm iki 700 nm) skaičius ir nubrėžiamas spalvinis pasiskirstymas. Nubrėžus

žadinimo emisijos matricas visiems audiniams, remiantis fluoroforų emisijos duomenimis audiniai yra sugrupuojami į giminingų fluoroforų grupes. Remiantis literatūros duomenimis identifikuojami pagrindiniai šių grupių fluoroforai. Taipogi nustatomi charakteringi žadinimo bangos ilgiai, reikalingi kiekvieno audinio fluorescenciniams tyrimams.

4. Išanalizavus visas žadinimo ir emisijos matricas ir nustačius, koks bangos ilgis yra labiausiai tinkamas atitinkamų audinių tyrimams, toliau bus atliekami eksperimentai *in vivo*. Šiam tyrimui prijungiamo prie spektrofotometro šviesolaidinį priedą. Atliekant tyrimus šviesolaidžiu, dažniausiai tai daroma kontaktiniu būdu – šviesolaidžio antgalis priglaudžiamas prie tiriamojo audinio – ir yra rizika užteršti antgalį įvairiomis fluorescuojančiomis medžiagomis. Tokiu atveju matuodami fluorescenciją mes matysime ir prie antgalio prikibusių medžiagų švytėjimą. Todėl matavimams *in vivo* patartina naudoti papildomus šviesolaidžio antgalius, kuriuos reikalui esant galima nuimti ir įvairiausiai metodais (chemiškai, termiškai ir pan.) nuvalyti bei dezinfekuoti. Kuomet tokių antgalių neturime, galima ant tiriamosios vietos uždėti plastikinę plėvelę ir šviesolaidį prie audinio priglausti per šią plėvelę, tačiau šiuo atveju reikia atsižvelgti į galimą plėvelės fluorescenciją. Jei vis dėlto plėvelė fluorescuoja, vėliau jos fluorescenciją galima atimti iš audinio spektro. *In vivo* paprasčiausia yra atlikti išorinių audinių fluorescenciją. Šiam tikslui puikiausiai tinka odos optinių savybių tyrimas. *In vivo* tyrimams galima matuoti savo odos įvairių vietų (koja, rankos vidinė pusė, rankos išorinė pusė, kaklas, kakta, delnas, plaštaka, nagas, ausis) fluorescencijos spektrus. Visus matavimus reikia stengtis atlikti kuo vienodesnėmis sąlygomis, kadangi nuo to ne tik labai smarkiai priklauso registruojamo spektro intensyvumas, bet gali priklausyti ir paties spektro forma (smailės padėtis, gali atsirasti įdubos). Palyginimui su sveika oda, galima užregistruoti rando, apgamo fluorescenciją. Vėliau atlikti analizę palyginant įvairių vietų fluorescencijos spektrus. Jei registruojant fluorescencijos spektrus buvo išlaikytos vienodos eksperimento sąlygos,

spektrus galima lyginti netik pagal jų formą bet ir pagal intensyvumus. Jeigu egzistuoja tam tikri skirtumai, paaiškinti juos. Kad tyrimas būtų išsamesnis, rekomenduojama išmatuoti skirtingų asmenų skirtingų vietų fluorescencijos spektrus. Tokio tyrimo tikslas yra nustatyti, ar skirtumai tarp to paties asmens skirtingų vietų yra mažesni nei skirtumai tarp asmenų. Tai galima padaryti suvidurkinant vieno asmens visų vietų fluorescencijos spektrus, taip gaunant vieną atstojamąjį fluorescencijos spektrą ir palyginti jį su kito asmens atstojamuoju fluorescencijos spektru atliekant skirtuminę analizę. Skirtuminė analizė atliekama iš vieno sunormuoto spektro (pvz. vieno asmens atstojamasis fluorescencijos spektras) atimant kitą sunormuotą spektrą (pvz. kito asmens atstojamasis fluorescencijos spektras). Normavimas turi būti atliekamas į 1.

7. Kontroliniai klausimai.

1. Fluorescencijos reiškinys, molekulės energijos lygmenų diagrama.
2. Endogeniniai fluoroforai
3. Egzogeniniai fluoroforai.
4. Fluorescencijos taikymas diagnostikoje.
5. Spindulinis fluorescencinės diagnostikos prietaisas.
6. Šviesolaidinis fluorescencinės diagnostikos prietaisas.

8. Literatūra.

1. P. Brazdžiūnas. Bendroji fizika III d., Optika. 1963. p. 259 – 268.
2. Lakowicz J.R. Principles of fluorescence spectroscopy. New York, 1998.
3. G.A. Wagnieres, W.M. Star, B.C. Wilson. *In vivo* fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. J. Photochem. Photobiol. 1998, 68, p. 630-632.
4. Владимиров Ю.А., Потапенко А.Я. Физико химические основы фотобиологических процессов. Москва, 1989.

5. R. Baumgartner. Fluorescence in the Clinical Setting: A Glowing Report. J. Photodynamics. 2000. Volume 3, Number 3, p. 1-14.
6. Markolf H. Niemz, Laser – tissue interactions. Germany, 1996, p. 9-44.
7. Vekshin N.L. – Photonics of biopolymers – Moscow, 1999.
8. Truong T.B. Charge Transfer to a Solvent State. Luminescence Studies of Tryptophan in Aqueous 4,5 M CaCl_2 Solutions at 300 and 77 K. J. Phys.Chem. 1980, 84, p. 960-964.