

Laboratorinis darbas

# **Dvifotonė sensibilizacija**

2008  
Vilnius

# Dvifotonė sensibilizacija

## 1. Darbo tikslas

Ištirti fotosensibilizatorių inicijuotos fluorescencijos erdvinį pasiskirstymą, esant sklaidančiai terpei ir be jos, žadinant fotosensibilizatorius vienfotoniškai ir dvifotoniškai.

## 2. Darbo uždaviniai

1. Išmatuoti hemato porfirino ir rodamino sugerties bei fluorescencijos spektrus.
2. Išmatuoti fluorescencijos erdvinį pasiskirstymą kiuvetėje, esant klasikiniam fotosensibilizatorių žadinimui.
3. Įvertinti sklaidančios terpės įtaką fotosensibilizatoriaus žadinimo efektyvumui ir jo erdviniam pasiskirstymui, esant klasikiniam fotosensibilizatorių žadinimui.
4. Inicijuoti fotosensibilizatorių sužadimą dvifotonių būdu ir užregistruoti fluorescencijos spektrą.
5. Įvertinti sklaidančios terpės įtaką fotosensibilizatoriaus žadinimo efektyvumui ir jo erdviniam pasiskirstymui, esant dvifotoniui fotosensibilizatorių žadinimui.

## 3. Teorinė dalis

**Šviesos ir medžiagos sąveikos rūšys:**

- Poliarizacija
- Lūžis (refrakcija)
- Sugertis
- Sklaida

- Švytėjimas (liuminescencija)
- Netiesinės sąveikos

## I. Elektromagnetinių bangų poliarizacija

Poliarizuotoji ir natūralioji šviesa.

Elektromagnetinės bangos poliarizacija – tai ašinės simetrijos pažeidimas (bangos sklidimo krypties atžvilgiu) skersinėje bangoje, kuris pasireiškia tuo, kad elektrinio lauko stiprio  $E$  (arba magnetinio lauko  $H$ ) gal vektorius užboldint ar rodyklę uždėt, kad atskirt nuo algebrinės vertės? pokytis įvairiomis kryptimis plokštumoje, statmenoje sklidimo kryptčiai, yra skirtingas. Kitaip tariant, poliarizuotoji elektromagnetinė banga yra tokia banga, kurioje elektrinio lauko (arba magnetinio) stiprio konkretaus didumo vektoriaus  $E$  galas, juda tam tikru dėsningumu.

Kiekvienam atskiram spinduliavimo modeliui būdinga tam tikra poliarizacija. Pavyzdžiui, harmoninis dipolinis osciliatorius spinduliuoja tiesiai poliarizuotas bangas, elektrinis arba magnetinis rotatorius – elipsiškai poliarizuotas. Jei spinduolis yra išoriniame elektriniame arba magnetiniame lauke, šviesos poliarizacija tampa sudėtingesne – kiekviena spinduliuotės spektro linija skyla į kelias skirtingos poliarizacijos linijas.

Makroskopiniu kūnu spinduliuojama šviesa sudaryta iš didelio elementariųjų spinduolių skaičiaus. Jos poliarizacija nusakoma spinduolių prigimtimi ir jų orientacija. Kai spinduoliai išsidėstę visiškai netvarkingai, šviesa natūralioji, o, pvz., kristaluose gali būti ženkli poliarizacija. Pusiausvyrusis šiluminis spinduliavimas, kaip visiškai izotropinis, yra natūralusis. Temperatūrinių spinduolių spinduliuotė yra silpnai poliarizuota dėl paviršinių sluoksnių poveikio, kuriuose nėra visiškos pusiausvyros tarp spinduliuotės ir medžiagos. Pavyzdžiui, kaitrinės lempos volframo siūlelio spinduliuojama šviesa yra poliarizuota iki (15 – 20%), gyvsidabrio lempos – iki (5 – 8%). Dienos šviesa praktiškai yra natūralioji, nors atskirų dangaus plotų

šviesa visuomet yra šiek tiek poliarizuota. Stipriai poliarizuotą šviesą spinduliuoja liuminescuojantys skysčiai ir kietieji kūnai, ypač žadinant poliarizuota šviesa.

Šviesos poliarizacijos pobūdis turi esminės įtakos šviesos sąveikai su medžiaga. Optiškai izotropinėse medžiagose, o kartais ir metaluose, nuo šviesos poliarizacijos priklauso šviesos sklidimo greitis ir kryptis (dvejopas spindulių lūžis), taip pat sugertis (dichroizmas). Sklindant šviesai medžiagoje poliarizacijos pobūdis gali keistis: pakinta virpesių plokštuma (atsispindint, lūžtant, optiškai aktyviose terpėse); tiesiai poliarizuota šviesa gali tapti elipsiškai poliarizuota (visiško vidaus atspindžio atveju; atsispindint nuo sugeriančių paviršių, pvz., metalų). Terpės sklaidoma šviesa taip pat keičia savo poliarizaciją. Sklindant terpėse poliarizuotai šviesai išsklaidytoji visuomet tam tikru laipsniu depoliarizuojasi. Indukuotosios spinduliuotės poliarizacijos pobūdis visuomet toks pat kaip ir skatinamosios.

## II. Šviesos dispersija

Medžiagos lūžio rodiklio priklausomybė nuo šviesos bangos ilgio (arba dažnio) vadinama šviesos dispersija. Pagal Maksvelo elektromagnetinę šviesos teoriją sąryšis tarp medžiagos lūžio rodiklio  $n$ , dielektrinės skvarbos  $\epsilon$  ir magnetinės skvarbos  $\mu$  išreiškiamas taip:

$$n = \sqrt{\epsilon\mu}. \quad (1)$$

Pradžioje buvo manoma, kad šie parametrai nepriklauso nuo dažnio  $\omega$ . Tokiu atveju dispersijos reiškinių paaiškinti negalima. Šviesos dispersijos elektromagnetinės teorijos sunkumai pašalinami *elektroninėje šviesos dispersijos teorijoje*. Šviesos dispersija būdinga visoms terpėms. Tik vakuume šviesos greitis nepriklauso nuo bangos ilgio  $\lambda$ . Tie pakitimai įrodyti stebint daugybę astronominių reiškinių.

### III. Šviesos lūžimo dėsniai. Lūžio rodikliai

Šviesos spindulių sklidimas ir su juo susiję reiškiniai buvo nagrinėjami dar Antikos laikais: senovės graikų mokslininkas Euklidas (Euklides) suformulavo tiesiaeigio šviesos spindulių sklidimo ir atspindžio dėsnius. Geometrinė optika sparčiai vystėsi XVII amžiuje, tuo metu buvo sukurti svarbūs optiniai prietaisai: žiūronas, teleskopas, mikroskopas.

Pastaruoju metu šviesos lūžimas apibrėžiamas kaip iš vienos terpės į kitą sklindančios bet kokios elektromagnetinės bangos krypties pasikeitimas dėl jos greičio pakitimo. Patekusios į naują terpę šviesos bangos lūžta pagal šviesos lūžimo dėsnius, kuriuos nepriklausomai vienas nuo kito nustatė olandų mokslininkas V. Snelijus (W. Snell) 1621 metais ir prancūzų mokslininkas R. Dekartas (R. Descartes) 1637 metais. Šiuos dėsnius galima išvesti remiantis geometrijos dėsniais, arba iš Hiuigenso ar Fermio principų.

$$n_{21} = \frac{v_1}{v_2} = \frac{n_2}{n_1} = \frac{\sin \theta_1}{\sin \theta_2}. \quad (2)$$

Pastaroji lygybė vadinama *Snelijaus dėsniu*. Reikia pažymėti, jei  $v_2$  mažesnis už  $v_1$ , tai  $n_2$  bus didesnis už  $n_1$ , o lūžio kampas  $\theta_2$  bus mažesnis už kritimo kampą  $\theta_1$ . Pavyzdžiui, kai šviesa krinta iš oro į stiklą, tai šviesos spindulys artėja prie statmens terpių ribai, o kai šviesa krinta iš stiklo į orą, tai spindulys tolsta nuo statmens. Čia  $n_{21}$  – pastovus dydis, vadinamas *santykiniu lūžio rodikliu* (antrosios terpės santykinis lūžio rodiklis pirmosios terpės atžvilgiu),  $v_1$  ir  $v_2$  – šviesos faziniai greičiai,  $n_1$  ir  $n_2$  – absoliutieji pirmosios ir antrosios terpių lūžio rodikliai.

### IV. Šviesos sugerties dėsnis

Elektromagnetinei bangai sklindant medžiaga, dalis bangos energijos išsikvojama elektronų virpesių sužadanimui atomuose ir molekulėse. Idealiaje vienalytėje terpėje periodiškai virpantis dipolis spinduliuoja antrines to paties

dažnio elektromagnetinės bangas, kurios interferuodamos su pirmine banga pakeičia jos fazinį greitį ir visiškai gražina sugertos energijos dalį.

Realiuoju atveju ne visa virpančiųjų elektronų energija išspinduliuojama atgal elektromagnetinių bangų pavidalu. Dalis energijos virsta kitomis energijos formomis - pagrindinai šilumine. Sužadinti atomai ir molekulės sąveikauja ir susiduria vieni su kitais. Šiuose susidūrimuose elektronų virpesių energija atomų viduje gali virsti išorinio atomų kaip visumos netvarkingojo judėjimo energija. Metaluose elektromagnetinė banga sukelia laisvųjų elektronų virpesius, kurie po susidūrimų atiduoda sukauptą energijos perteklių kristalo gardelės jonams ir tuo pačiu jį sušildo. Atskirais atvejais molekulės sugertoji energija gali susikaupti tam tikroje cheminėje jungtyje ir išekvojama jos suardymui. Vyksta taip vadinamos *fotocheminės reakcijos*.

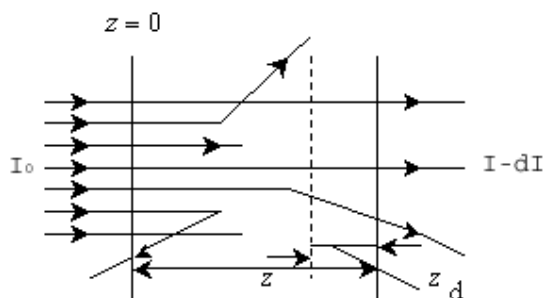
Kai yra ženklūs optiniai terpės netolygumai, tai tam tikra elektromagnetinės bangos dalis, spinduliuojama atomų ir molekulių atgal, yra nekoherentinės pirminės bangos atžvilgiu ir išsklaidoma į visas puses. Tokios sklaidos pasekoje pirminio pluoštelio energija palaipsniui mažėja.

Šviesos sugertis kiekybiškai įvertinama *sugerties koeficientu*, kuris priklauso nuo medžiagos prigimties, cheminės sudėties, agregatinės būsenos, koncentracijos, temperatūros ir nuo sąveikaujančios su medžiaga šviesos bangos ilgio. Sugerties koeficiento priklausomybė nuo bangos ilgio vadinama *sugerties spektru*.

Tegu šviesos intensyvumas plokštumoje  $z=0$  yra  $I_0$  (1 pav.). Perėjus sluoksnį  $dz$ , šviesos intensyvumas susilpnėja iki  $I$  ir tampa mažesnis už  $I_0$ . Išskirkime sritį  $dz$ . Šviesos intensyvumas perėjus sluoksnį  $z+dz$ , bus  $I-dI$ . Dydis  $dI$  yra sugertas ir išsklaidytas sluoksnyje  $dz$  šviesos srautas ir priklauso nuo krentančiojo į šį sluoksnį šviesos intensyvumo:

$$-dI = kI dz ; \quad (3)$$

čia  $k$  - šviesos silpimo koeficientas, į kurį įeina tikrasis sugerties koeficientas ir koeficientas, charakterizuojantis pirminio pluošto energijos nuostolius dėl kitų procesų, ypač sklaidos.



1 pav. Šviesos sugertis ir sklaida

Integruojant (3) gaunama:  $I = I_0 \exp(-kz)$ . Tai *Bugerio dėsnis*. Koeficientas  $k$  nusakomas konkrečiam bangos ilgiui:  $k_\lambda = 1/z \ln(I_{0\lambda}/I_\lambda)$ . Kai  $z = 1/k_\lambda$ , tai  $I_\lambda = I_{0\lambda}/e$ , t.y. silpimo (sugerties) koeficientas yra dydis, atvirkščias sluoksnio storiui, kurį perėjęs šviesos intensyvumas sumažėja  $e$  kartų.

Dydis  $D_\lambda = \ln(I_{0\lambda}/I_\lambda)$  vadinamas *optiniu tankiu*. Dar naudojamas *optinis pralaidumas*  $T_\lambda = I_\lambda/I_{0\lambda}$ . Tada optinį tankį galima užrašyti tokiu pavidalu:  $D_\lambda = \ln 1/T_\lambda = -\ln T_\lambda$ .

Tirdamas tirpalus Beras nustatė, kad sugerties koeficientas  $k_\lambda$  proporcingas tirpalo koncentracijai  $c$ :  $k_\lambda = a_\lambda c$ ; čia  $a_\lambda$  - vienetinės koncentracijos koeficientas. Tada jungtinis Bugerio ir Bero dėsnis užrašomas taip:

$$I_\lambda = I_{0\lambda} \exp(-a_\lambda cz). \quad (4)$$

Iš čia  $a_\lambda = (1/cz) \ln I_{0\lambda}/I_0 = D_\lambda/cz$ .

Kadangi sugerties koeficientas priklauso nuo bangos ilgio tai Bugerio ir Bero dėsnis taikomas tik monochromatinei spinduliutei. Sugerties koeficiento dispersija (priklausomybė nuo bangos ilgio) labai ryški arti rezonanso tarp krentančios šviesos dažnio ir nuosavųjų elektronų virpesių dažnio atomuose. Šiuo atveju smarkiai išauga elektronų priverstinių virpesių amplitudė ir padidėja

jų perėjimo tikimybė į šiluminio judėjimo energiją. Tokiu būdu įvairių ilgių bangos tame pačiame sluoksnyje sugeriamos skirtingu laipsniu. Rezonansinio dažnio bangos visiškai sugeriamos ploname sluoksnyje.

Proporcingumas tarp  $-d/l$  ir  $l$  išsklaidytiems spinduliams galioja tik esant vienkartinei sklaidai ir siauriems pluošteliams.

Iš Bugerio ir Bero dėsnio dar išplaukia, kad sugerties koeficientas nepriklauso nuo krentančiosios šviesos intensyvumo. Pagal Vavilovą intensyvumo pokytis netgi iki  $10^{20}$  kartų nepažeidžia Bugerio ir Bero dėsnio. Tačiau naudojant labai stiprius šviesos srautus (lazerinius), jau pastebimi nuokrypiai.

## **V. Šviesos sklaida**

Biologinis audinys - sudėtinga sistema, sudaryta iš daugybės biologinių molekulių, organelių, ląstelių, kurie gali išsklaidyti šviesą. Dėl to fotonas prieš jį sugeriant daug kartų pakeis savo sklidimo kryptį – bus išsklaidytas.

Sklaida tai vienas iš pagrindinių fizikinių procesų kurio metu kinta spinduliuotės sklidimo kryptis.

Elektromagnetines spinduliuotės sklaida, kurios metu nepakinta jos dažnis, vadinama koherentine sklaida (priešingu atveju sklaida vadinama nekoherentine sklaida). Be to, jeigu elektromagnetines bangas sklaido laisvieji elektronai, tuomet koherentinė sklaida vadinama Tomsono sklaida, o jeigu jas sklaido atomų elektronai ir jeigu bangos ilgis yra žymiai didesnis už atomo matmenis, tuomet koherentine sklaida vadinama Relėjaus sklaida (Rayleigh scattering).



Elektromagnetinės spinduliuotės sklaidos rūšys

	Klasikinė fizika		Kvantinė fizika		
	Pavad.	Koher.?	Pavad.	Koher.?	Ribiniai atvejai
Sklaida laisvaisiais elektronais <sup>9</sup>	Tomsono sklaida	Taip	Komptono sklaida	Ne	Kai $h\nu \ll m_0c^2$ , Komptono sklaidą galima laikyti Tomsono sklaida (t.y., aprašyti klasikinės fizikos metodais).
Netamprioji sklaida atomais	–	–	Komptono sklaida	Ne	Kai $h\nu > m_0c^2$ , sklaidą atomais galima aprašyti taip pat, kaip sklaidą laisvaisiais elektronais; atomas sklaidos metu yra jonizuojamas. Be to, šiuo atveju Komptono sklaida yra vyraujantis sklaidos mechanizmas.  Kai $h\nu$ tampa mažesnė už valentinių elektronų ryšio energiją, jonizavimas tampa neįmanomas ir netampriosios sklaidos metu atomas yra tik sužadinas. Be to, šiuo atveju netamprioji sklaida vyksta žymiai rečiau, negu koherentinė sklaida.  Kai $h\nu$ yra mažesnė už mažiausią sužadavimo energiją, netamprioji sklaida tampa neįmanoma. Tuomet vyksta tik koherentinė sklaida.
Tamprioji sklaida atomais	Koherentinė sklaida; Reilėjaus sklaida	Taip	Koherentinė sklaida	Taip	Kai $h\nu > 500$ keV, koherentinė sklaida vyksta žymiai rečiau, negu Komptono sklaida.  Kai $h\nu \ll 10$ keV, koherentinė sklaida yra vyraujantis sklaidos mechanizmas.

Kvantinės mechanikos požiūriu, sklaidos įvykis – tai dviejų dalelių – fotono ir elektrono arba fotono ir atomo – susidūrimas. Jeigu fotonas susiduria su laisvuju elektronu, tuomet tokia sąveika yra tamprioji, nes jos metu nekinta dalelių kinetinių energijų suma. Dalelių energijas ir judesio kiekius po susidūrimo nusako energijos ir judesio kiekio tvermės dėsniai. Iš šių dėsnių išplaukia, kad dėl atatranks sklaidos metu fotonas dalį savo energijos ir judesio kiekio perduoda elektronui. Dėl to fotono energija ir dažnis sumažėja (taigi, sklaida yra nekoherentinė). Šis reiškinys, kuri 1922 m. apraše amerikiečiu fizikas A. Komptonas, tapo vienu iš kvantines mechanikos kertiniu akmeniu, nes jis parodė, jog elektromagnetinė spinduliuotė turi korpuskulinių savybių.

Tokia sklaida, kurios metu sumažėja spinduliuotės dažnis, vadinama Komptono sklaida, o dažnio sumažėjimas (ir atitinkamas bangos ilgio padidėjimas) vadinamas Komptono efektu. Dažniausiai fotonas perduoda elektronui žymią savo energijos dalį. Šie greitieji elektronai, kurie atsirado dėl Komptono sklaidos, yra vadinami Komptono atatranks elektronais. Fotonus gali sklaidyti ne tik laisvieji elektronai, bet ir atomai (tiksliau, atomų elektronai). Jeigu tokios sklaidos metu sumažėja fotono energija, tuomet sklaida taip pat yra vadinama Komptono sklaida. Komptono sklaida dėl fotono sąveikos su atomu (o ne su laisvuju elektronu) nėra tamprioji, nes jos metu dalis fotono energijos

virsta atomo vidine energija. Pvz., jeigu atomas jonizuojamas, tuomet fotono energijos nuostoliai yra sudaryti iš dviejų dalių: Komptono atatrunkos elektrono kinetinės energijos ir to elektrono ryšio energijos atome (elektrono ryšio energija – tai darbas, kuri reikia atlikti, pašalinant elektroną iš duotojo elektronu sluoksnio). Minėtoji ryšio energija Komptono sklaidos metu virsta atomo vidine energija. Be to, įmanomas toks vyksmas, kai sklaidos metu atomas nėra jonizuojamas, o yra tik sužadinamas. Pastaruoju atveju visas fotono energijos sumažėjimas yra lygus atomo vidinės energijos padidėjimui.

Sklaida aprašoma sklaidos koeficientu, kurio atvirkščias dydis nusako laisvąjį fotono kelią iki išsklaidymo.

Intensyvumo sumažėjimas sklaidančioje aplinkoje aprašomas analogiškai sugerčiai:

$$I(z) = I_0 \exp(-a_s z). \quad (5)$$

Elastinės (tampriosios) sklaidos atveju – atsakomieji virpesiai yra tokio pat dažnio kaip ir juos sukėlusio banga. Kai dalelės matmenys mažesni už krintančios bangos matmenis (bet  $>0.1 \lambda$ ), vyksta Relėjaus sklaida. Tai elastinės sklaidos rūšis, kurios intensyvumo priklausomybė nuo bangos ilgio aprašoma taip:

$$I_s(\Theta) \propto \frac{1 + \cos^2(\Theta)}{\lambda^4}. \quad (6)$$

Skirtingi bangos ilgiai bus išsklaidyti skirtingais kampais.  $I \sim 1/\lambda^4$  – trumpesnės bangos bus sklaidomos labiau nei ilgosios.  $I \sim 1 + \cos^2\theta$  – spinduliuotės išsklaidytos į priekį ir atgal intensyvumai vienodi

Jei sklaidančios dalelės yra didelės ( arba labai mažos  $<0.01 \lambda$ ), tai Relėjaus sklaidą keičia *Mi* sklaida. Šiuo atveju:

$$I_s \propto \lambda^{-x}, x = 1 - 4. \quad (7)$$

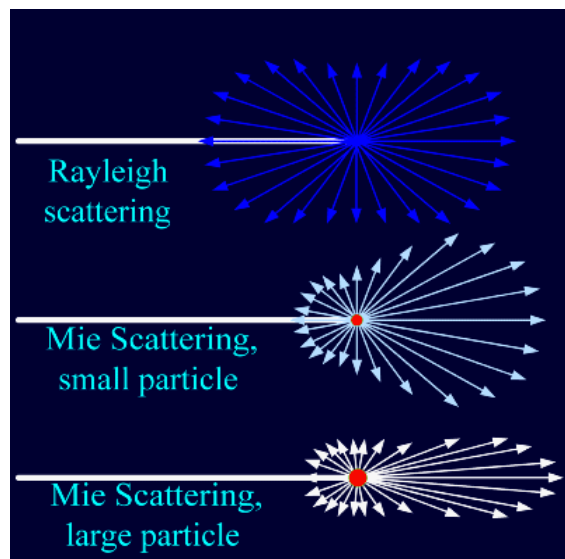
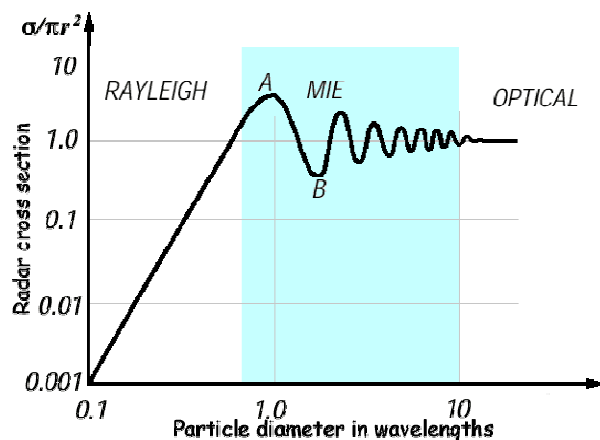
*Mi* sklaidos pagrindiniai skirtumai:

1. Silpnė priklausomybė nuo bangos ilgio;

2. Mi sklaidos atveju šviesa sklaidoma nedideliais kampais, t.y. nedaug nukrypsta nuo pradinės krypties.

Jeigu fotono energija nėra žymiai (bent 100 kartu) didesnė už K sluoksnio elektronų ryšio energiją, tuomet, be Komptono sklaidos, pasireiškia ir kitokio tipo sklaida – fotonų tamprioji sklaida atomais. Tokios sklaidos metu atomas nėra nei jonizuojamas, nei sužadinamas, o fotono energija praktiškai nepakinta (tai išplaukia iš energijos ir judesio kiekio tvermės dėsnų). Taigi, tokia sklaida yra koherentinė. Tokio įvykio tikimybė yra didžiausia, kai kvantą sklaido sunkiųjų elementų atomų vidinių sluoksnių elektronai, kurių mažiausioji sužadinimo energija yra palyginti didelė. Koherentinė sklaida pasireiškia tuo, kad išsklaidytoje spinduliuotėje yra ir pradinio bangos ilgio komponentė. Koherentinė sklaida tampa vyraujančiu sklaidos mechanizmu, kai fotono energija yra mažesne už 10 keV (kuo didesnis elemento atominis numeris, tuo platesniame energijų intervale vyrauja koherentine sklaida).

Koherentinę sklaidą galima aprašyti klasikinės fizikos metodais. Mažėjant kvanto energijai arba augant sklaidančiosios medžiagos atominiui numeriui, koherentinės sklaidos tikimybė auga. Vykstant vidutines ir aukštos energijos

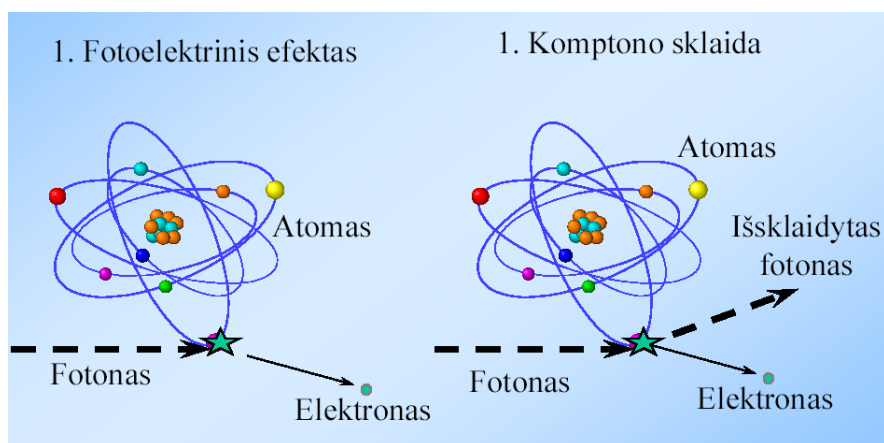


2 pav. Relėjaus ir Mi sklaidos priklausomybė nuo dalelių, kurios sklaido, dydžio ir Relėjaus bei Mi sklaidos erdvinis pasiskirstymas

(>500 keV) kvantų sklaidai mažo atominio numerio medžiagose (pvz., aliuminyje), koherentinė sklaida praktiškai nepasireiškia ir galima laikyti, kad vienintelis sklaidos vyksmas yra Komptono sklaida.

## VI. Fotoefektas

Fotoefektas arba fotoelektrinė sugertis – tai tokia fotono sąveika su atomu, kurios metu atomas sugeria visą fotono energiją (t.y., fotonas nustoja egzistuoti), o vienas iš atomo elektronų išlekia iš atomo. Išlaisvintasis iš atomo elektronas vadinamas fotoelektronu. Taigi, pagrindinis skirtumas tarp fotoefekto ir Komptono sklaidos yra tas, kad Komptono sklaidos metu fotonas praranda tik dalį savo energijos, o fotoefekto metu fotonas yra pilnai sugeriamas.



3 pav. Fotoelektrinis efektas ir Komptono sklaida

## VII. Liuminescencijos rūšys

Chemiliuminescencija – spinduliuojantis kūnas naudoja energiją, kuri atsiranda vykstant kūno viduje cheminėms reakcijoms.

Biochemiliuminescencija – biologinis objektas naudoja biocheminių vyksmų metu išlaisvintą energiją.

Fotoluminescencija – kai kūnas išspinduliuoja energiją, kurią prieš tai sugėrė.

Elektroliuminescencija – dujos naudoja elektros išlydžio energiją.

Rentgenoluminescencija – kūnas spinduliuoja energiją, kurią suteikė rentgeno spinduliuotė.

Radioluminescencija – žadinama greitomis dalelėmis, kurios susidaro skylant radioaktyvioms medžiagoms, ir kosminiais spinduliais.

Bioluminescencija – žadinama scheminės reakcijos metu išskiriama energija.

### **VIII. Liuminescencija**

Liuminescencija yra nepusiausvyrisis savasis sužadintų dalelių arba iš jų sudarytų medžiagų švytėjimas. Nepusiausvyrisis švytėjimo pobūdis skiria ją nuo šiluminės spinduliuotės, o savasis - nuo šviesos atspindžio bei sklaidos.

Pagal švytėjimo trukmę liuminescencija yra skirstoma į fluorescenciją ( $10^{-11}$ -  $10^{-8}$  s) ir fosforescenciją ( $>10^{-6}$  s). Sužadintosios būsenos gyvavimo trukmė nusako liuminescencijos trukmę. Nutraukus žadinimą molekulių liuminescencija gęsta eksponentiškai:  $I = I_0 \exp(-t/\tau)$ ;  $I$  – liuminescencijos intensyvumas laiku  $t$ ,  $I_0$  – pradinis intensyvumas,  $\tau$ -švytėjimo trukmė, per kuri liuminescencijos intensyvumas sumažėja  $e$  kartų.

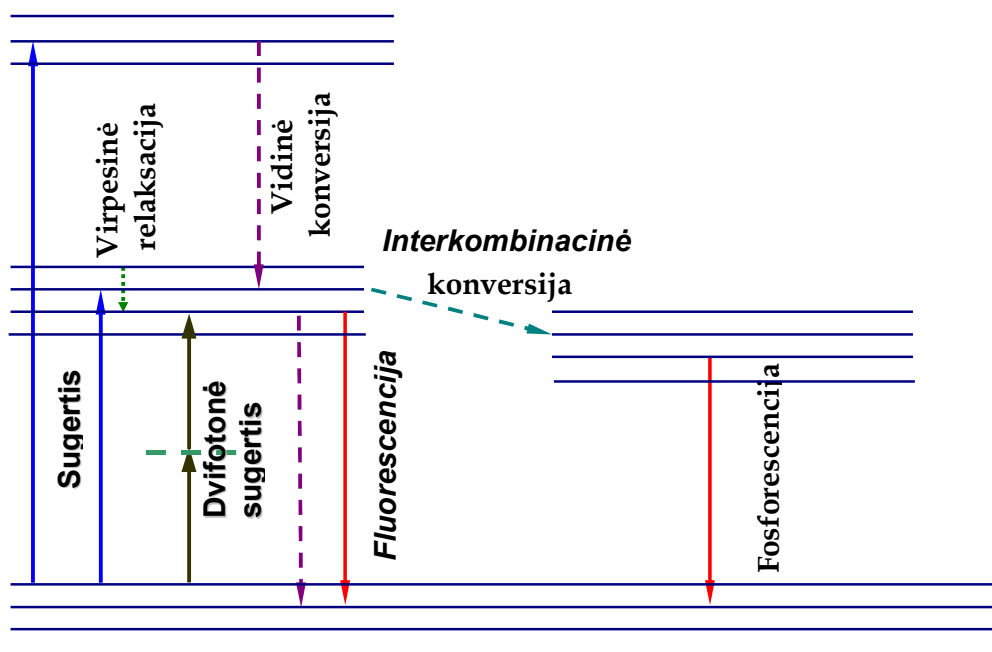
Liuminescencijos gesinimas yra procesas, kuris mažina medžiagos liuminescencijos našumą. Liuminescencijos gesintojais gali būti organiniai ir neorganiniai junginiai. Egzistuoja įvairūs liuminescencijos gesinimo būdai. Išskiriamos kelios gesimo grupės.

Pirmajai grupei priskiriami procesai, kurių metu liuminescencijos našumas mažėja dėl gesintojo molekulių ir medžiagos nesužadintų molekulių sąveikos (statinis gesimas). Statinis gesimas susietas su neliuminescuojančių kompleksų susidarymu pagrindinėje būsenoje. Po absorbcijos kompleksas neišspinduliuodamas kvanto pereina į pagrindinę būseną.

Antrajai grupei priskiriami procesai, kurių metu liuminescencijos našumas mažėja dėl gesintojo molekulių medžiagos sužadintų molekulių sąveikos. Tuo pačiu vyksta sužadintų molekulių nespindulinė dezaktyvacija, kurios metu

sužadintų molekulių energija perduodama nesužadintoms molekulėms arba sužadavimo energija virsta branduolių virpesine energija.

Mažose koncentracijose ( $< 10^{-4}$  mol/l) švytėjimo intensyvumas didėja proporcingai absorbuojančių dalelių skaičiui. Esant tam tikrai koncentracijai intensyvumas pasiekia maksimumą. Toliau didinant koncentraciją intensyvumas nekinta, o dar padidinus – mažėja. Mažose koncentracijose absorbuotas šviesos intensyvumas auga proporcingai koncentracijai, tai vyksta tol, kol tam tikrame koncentracijų intervale tirpalas absorbuoja ne visą žadinančią šviesą. Toliau didinant koncentraciją liuminescencija silpnėja. Liuminescencijos gesinimas taip pat priklauso ir nuo molekulių sandaros. Koncentracinis gesinimas aiškinamas dviem procesais vykstančiais tirpale vienu metu: molekulių absorbcija ir neliuminescuojančių asociantų susidarymu, ir energijos migracija nuo sužadintų



4 pav. Jablonskio daugiaatomės molekulės lygmenų diagrama

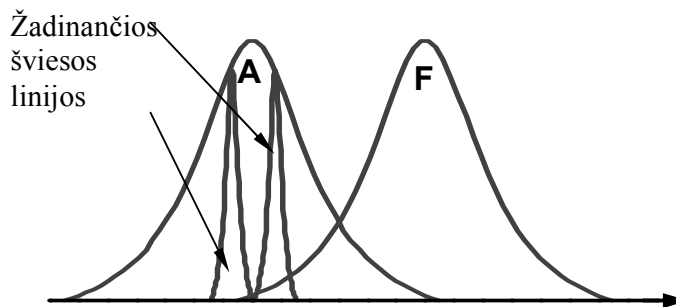
monomerų nešvytintiems asociantams. Tokio pobūdžio gesinimo procesai vyksta įvairių organinių junginių tirpaluose. Susidarant asociantams kvantinis našumas sumažėja, bet liuminescencijos spektro pati forma nepakinta. Kaip šviesa sugerama ir kaip vyksta liuminescencija iliustruoja Jablonskio diagrama

(žr. 4 pav.). Pagrindinėje būsenoje visos molekulinės orbitalės yra užpildytos elektronų poromis. Pagal Paulio draudimo principą vienas elektronas gali būti tik vienoje mikrobūsenoje, o pagrindinėje būsenoje mikrobūsenos skiriasi tik sukiniiais (sukinio vertės gali būti tik dvi:  $1/2$  ir  $-1/2$ ), todėl vienoje orbitalėje esančių elektronų sukiniai yra priešingi. Iš to seka, kad pagrindinės būsenos sukinyvis yra lygus nuliui. Sužadinus molekulę elektronas peršoka į aukštesnę orbitale.

Elektrono sukinyvis gali būti orientuotas ta pačia arba priešinga kryptimi. Iš to seka, kad sužadinta molekulė gali būti dviejų būsenų. Pirmoje būsenoje suminis sukinių kvantinis skaičius yra 0, o antroje 1. Išoriniame magnetiniame lauke pirmuoju atveju sukinio projekcija gali įgyti vieną vertę (0), antruoju atveju – tris vertes (-1, 0 ir 1), todėl šios būsenos atitinkamai vadinamos singletinėmis ir tripletinėmis.

Žadinant, molekulės iš pagrindinės  $S_0$  (singletinės) būsenos pereina į aukštesnes sužadintas singletines būsenas (žr. 4 pav.) atitinka būsenas  $S_1$  ir  $S_2$ .

Daugiatomių molekulių kiekvienas energetinis lygmuo turi daug virpesinių ir rotacinių polygmenų, dėl to sugerties juostos yra išplitusios. Juostų išplitimą taip pat sąlygoja tarpmolekulinė sąveika. Sužadintos molekulės nespinduliniu keliu pereina į to paties sužadinto elektroninio lygmens nulinį virpesinį polygmenį. Tai vadinama virpesine relaksacija. Nespindulinis šuolis tarp elektroninių lygmenų vadinamas vidine konversija. Po vidinės konversijos molekulė atsiduria  $S_1$  lygmens nuliniame polygmenyje. Iš žemiausio sužadinto energinio



5 pav. Jei žadiname šviesa kurios bangos ilgis yra absorbcijos juostos ribose, tai fluorescencijos spektras liks nepakitęs.

lygmens  $S_1$  galimi trys vyksmai: vidinė konversija  $S_1 \rightarrow S_0$ , interkombinacinė konversija  $S_1 \rightarrow T_1$  (kai sužadinimas pereina į tripletinę būseną, kurioje šis sužadinimas gali gan ilgai išsilaikyti), ir fluorescencija – kai molekulė sugrižta į pagrindinę  $S_0$  būseną, išspinduliuodama šviesos kvantą. Šių perėjimų tikimybė priklauso nuo energijos skirtumo  $\Delta E$  tarp  $S_1$  ir  $S_0$  lygmenų. Kuo  $\Delta E$  didesnis, tuo vidinės konversijos  $S_1 \rightarrow S_0$  tikimybė mažesnė, o fluorescencijos tikimybė didesnė.

Stoksas jau 1852 suformulavo taisyklę, kuri teigė, kad liuminescencijos bangos ilgis yra didesnis nei kūno sugertos šviesos bangos ilgis. Dažniausiai liuminescencijos ir absorbcijos spektrinės juostos išsidėsto taip kaip pavaizduota 5 pav. Eksperimentiškai įrodyta, kad Stokso taisyklė galioja tik dalinai. Daugumos medžiagų absorbcijos ir liuminescencijos spektrai persikloja. Prieštaravimą tarp Stokso taisyklės ir daugelio eksperimentų pašalino Lomeris, suformuodamas bendresnę taisyklę. Joje teigiama, kad liuminescencijos intensyvumo maksimumas yra pasislinkęs absorbcijos maksimumo atžvilgiu į ilgų bangų pusę. Savo fizikiniu turiniu ji skiriasi nuo Stokso taisyklės, kurioje tvirtinama, kad molekulė negali emituoti didesnės energijos kvantų, absorbuodama mažesnius žadinančios šviesos kvantus.

Absorbcijos juosta yra gana plati, todėl mes galime įvairiai varijuoti sužadinančios šviesos bangos ilgiu, tik svarbu, kad žadinančios šviesos bangos ilgis būtų absorbcijos juostos viduje (5 pav.). Tokio pobūdžio bandymai parodė, kad fluorescencijos spektras nekinta tol, kol sužadinančios šviesos bangos ilgis yra absorbcijos juostoje.

## **IX. Liuminescencijos gesimas dėl koncentracijos**

Mažose koncentracijose ( $< 10^{-4}$  mol/l) švytėjimo intensyvumas didėja proporcingai absorbuojančių dalelių skaičiui. Po to, intensyvumas pasiekia maksimumą, o toliau, didinant koncentraciją, intensyvumas nekinta, o dar



padidinus – mažėja. Mažose koncentracijose absorbuotas šviesos intensyvumas auga proporcingai koncentracijai, tai vyksta tol, kol tam tikrame koncentracijų intervale tirpalas absorbuoja ne visą žadinančią šviesą. Toliau didinant koncentraciją, liuminescencija silpnėja. Liuminescencijos gesinimas taip pat priklauso ir nuo molekulių sandaros.

Koncentracinis gesinimas aiškinamas dviem procesais vykstančiais tirpale vienu metu: molekulių absorbcija ir neliuminescuojančių asociantų susidarymu ir energijos migracija nuo sužadintų monomerų nešvytintiems asociantams.

Tokio pobūdžio gesinimo procesai vyksta įvairių organinių junginių tirpaluose. Susidarant asociantams kvantinis našumas sumažėja, bet liuminescencijos spektro pati forma nepakinta.

Energijos perdavimo procesas bus tuo stipresnis, kuo labiau persiklos nešvytinčių asociantų spektrai su monomerinių molekulių liuminescencijos spektrais. Tai susiję su tuo, kad sužadinimo energijos perdavimo nuo molekulės (i) molekulei (j) tikimybė  $W_{ij}$  nusakoma taip:

$$W_{ij} = \frac{3hC^2\varepsilon(\nu')}{3\pi^3n^2N^2\nu^2R_{ij}}, \quad (8)$$

čia  $C$  – medžiagos koncentracija tirpale,  $n$  – lūžio rodiklis,  $N$  – Avogadro skaičius,  $\nu$  – elektroninio šuolio dažnis,  $R_{ij}$  – atstumas tarp  $i$  ir  $j$  molekulių,  $\varepsilon(\nu')$  integralas, kuriame įskaityta sąveikaujančių molekulių absorbcijos ir liuminescencijos spektrų persiklojimas.

$$\varepsilon(\nu') = \frac{\int F(\nu)\varepsilon(\nu)d\nu}{\int F(\nu)d\nu}. \quad (9)$$

Čia  $\varepsilon(\nu)$  – nefluorescuojančių asociantų spektras,  $F(\nu)$  – išreikštas kvantų skaičiumi, monomerų fluorescencijos spektras.

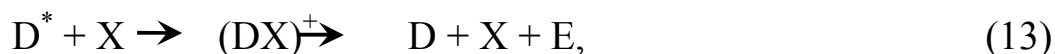
## X. Liuminescencijos gesinimas priemaišomis

Ši gesinimo rūšis pastebėta skystuose tirpaluose. Gesinančios medžiagos gerai oksiduojasi. Geriausias gesintojas yra jodo jonas, blogiausias – chloro jonas. Gesinimo stiprumas priklauso nuo tirpiklio fizikinių ir cheminių savybių.

Stipriausia sąveika tarp molekulių arba kitų švytėjimo centrų vyksta smūgio metu. Kadangi dujų molekulių ir atomų greičiai dideli, tai smūgių metu įvyksta stiprus molekulių centrų suartėjimas ir didėja sąveikos jėgos. Dvi dalelės susilieja ir gali įvykti sužadinimo energijos perdavimas iš sužadintosios molekulės į nesužadintą, t.y. gali įvykti pirmos molekulės švytėjimo gesimas. Energijos, patekusios į antrą dalelę, likimas gali būti įvairus. Jei antra dalelė nešvyti, tai bus gesimas, o jei švyti, tai toks švytėjimas sensibilizuotas.

Dažniausiai gesinimo metu cheminės reakcijos neįvyksta – negaunama naujų junginių, o susidaro nepastovūs kompleksai, kurie įvykus gesinimui, disocijuoja.

Bendriausia gesinimo schema:



Čia  $D^*$  - sužadinta fluorescuojanti molekulė,  $X$  – gesinanti molekulė,  $E$  – išlaisvinta energija.

Organinės medžiagos, žinomos kaip fluorescencijos gesintojai, paprastai yra stiprūs elektronų donoriai arba akceptorai.

## XI. Energinis ir kvantinis našumas

Viena iš svarbiausių liuminescencijos charakteristikų yra našumas, parodantis sužadinimo šviesos virtimo emituojama šviesa efektyvumą. Energinis liuminescencijos našumas nusakomas emituotosios energijos  $E_L$  santykiu su absorbuotąja energija  $E_A$ :

$$\varphi_{en} = \frac{E_L}{E_A}. \quad (10)$$

Kvantiniu liuminescencijos našumu vadinamas medžiagos emituojamų kvantų  $N_L$  skaičiaus santykis su absorbuotųjų kvantų skaičium  $N_A$ :

$$\varphi_{kv} = \frac{N_L}{N_A}. \quad (11)$$

Šie našumai vienas su kitu susiję ryšiu:

$$\varphi_{en} = \frac{E_L}{E_A} = \frac{h\nu_L N_L}{h\nu_A N_A} = \varphi_{kv} \frac{\nu_L}{\nu_A}; \quad (12)$$

Čia  $\nu_A$  ir  $\nu_L$  - absorbuotosios ir emituotosios šviesos vidutiniai dažniai.

Paprastai  $\nu_A > \nu_L$  ir  $\varphi_{en} < \varphi_{kv}$ .

Pagal kvantinio našumo apibrėžimą emituotų per sekundę kvantų skaičius  $N_L$  lygus absorbuotų per sekundę kvantų skaičiui  $N_A$ , padaugintam iš kvantinio našumo:

$$N_L = N_A \varphi = (I_0 - I) \varphi = I_0 (1 - e^{-\alpha c d}) \varphi. \quad (13)$$

Išskleidę eilute ir atmetę aukštesnės eilės narius, gauname:

$$N_L = I_0 \alpha c d \varphi. \quad (14)$$

Plotas po fluorescencijos kreive proporcingas emituotų kvantų skaičiui. Dviejų vienodo sluoksnio storio tirpalų tame pačiame tirpiklyje, esant vienodam geometriniam bandinio ir optinių dalių išdėstymui ir vienodiems sužadavimo šviesos intensyvumams, fluorescencijos intensyvumų santykis lygus:

$$\frac{F_2}{F_1} = \frac{I_0 \alpha_2 c_2 d \varphi_2}{I_0 \alpha_1 c_1 d \varphi_1} = \frac{\varphi_2 D_2}{\varphi_1 D_1} = \frac{N_2}{N_1}. \quad (15)$$

Bandinio emisijos spektras – tai fluorescencijos intensyvumo, išmatuoto kvantais vienetiniam dažnių intervalui, priklausomybė nuo dažnio arba bangų skaičiaus. Jeigu  $N_L$  yra bendras emituotų per laiko vienetą kvantų skaičius, tai  $dN_L/d\nu$  - intensyvumas ties dažniu  $\nu$ , o grafikas, išreiškiantis  $dN_L/d\nu$  priklausomybę nuo  $\nu$ , yra tikras ištaisytasis fluorescencijos spektras. Praktikoje spektrai išreiškiami santykiniais, o ne absoliučiais vienetais.

## XII. Netiesinės sąveikos

Iki lazeriu sukūrimo optikoje ir spektroskopijoje viešpatavo tiesiškumo principas. Pagal šį principą medžiagos atsakas į šviesos poveikį tiesiškai priklauso nuo veikiančiojo šviesos lauko stiprio. Iš to vienareikšmiškai išplaukia, kad optiniai spektriniai parametrai (lužio rodiklis, sugerties koeficientas, liuminescencijos ir sklaidos efektyvumas ir kt.) nepriklauso nuo šviesos srautu intensyvumo ir nusakomi tik medžiagos savybėmis. Šiuo principu iki lazeriu sukūrimo nebuvo abejojama ir manoma, kad jis patikimai patvirtina bandymų ir teorinių darbų duomenis, nagrinėjant šviesos sklaidimą medžiagoje. Žinomi tik keli darbai, kuriuose pateikiama mintis, kad tiesiškumo principas optikoje yra pirmasis artinys aprašant optinius reiškinius.

Lazerių naudojimas optiniame bandyme atskleidė eilę reiškinių, nesuderinamų su tiesiškumo principu. Sukūrus pirmuosius lazerius, aptikti tokie netiesiniai optiniai reiškiniai, kaip harmonikų generavimas, šviesos srautų dažnių sudėtis ir atimtis, priverstinė Ramano sklaida, dvifotonė sugertis.

Tapo aišku, kad pats lazeris – tai optinė sistema, kurioje svarbu vaidmenį vaidina šviesos stiprinimo įsotrinimo reiškinys aktyviojoje terpėje. Prasidėjo platus teorinis ir eksperimentinis šviesos netiesinės sąveikos su medžiaga tyrimas ir sukurti praktiško optinių netiesinių reiškinių taikymo metodai moksle ir technikoje. Atsirado netiesinė optika.

Netiesinė optika suprantama pakankamai intensyviu šviesos pluoštu optika, kai stebimos netiesinės medžiagos optinės savybės. Reikia pabrėžti, kad optiškai netiesinėse terpėse pažeidžiamas pagrindinis tiesinės optikos principas – superpozicijos principas.

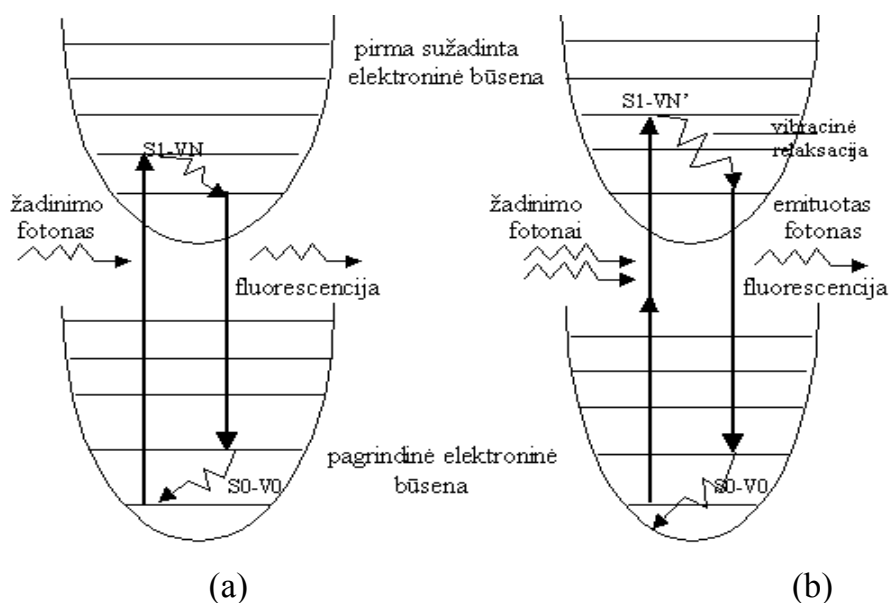
Maria Goppert-Mayer savo daktaro disertacijoje apie dvifotoninių perėjimų teoriją atomuose, numatė daugiafotonio žadinimo procesus. Eksperimentiniai darbai netiesinėje optikoje buvo pradėti Franken'o ir jo grupės

1961 m. sugeneravus antros harmonikos spinduliuotę, jie parodė, kad rubino lazerio  $\lambda$  bangos ilgio spinduliuotė sklisdama kvarco kristalu generuoja antros harmonikos spinduliuotę, kurios bangos ilgis -  $\lambda/2$ . 1963 m. Kaiser'is ir

Garret'as paskelbė pirmą pranešimą apie  $CaF_2:Eu^{2+}$  dvifotonio žadinimo fluorescenciją. Taip pat jie vėliau pademonstravo dvifotonio žadinimo sukeltą organinių dažų fluorescenciją. Dvifotonė spektroskopija tapo svarbia priemone nagrinėjant molekulių sužadintų elektroninių lygmenų struktūras. Goppert-Mayer teorija galutinai buvo patikrinta tik po 32 metų nuo tada kai ši teorija buvo suformuluota. Analogiškai dvifotoniams procesams, buvo aprašyta ir trifotonio žadinimo spektroskopija. Šiuo metu daugiafotonio žadinimo sąvoka paprastai charakterizuoja žadinimo procesus dviem ar didesniu fotonų skaičiumi.

### XIII. Daugiafotonio žadinimo fizikiniai pagrindai

Dvifotonis molekulių žadinimas yra netiesinis procesas. Dvifotonio žadinimo metu yra sugeriami du fotonai, kurių bendros energijos pakanka tam, kad būtų indukuotas molekulės perėjimas į sužadintą elektroninę būseną. Palyginimas tarp vieno ir dviejų fotonų sugerties yra parodytas 6 pav.



6 pav. Jablonskio diagrama vienifotoniam (a) ir dvifotoniam (b) žadinimui. Žadinimas vyksta tarp pagrindinio lygmens ir pirmo sužadinto elektroninio lygmens virpesinių polygmenų. Vienifotonė sugertis vyksta sugėrus vieną fotoną. Pagrindinis (S0-V0) ir sužadintas (S1-VN) lygmenys yra skirtingo lyginumo. Dvifotonė sugertis vyksta per

trumpos gyvavimo trukmės tarpinį lygmenį sugėrus du mažesnių energijų fotonus. Pagrindinis (S0-V0) ir sužadintas (S1-VN') lygmenys yra vienodo lygnumo. Po sužadavimo, fluoroforas relaksuoja į pirmo sužadinto elektroninio lygmens žemiausią vibracinį polygmenį. Vėlesni fluorescencijos procesai abiem relaksacijos atvejais yra vienodi.

Paprastai vienfotonėje fluorescencinių molekulių žadinimo technikoje naudojama ultravioletinė arba matoma spinduliuotė. Žadinimas vyksta tada, kai sugertų fotonų energija sutampa su energiniu intervalu tarp pagrindinės ir sužadintos būsenų. Toks pat šuolis gali būti indukuotas dvifotoniu žadinimu, kurio metu yra sugeriami du mažesnių energijų fotonai. Kvantmechaniškai dvifotonio žadinimo atveju, vienas fotonas sužadina molekulę į tarpinį virtualų lygmenį, o galutinai į sužadintą lygmenį molekulė pereina sugerdama antrą fotoną.

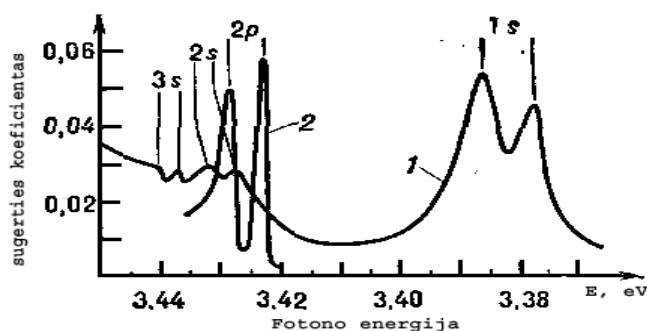
Fluorescencinis žadinimas yra sąveika tarp fluoroforo ir žadinančio elektromagnetinio lauko. Šis procesas yra aprašomas Šredingerio lygtimi į kurios Hamiltonianą įeina dipolinės sąveikos narys:  $\vec{E}_\gamma \cdot \vec{r}$ , kur  $\vec{E}_\gamma$  yra fotono elektrinio lauko vektorius ir  $\vec{r}$  yra padėties operatorius. Ši lygtis gali būti išspręsta pasinaudojus perturbacijos teorija. Pirmo laipsnio sprendinys atitinka vienfotonį žadinimą, daugiafotoniai perėjimai yra aprašomi aukštesnių laipsnių sprendiniais. Dvifotonio žadinimo atveju perėjimo tikimybė tarp molekulės pagrindinės  $|i\rangle$  ir sužadintos  $|f\rangle$  būsenų turi tokią išraišką:

$$P \sim \left| \sum_m \frac{\langle f | \vec{E}_\gamma \cdot \vec{r} | m \rangle \langle m | \vec{E}_\gamma \cdot \vec{r} | i \rangle}{\varepsilon_\gamma - \varepsilon_m} \right|^2 \quad (16)$$

, kur  $\varepsilon_\gamma$  yra fotono energija susijusi su elektrinio lauko vektoriumi  $\vec{E}_\gamma$ , o  $\varepsilon_m$  yra energijų skirtumas tarp būsenos  $m$  ir pagrindinės būsenos. Čia sumavimas vyksta pagal visas  $m$  tarpines būsenas. Galima pastebėti, kad dipolinis operatorius turi nelyginį lyginumą (pvz., sugėrus vieną fotoną pakinta būsenos

lyginumas) ir vienfotonio šuolio momentas  $\langle f | \vec{E}_\gamma \cdot \vec{r} | i \rangle$  apsprendžia pradinės ir galinės būsenų priešingus lyginumus. Dvifotonio šuolio momentas  $\langle f | \vec{E}_\gamma \cdot \vec{r} | i \rangle$  leidžia šuolius tarp vienodo lyginumo būsenų. Kadangi vienfotoniai ir dvifotoniai sugerties procesai turi skirtingas kvantmechanines atrankos taisykles, fluoroforų dvifotonio žadinimo spektrai nebūtinai yra ekvivalentūs jų vienfotonio žadinimo spektrams.

Dėka kitokių atrankos taisyklių, daugiafotonės sugerties spektruose yra naujos informacijos apie medžiagą, kurios nėra vienfotonės sugerties spektruose (7 pav.).



7 pav. ZnO vienfotonės (1 kreivė) ir dvifotonės (2 kreivė) sugerties spektrai. Sutinkamai atrankos taisyklėms, vienfotonės sugerties spektre atsiranda tik S-eksitoninės linijos, o dvifotonės – tik p-eksitoninės linijos

Sugeriamo  $\omega_i$  dažnio spinduliuotės galia tūrio vienetu yra lygi:

$$P_i = \hbar \omega_i W_{12}^{(m)} (N_1 - N_2) \quad (N_{1,2} - \text{dalelių tankis apatinėje ir viršutinėje būsenose, } W_{12}^{(m)} - m\text{-fotonio perėjimo tikimybė) ir yra netiesinė krentančios spinduliuotės intensyvumo funkcija. Daugiafotonė sugertis taip pat priklauso ir nuo spinduliuotės poliarizacijos.}$$

Daugiafotonės sugerties tikimybė staigiai padidėja, jei bent vienas iš spinduliuotės dažnių priartėja prie rezonansinio šuolio į tarpinę būseną arba jei realizuojasi tarpinis daugiafotonis rezonansas.

Monochromatinių elektromagnetinių bangų sklidimo efektus daugiafotonės sugerties atveju patogiau aprašyti netiesinio jautrio tenzoriumi  $\hat{\chi}^{2m-1}(\omega_1, \omega_2, \dots, \omega_m)$ .

Šio tenzoriaus menamoji dalis  $\text{Im} \hat{\chi}^{(2m-1)}$  atsakinga už bangų gesimą m-fotonės sugerties atveju. Atitinkamai realioji dalis  $\text{Re} \hat{\chi}^{(2m-1)}$  charakterizuoja netiesinį lūžio rodiklio pokytį krentančių elektromagnetinių bangų poveikyje.

Daugiafotonės sugerties sąlygomis spinduliuotės sklidimas, atskirų srautų amplitudėms, aprašomas netiesinių lygčių sistema. Jei terpės įėjime vieno iš srautų intensyvumas  $I_{m0}$  mažas palyginus su kitų intensyvumais, tai jo slopimas atstume  $z$  aprašomas formule:

$$I_m = I_{m0} \exp(-x_m I_1 I_2 \dots I_{m-1} z), \quad (17)$$

t.y. jos pavidalas analogiškas vienfotonės sugerties Bugerio dėsniai. Čia  $x_m$  - koeficientas, proporcingas  $\text{Im} \hat{\chi}^{(2m-1)}$  esant  $\omega_m$  dažniui. Esant išsigimusiai pagal dažnį dvifotonei vieno monochromatinio pluoštelio sugerčiai ( $2\omega = \omega_{12}$ ), slopimas yra hiperbolinio pobūdžio:

$$I = \frac{I_0}{1 + x_2 I_0 z}, \quad x_2 = \frac{8\pi^2 \omega}{cn} \text{Im} \chi^{(3)}(\omega), \quad (18)$$

( $n$  – lūžio rodiklis).

Iš pateiktų formulių matosi, kad daugiafotonė sugertis didėja didėjant krentančios spinduliuotės intensyvumui. Tuo yra paaiškinamas taip vadinamas užtemimo efektas: skaidrūs kūnai prie tam tikro dažnio silpno srauto spinduliuotės, didėjant intensyvumui dėl stiprėjančios dvifotonės sugerties gali tapti stipriai sugeriančiais. Tolimesnis intensyvumo didinimas gali iššaukti kūno praskaidrėjimą susijusį su dvifotonio perėjimo įsisotinimu.

Daugiafotonės sugerties procesai yra labai svarbūs kvantinėje elektronikoje, netiesinėje optikoje, fotochemijoje ir t.t. Jie naudojami lazerinių terpių optiniam kaupinimui, trumpų šviesos impulsų trukmių matavimui, lazerinės spinduliuotės parametrų valdymui, selektyviam atomų ir molekulių

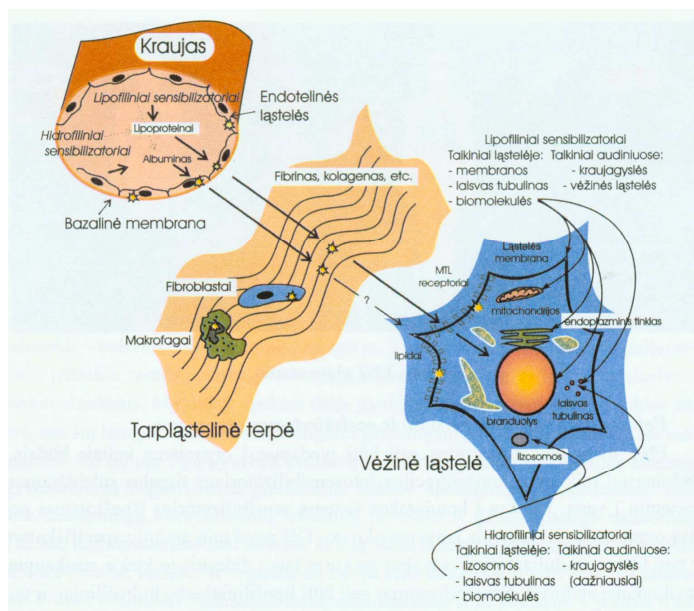


poveikiui. Daugiafotonės sugerties pagrindu yra sukurta visa eilė netiesinės spektroskopijos metodų, kurie plačiai taikomi atomų ir molekulių kvantinių šuolių tyrinėjimuose bei kitur.

#### XIV. Fotosensibilizuota navikų terapija

Gyvuose organizmuose vyksta įvairios fotocheminės reakcijos, kurios yra svarbios ar net esminės jų išgyvenimui. Tačiau šviesa gali būti ir pražūtinga gyvoms ląstelėms ir organizmams. Visos fotocheminės reakcijos prasideda specifiniams biologiniams pigmentams sugėrus šviesos fotonus (pirmasis fotochemijos dėsnis, kurį 1817 metais teoriškai suformulavo mūsų tėvynainis T. Grotus (T. Grotthuss), o 1843 metais eksperimentiškai pagrindė amerikietis Dž. Dreiperis (D. Draper).

Ultravioletinė saulės spinduliuotės dalis yra labai pavojinga gyviems organizmams, nes šios spektrinės srities šviesą labai gerai sugeria svarbiausi ląstelių komponentai - baltymai, lipidai ir nukleorūgštys, bet tik neženkli šios spinduliuotės dalis pasiekia žemės paviršių, kadangi ją sulaiko atmosfera, o ypač - stratosferos ozono sluoksnis. Matomoji spektro dalis gyviems organizmams nedaro jokios žalos, nes šių bangos ilgių šviesos nesugeria genetinę informaciją perduodančios molekulės. Be to, per ilgą gyvybės evoliucijos periodą



8 pav. Sensibilizatorių pernaša, kaupimasis bei galimi taikiniai audiniuose ir ląstelėse.

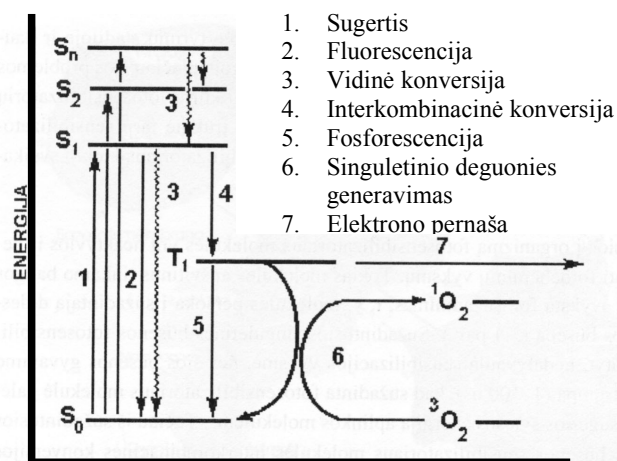
gamta nuolat saulės šviesoje gyvenantiems organizmams sukūrė apsauginius mechanizmus. Odą nuo kenksmingų ultravioletinių spindulių poveikio iš dalies

apsaugo melaninas. Tačiau, tarpininkaujant tam tikroms šviesą sugeriančioms medžiagoms - fotosensibilizatoriams, ląstelės ar organizmai tampa jautrūs šviesai ir gali žūti. Šis jautrumo šviesai didinimas vadinamas fotosensibilizavimu ir jo pasekmė - įvairūs foto-fizikiniai, fotocheminiai ir fotobiologiniai vyksmai šviesos nesugeriančiame substrate.

Fotosensibilizuota navikų terapija (FNT) pagrįsta kai kurių fotosensibilizatorių savybe kauptis navikiniuose audiniuose ir, apšvitinus juos tinkamo bangos ilgio šviesa, sukelti šių audinių ląstelių pažaidas. FNT eiga apima kelis etapus: sensibilizatorius suleidžiamas į organizmą, po kelių ar keliolikos valandų (nelygu sensibilizatoriaus prigimtis) navikas apšvitinamas šviesa, kurią gerai sugeria fotosensibilizatoriaus molekulės, o praėjus dar kuriam laikui atliekama kontrolė ir pašalinami nekrotizavę audiniai. Šviesos sužadintas sensibilizatorius inicijuoja fotochemines reakcijas, kurių pasekmė - žalingų ląstelių veiklai produktų susidarymas ir navikinių audinių destrukcija.. Tačiau kad gydymas būtų sėkmingas, nuo sensibilizatoriaus suleidimo iki navikinio audinio nekrozės turi įvykti visa fiziologinių, biocheminių, fotofizikinių ir fotocheminių vyksmų seka.

### Fotosensibilizatoriaus pernaša ir pasiskirstymas organizme

FNT metu sensibilizatorius gali būti įvedamas į organizmą keliais būdais. Dažniausiai reikiamos koncentracijos fotosensibilizatoriaus tirpalas suleidžiamas pacientui į veną. Patekęs į kraujotakos sistemą sensibilizatorius išnešiojamas po visą organizmą (8 pav.) ir



9 pav. Jablonskio diagrama, parodanti elektroninius šuolius sužadintoje fotosensibilizatoriaus molekulėje.

jame pasiskirsto. Dėl navikinių audinių specifiškumo ir tam tikrų sensibilizatoriaus savybių po kurio laiko didesnis jo kiekis susikaupia navikiniame audinyje. Sensibilizatoriai gali būti lipofiliniai arba hidrofiliniai, ir tai lemia jų lokalizaciją audiniuose ir ląstelėse (8 pav.). FNT taikiniai būna labai įvairūs - parenkant tinkamų savybių sensibilizatorius galima sukelti pažaidas įvairiose ląstelių organelėse.

#### Fotosensibilizatoriaus susikaupimas/išsilaikymas navike

Selektyvus sensibilizatoriaus susikaupimas navikiniame audinyje yra vienas iš pagrindinių veiksnių, sąlygojančių naviko suardymą minimaliai pažeidžiant sveikus audinius. Todėl šis gydymo metodas kelia vis didėjantį susidomėjimą. Tiek chirurginis, tiek chemoterapinis bei spindulinis navikinių susirgimų gydymo metodai nėra pakankamai selektyvūs, dažnai pašalinamas ar sunaikinamas ne visas navikas ir tik iš dalies pristabdomas navikinių darinių formavimasis. Dėl to kai kuriais atvejais atsiranda antrinių navikų - recidyvų. Be to, spindulinis gydymo metodas visada susijęs su rizika pažeisti sveikus audinius ar inicijuoti kitoki organizmui žalingą poveikį. Cheminių preparatų poveikis irgi labai priklauso nuo atskiro individo, organizme vykstančių metabolinių procesų, todėl ne visada pasiseka parinkti tinkamas priešnavikinių vaistų dozes ir pasiekti teigiamą jų poveikį. Selektvus fotosensibilizatorių kaupimasis navikiniuose audiniuose, pastebėtas XX amžiaus pradžioje, vis dar yra nedaug į priekį pažengusioje tyrimų stadijoje ir daugiausia remiasi empiriniais stebėjimais.

#### Fotosensibilizatoriaus fotosužadinimas

Patekusios į organizmą fotosensibilizatoriaus molekulės yra neaktyvios ir negali inicijuoti fotocheminių vyksmų. Tokias molekules apšvitinus tinkamo bangos ilgio šviesa, įvyksta fotosužadinimas, t. y. molekulės peršoka į sužadintą didesnės energijos būseną (9 pav.). Sužadintosios singuletinės būsenos fotosensibilizatorius, matyt, nedalyvauja sensibilizacijos vyksme, nes šios būsenos gyvavimo trukmė per trumpa (1-100 ns), kad sužadinta fotosensibilizatoriaus molekulė galėtų perduoti sugertos šviesos energiją

aplinkos molekulėms. Tačiau iš sužadintosios singuletinės būsenos sensibilizatoriaus molekulės interkombinacinės konversijos keliu gali persokti į tripletinę būseną, kurios gyvavimo trukmė yra ilgesnė (net iki kelių milisekundžių). Šioje būsenoje sensibilizatorius jau gali inicijuoti fotocheminius procesus, sukeliančius vėlesnę ląstelės žūtį.

Sensibilizatoriaus molekulės sugebėjimas persokti į tripletinę būseną yra apibrėžiamas tripleto susidarymo kvantiniu našumu, kuris efektyviam sensibilizatoriui turėtų būti artimas vienetui.

### Sužadinimo energijos pernaša biomolekulėms, chemiškai aktyvių tarpinių darinių generavimas

Sąveikaujant sužadintam sensibilizatoriui su audinio biomolekulėmis, galimi du pagrindiniai reakcijų tipai. Pirmojo tipo reakcijose sensibilizatorius tiesiogiai sąveikauja su biomolekule. Tos sąveikos metu vyksta elektrono arba vandenilio atomo pernaša ir susidaro laisvieji radikalai. Antrojo tipo reakcijose sužadintosios tripletinės būsenos sensibilizatorius sąveikauja su audinių molekulinio deguonimi, perduodamas jam sužadavimo energiją.

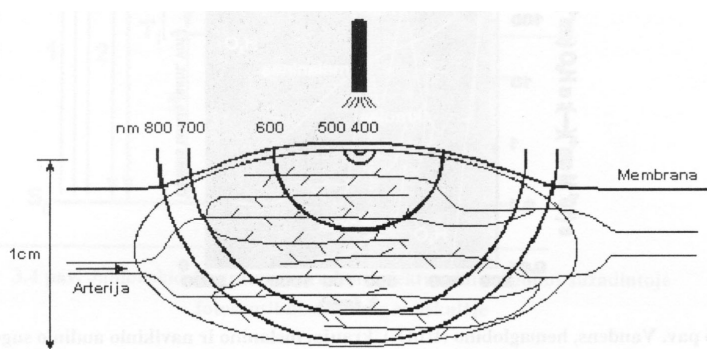
Dėl sužadavimo energijos pernašos susidarę laisvieji radikalai yra labai aktyvūs ir inicijuoja biomolekulių oksidacijos reakcijas, sukeliančias vėlesnę ląstelių žūtį. Sužadinta deguonies molekulė taip pat yra chemiškai labai aktyvi, oksiduoja biomolekules ir, sutrikdydama ląstelių metabolizmą, sukelia ląstelių žūtį. Daugelis fotosensibilizatorių gali generuoti tiek laisvuosius radikalus, tiek ir aktyvias deguonies formas. Tačiau į klausimą, kas vis dėlto sukelia ląstelės žūtį dar neatsakyta. Vyrauja nuomonė, kad porfirinų fototoksinis poveikis biomolekulėms FNT metu yra sąlygotas aktyvių deguonies formų, generuojamų fotosensibilizacijos metu.

### Šviesos įsiskverbimo gylis biologiniame audinyje

Šviesą sugeria ne tik fotosensibilizatorius, bet ir pats švitinamas audinys. Audinio sugertį nulemia šviesą sugeriančios medžiagos (vanduo, pigmentai,

hemoglobinas, baltymai, lipidai ir t. t.). Daugelis organinių molekulių ir vanduo smarkiai sugeria šviesą ultravioletinėje (UV) spektro srityje. Nukleorūgštys ir baltymai turi intensyvią sugerties juostą 240-290 nm intervalu, o infraraudonuosius spindulius gerai sugeria vanduo. Vadinasi būtina ieškoti tokios spektro srities, kurioje audinys sugertų mažiausiai šviesos, o fotosensibilizatorius toje spektro srityje turėtų intensyvią sugerties juostą. Tuomet padidėja galimybė toje spektro srityje sužadinti daugiau sensibilizatoriaus molekulių, drauge paveikti gilesnius navikinio audinio sluoksnius ir padidinti FNT efektyvumą. Kadangi hemoglobino sugertis smarkiai susilpnėja, kai  $\lambda > 550$  nm, šviesos skvarbumo į audinius gylis padvigubėja didėjant bangos ilgiui nuo 550 iki 630 nm. Ilgesnės šviesos bangos (iki 700 nm) išiskverbia į audinius dvigubai giliau. Dar ilgesnių bangų skvarbumo gylis padidėja tik 10% (10 pav.).

Taigi audinys silpniausiai sugeria šviesą 650-1000 nm spektro srityje. Ši sritis vadinama „fototerapiniu langu“, nes tokių bangos ilgių šviesa į audinius prasiskverbia giliausiai (audinys yra skaidriausias šviesai)..



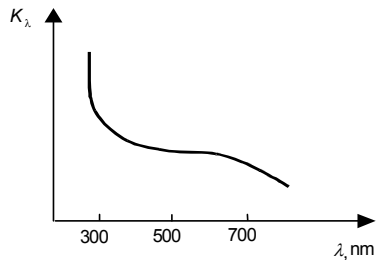
10 pav. Įvairių bangos ilgių šviesos prasiskverbimo į audinį gylis

Taigi labai svarbu, kad fotosensibilizatoriai turėtų stiprią šviesos sugertį audinių optinio laidumo srityje ( $\lambda > 600$  nm). Tačiau pageidautina, kad jie neturėtų intensyvių sugerties juostų regimosios šviesos intervalu nuo 350 iki 600 nm, nes tuomet liekamasis odos jautrumas šviesai būtų mažesnis .

#### Kai kurių biologinių objektų sugerties spektrai

Su šviesos sugertimi yra susiję daugelis biologinių procesų, iš jų ir *fotosintezė* – neorganinių medžiagų (vandens ir anglies dvideginio) virtimas organinėmis (angliavandeniais). Fotosintezė vyksta veikiant Saulės šviesai,

kurią sugeria turintys chlorofilo augalų audiniai. Fotosintezės reakcijos schema yra tokia:

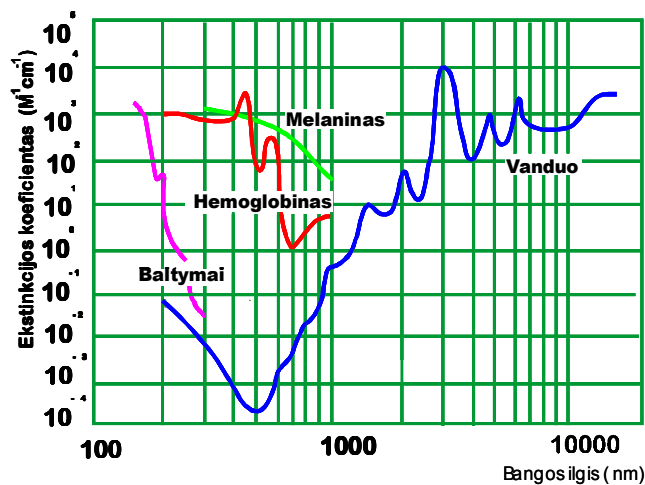


11 pav. Žmogaus odos sugerties spektras

Ypač intensyviai fotosintezė vyksta, veikiant raudoniesiems spinduliams ( $\lambda \approx 0,68 \mu\text{m}$ ). Apskaičiuota, kad Žemės augalai fotosintezės būdu per metus pagamina apie 450 mlrd. tonų organinių medžiagų ir apie 500 mlrd. tonų deguonies.

Taigi augmenija yra ne tik žmogaus ir gyvulių maisto bei kuro šaltinis, bet ir savotiškas oro grynintojas: fotosintezės metu iš atmosferos oro augalai sugeria anglies dvideginį ir praturtina jį deguonimi.

Žmogaus odos sugerties spektras parodytas 11 paveiksle. Ultravioletinėje dalyje sugerties koeficientas didelis, ir oda sugeria spinduliuotę savo viršutiniaisiais sluoksniais. Regimosios šviesos dalyje sugerties koeficientas mažesnis ir beveik pastovus iki raudonosios spektro dalies.



12 pav. Kai kurių biologinių objektų sugerties spektrai

Kelių paprasčiausių biologinių objektų molinio ekstinkcijos koeficiento priklausomybė nuo bangos ilgio pavaizduota 12 paveiksle. Dauguma organinių

molekulių stipriai sugeria šviesą ultravioletinėje spektro dalyje. Baltymai, sudarantys 15–20% visų ląstelių, dažniausiai sugeria šviesą (elektromagnetinę energiją) taip pat šioje srityje, paprastai jų sugerties smailė būna ties 280 nm aplinka. Hemoglobinei sugertis vyksta regimojo spektro dalyje (turi dvi smailes žaliojoje ir geltonojoje spektro dalyse). Baziniame odos pigmente – melanine sugertis vyksta ties regimajame spektro dalimi, bet labiau yra pasislinkusi į UV sritį.

## **XV. Fluoroforų prigimtis**

Fluoroforai – tai natūralūs arba įvesti iš išorės fluorescuojantys audinio komponentai. Fluoroforai pagal savo pobūdį skirstomi į tokiomis grupes:

- Endogeniniai fluoroforai

Endogeniniai fluoroforai atsakingi už natūralaus audinio savąją fluorescenciją. Iš jų galima paminėti sekančius:

a) Baltymai. Triptofanas - labai intensyviai fluorescuojanti aminorūgštis baltymuose. Apie 90% visos baltymų fluorescencijos priklauso triptofano liekanoms. Be to, šis endogeninis fluoroforas labai jautrus aplinkos poliškumui. Baltymai sugeria šviesą apie 280nm, o jų fluorescencijos spektrų smailės yra 320 – 350nm ruože.

b) Nukleininės rūgštis. Nukleotidai ir nukleininės rūgštys dažniausiai nefluorescuoja. Bet yra ir išimčių, tRNA<sup>phe</sup> iš mielių turi intensyviai fluorescuojanti pagrindą, visiems žinoma kaip Y-pagrindas, kuris turi fluorescencijos smailę arti 470nm, o gyvavimo trukmė ~6 ns.

c) Kofaktoriai. Fermentai - baltyminės medžiagos, pagreitinančios chemines reakcijas. Yra fermentų, kurių veikimui reikalingas ne tik baltymas, bet ir nebaltyminė dalis - kofaktorius. Kofaktoriai skirstomi į:

- kofermentus
- prostetinę grupę

d) Riboflavinai ir FAD. Riboflavinai, FMN (flavinmononukleotidas) ir FAD (flavinadenindenukleotidas) 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.

- Audinyje susintetinti fluoroforai

Dažniausiai atsiranda po išorinio pirmtakės molekulės įvedimo t.y 5-amino levulininės rūgšties (ALA) įvedimas į organizmą pagamina protoporfiriną IX (PpIX). Tiek ALA, tiek PpIX yra natūralūs žmogaus organizmo kraujo hemo biosintezės tarpiniai produktai.

- Egzogeniniai fluoroforai ir biomarkeriai

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

a) Fluoresceino ir rodamino izocianatai ir izotiacionatai. Šiuos dažus plačiai naudoja baltymams žymėti. Imunoglobulinai pažymėti fluoresceinu – komerciniai reagentai; juos dažnai naudoja fluorescencinėje mikroskopijoje. Būtent šiais medžiagais parenka dėl to, kad jos turi didelį kvantinį našumą ir yra fotochemiškai stabilios. Be to dėl didelių fluorescencijos ir sugerties bangos ilgių, stebima mažesnė foninė fluorescencija, todėl nereikia naudoti kvarcinę optiką. Izocianatinė ir izotiacionatinė grupės dažniausiai būna arba meto-, arba para- padėtyje karboksi-grupės atžvilgiu. Komerciniai žymėtieji reagentai – 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 daro 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. Jų pagalba įvertina vidinį dvigubų sluoksnių klampumą, pagal fluorescencijos poliarizuotumo pokyčius.

e) Nukleininės rūgštys. Įvedant etileninį tiltelį ATP ir jo darinių fluorescencija tampa žymiai intensyvesnė. Tokie dariniai kaip  $\epsilon$ -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.

## **XVI. Dvifotonė fotosensibilizacija**

Modernioje klinikinėje diagnostikoje vis plačiau naudojami optiniai spektroskopiniai metodai, kurie yra palyginti paprasti, neinvaziniai, bei įgalina operatyviai rinkti bei apdoroti biologinius audinius charakterizuojančią informaciją. Dažniausiai jie remiasi pasirinktų spektroskopinių audinių savybių,

geriausiai atspindinčių audinių struktūros ypatybes, registravimu ir analize arba selektyvių norimam audinio tipui fluorescencinių žymeklių paieška ir taikymu.

Regimosios šviesos prasiskverbimą į biologinius audinius riboja endogeninių pigmentų sąlygojama sugertis bei šviesos sklaida audiniuose. Dėl sumažėjusios sklaidos ir biologiniams audiniams būdingo optinio skaidrumo “lango” gilesnius audinių sluoksnius efektyviau pasiekia infraraudonieji spinduliai. Infraraudonųjų spindulių atspindžiu bei interferencija grindžiamas audinių vaizdinimo metodas - optinė koherentinė tomografija,- įgalina registruoti mechaninės prigimties bendruosius audinių struktūros ir faktūros skirtumus.

Tačiau siekiant užtikrinti selektyvų specifinių endogeninių ar egzogeninių fluoroforų fluorescencijos sužadimą, o ypač gilesniuose audinių sluoksniuose, reikalinga nauja metodika. Pastaraisiais metais mokslinėje literatūroje skelbiami tyrimų rezultatai rodo, kad tokia metodika galėtų būti dvifotonis žadinimas infraraudonaisiais spinduliais. Dvifotonis fluorescencijos žadinimas pasižymi keletu svarbių ypatybių. Optiškai fokusuojant lazerinę spinduliuotę ir parenkant energinius spinduliuotės parametrus, reikiamą intensyvumą galima užtikrinti nedideliame erdviniame segmente, taip išvengiant fluoroforų suardymo šviesa tyrimų metu. Pavieniai infraraudonosios spinduliuotės fotonai prasiskverbia pro jiems skaidrų biologinį audinį, nes jų energijos nepakanka aplinkoje esančių molekulių sužadimui. Tačiau dviejų fotonų, pasiekusių molekulę vienu metu, turimas energijos kiekis yra pakankamas sužadinti biologiniame audinyje esančių molekulių fluorescenciją. Jei fluorescuojančios molekulės yra selektyviai susikaupę ieškomo tipo (pvz. navikiniame) audinyje, jo lokalizaciją ir apimtį galima operatyviai nustatyti spektroskopiniais metodais ar optinio vaizdinimo sistemomis.

Paviršinių ikivėžinių odos darinių, daugeliui vėžinių susirgimų tipų gydymui, o taip pat kitose medicinos srityse pasaulyje vis plačiau diegiamas metodas – fotosensibilizuota šviesos terapija. Pagrindiniai fotosensibilizuotoje

terapijoje naudojami komponentai – sensibilizatorius ir jo sugerties spektrinei sričiai pritaikytas šviesos šaltinis. Audinius apšviečiant tinkamai parinkta spinduliuote, sensibilizatoriaus molekulės, dažniausiai besikaupiančios ligos pažeistuose audiniuose, gali ją sugerti ir perduoti energiją aplinkoje esančioms molekulėms, taip sukeldamos fotochemines reakcijas, kurios leidžia sunaikinti nenormalų audinį. Pastaraisiais metais laboratoriniai tyrimai aktyviai vykdomi su bene 14 skirtingų junginių, iš jų penki patvirtinti kaip vaistiniai preparatai - fotosensibilizatoriai klinikiniam naudojimui Europos Sąjungoje, bei daugelyje kitų šalių.

Tačiau įprasti porfirininio tipo fotosensibilizatoriai santykinai silpnai sugeria šviesą ilgabangėje regimojoje srityje, be to, jų sugerties juostų spektrinė padėtis dažnai nėra optimali atsižvelgiant į biologinių audinių pralaidumo charakteristikas. Tai vienas veiksnių, stabdančių fotosensibilizuotos terapijos taikymo galimybių plėtrą ir ribojančių jos galimų taikinių lokalizaciją paviršiniuose audinių sluoksniuose. Be to, fotosensibilizatoriaus susikaupimas pažeistuose navikiniuose audiniuose ne visuomet būna pakankamai selektyvus, kad švitinimo metu būtų galima išvengti aplinkinio sveiko audinio pažaidų. Vienas perspektyviausių metodų siekiant išvengti šių trūkumų, - sukelti fotochemines reakcijas biologinėse sistemose dvifotonio žadinimo būdu.

Pritaikius dvifotonį žadinimą infraraudonaisiais spinduliais, būtų galima keliais aspektais reikšmingai pagerinti fotosensibilizuotų reakcijų sužadinimą biologinėse aplinkose. Fotocheminių reakcijų sužadinimas taptų įmanomas gilesniuose audinių sluoksniuose. Taigi, būtų galima paveikti didesnės apimties ar giliau esančius darinius. Žadinimas infraraudonaisiais spinduliais dvifotone metodika įgalintų pagerinti pažaidų zonos selektyvumą, lokalizuojant ją didelio spinduliuotės intensyvumo srityje. Tai leistų išsaugoti nepažeistus paviršinius sveikus audinius, tuo pat metu sukelti pažaidas, pvz., giliau esančiuose navikuose. Be to, kompleksiskai reguliuojama pažaidų zonos lokalizacija, apsprendžiama fotosensibilizatoriaus susikaupimo selektyvumo ir spinduliuotės

poveikio selektyvumo taikant dvifotonio žadinimo metodiką, leistų išvengti fotopažaidų tais atvejais, kai sveiko audinio pažaidos būtų kritinės paciento sveikatai, pvz., taikant fotosensibilizuotą terapiją akies ar smegenų audinių zonose.

Tačiau, kadangi dvifotonės sugerties tikimybė yra daugelį kartų mažesnė nei įprastos šviesos sugerties, tad efektyviai dvifotonį sužadinimą galima sukelti tik esant dideliems žadinančios spinduliuotės intensyvumams. Tokio intensyvumo spinduliuotė pasiekama tik lazeriniais impulsiniais šviesos šaltiniais.

#### **4. Praktinės užduotys.**

1. Apskaičiuoti šviesos fazinį greitį stikle.
2. Raudonai 635 nm. šviesai sklindant sugeriančia terpe jos intensyvumas sumažėja du kartus koks šios terpės pralaidumas ir optinis tankis.
3. Kas tai yra:
  - a. sugerties spektras;
  - b. fluorescencijos spektras;
  - c. emisijos spektras;
  - d. žadinimo spektras;
4. Kiek kartų sumažės praėjusios šviesos intensyvumas, du kartus padidinus šviesos sklidimo kelią.
5. Kodėl fotosensibilizatorius fluorescencijos spektras yra pasislinkęs, sugerties spektro atžvilgiu, į ilgesnių bangų sritį?
6. Kokiomis ir kodėl savybėmis pasižymi „geras“ fotosensibilizatorius:
  - a. trumpa tripletinės būsenos gyvavimo trukmė;
  - b. ilga tripletinės būsenos gyvavimo trukmė;
  - c. pirmos sužadintos būsenos energetinis lygmuo yra aukščiau tripletinės būsenos energijos lygmens;

- d. pirmos sužadintos būsenos energetinis lygmuo yra žemesnis tripletinės būsenos energijos lygmens;
- e. aukštas kvantinis našumas;
- f. didelė kaina;
- g. toksiškas;

## **5. Aparatūra ir darbo metodika.**

Tiriamų bandinių sugerties ir fluorescencijos spektrai registruojami Varian 50 Scan UV-Visible spektrofotometru 13pav. ir Cary Eclipse fluorescencijos spektrofotometru 14pav..



13 pav Varian 50 Scan UV-Visible spektrofotometras

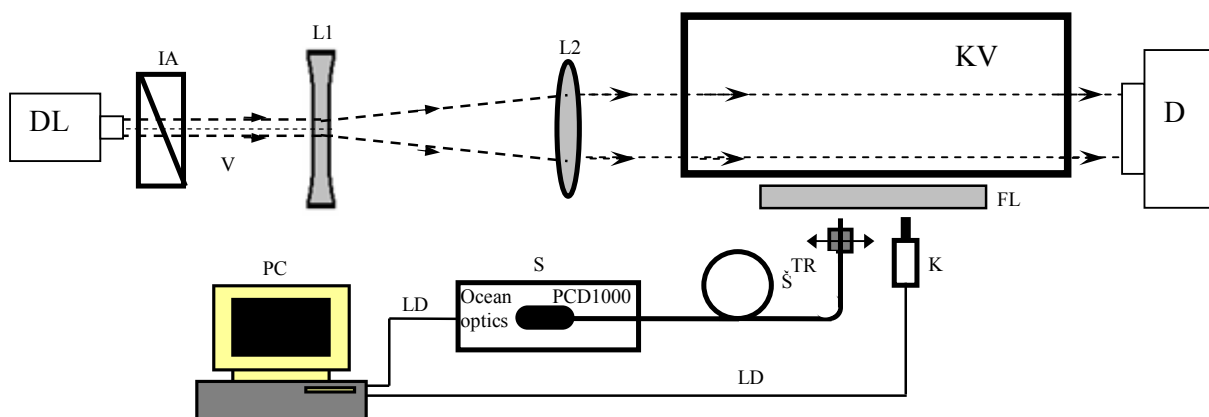


14 pav Cary Eclipse fluorescencijos spektrofotometru.

Varian 50 Scan UV-Visible spektrofotometro ir Cary Eclipse Fluorescencijos spektrofotometro naudojimo instrukcija pateikta prietaiso apraše.

Optinis stendas, fluorescencijos erdviniam pasiskirstymui matuoti, esant klasikiniam fotosensibilizatorių žadinimui ir kaip sklaidanti terpė įtakoja fotosensibilizatorių erdvinį žadinimą, pavaizduotas 15 pav. Fluorescencijos erdviniam pasiskirstymui matuoti naudojamas 200 mW, 635 nm bangos ilgio puslaidininkinis lazeris.

Fluorescencijos spektrai bei fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymas registruojami ties priekine kiuvetės sienele keičiant transliacinį staliu šviesolaidinio spektrometro įvado padėtį išilgai žadinančio šviesos srauto. Fluorescencijos spektrai ir fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymas ties priekine kiuvetės sienele matuoti su šviesolaidiniu firmos “OCEAN OPTICS” fluorimetru. Firmos “OCEAN OPTICS” fluorimetro naudojimo instrukcija pateikta fluorimetro apraše. Fluorescencijos erdvinis pasiskirstymas matuojamas “Leica DSC290“ CCD kamera.



15 pav. fluorescencijos spektrų bei fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymo modelinėje sistemoje matavimų stendas

(S – spektrofotometras; PC – personalinis kompiuteris; Š – šviesolaidis;; K – CCD kamera; TR – transliacinis stalielis, FL – atkirtimo filtras, KV – 5 cm kiuvetė, DL – diodinis lazeris, L1 – sklaidomasis lęšis, L2 – glaudžiamasis lęšis, IA – intensyvumo atenuatorius, D – energijos matuoklis

Puslaidininkinio lazerio išspinduliuotos šviesos intensyvumas keičiamas šviesos intensyvumo atenuatoriumi. Išspinduliuotos šviesos intensyvumas registruojamas šviesos energijos matuokliu. Sklaidančios terpės gamybai, naudojamas pienas. Sklaidančia terpe išsklaidytos šviesos kiekis priklauso nuo

pieno koncentracijos. Kuo labiau skiesime pieną vandeniu tuo bus mažiau išsklaidytos šviesos. Sklaidos gesinimo koeficientui įvertinti naudosime Lamberto-Bugerio dėsnį:

$$I = I_0 \exp\left(-L\left(\sigma(\lambda)n + \varepsilon^R(\lambda) + \varepsilon^M(\lambda)\right)\right); \quad (19)$$

$\sigma(\lambda)$  - sugerties pagavos skerspjūvis. Kadangi pienas visą šviesą išsklaido ir nepasižymi sugertimi tai sugerties pagavos skerspjūvis lygus 0.

$\varepsilon^M(\lambda)$  - Mi sklaidos gesinimo koeficientas. Ši sklaida vyks jei sklaidančios dalelės yra didelės ( arba labai mažos  $<0.01 \lambda$ ).

$\varepsilon^R(\lambda)$  - Relėjaus gesinimo koeficientas

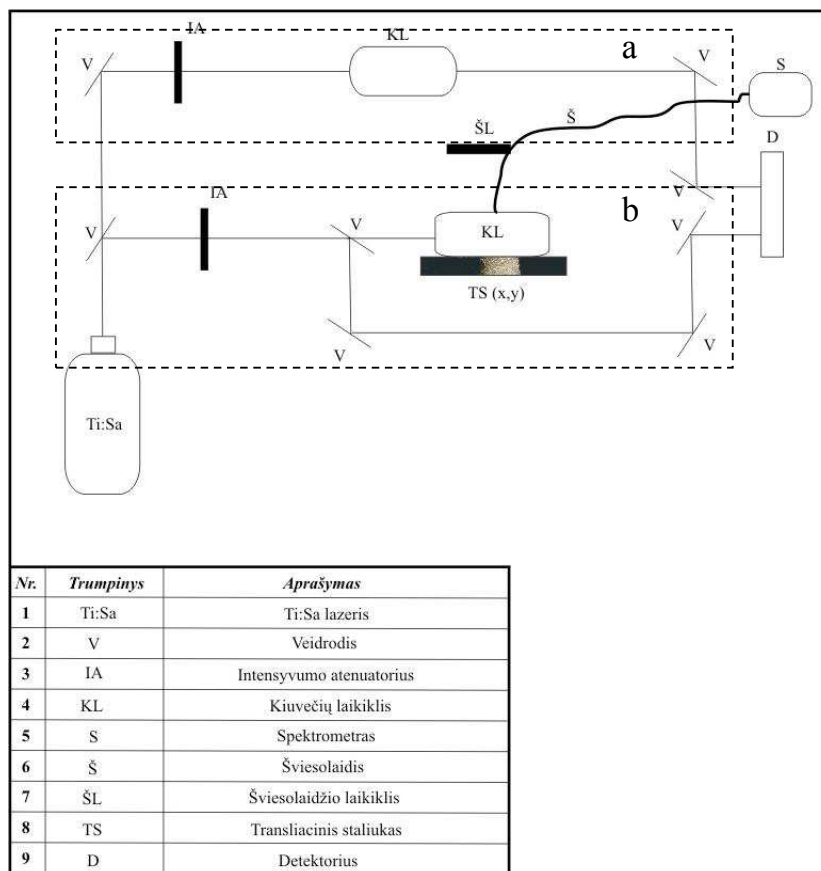
$I$  – Puslaidininkinio lazerio emituotos šviesos intensyvumas, už kiuvetės su sklaida.

$I_0$  - Puslaidininkinio lazerio emituotos šviesos intensyvumas, už kiuvetės be sklaida.

Modifikuotas Lamberto-Bugerio dėsnis sklaidos gesinimo koeficientui nustatyti:

$$I = I_0 \exp\left(-L\left(\varepsilon^R(\lambda)\right)\right). \quad (20)$$

Dvifotonei fluorescencijai užregistruoti ir dvifotoniam žadinimui naudojamos spinduliuotės sklaidos įvertinimui naudojamo komplekso principinė schema pavaizduota 16pav.



16 pav. Dvifotonei fluorescencijai registravimo ir dvifotoniam žadinimui naudojamos spinduliuotės sklaidos įvertinimo stendo principinė schema.

Stendas pavaizduotas 16 pav. susideda iš dviejų dalių:

**a dalis** skirta dvifotoniui žadinimui naudojamos spinduliuotės sklaidos, įvairiose terpėse, įvertinimui.

Dvifotoniui žadinimui naudojamos spinduliuotės sklaidos įvertinimui, taip pat naudojamas pienas. Sklaidos gesinimo koeficientui įvertinti naudosime Lamberto-Bugerio dėsnį:

$$I = I_0 \exp\left(-L\left(\sigma(\lambda)n + \varepsilon^R(\lambda) + \varepsilon^M(\lambda)\right)\right); \quad (21)$$

$I$  – Ti:Sa emituotos šviesos intensyvumas, šviesai praėjus pro kiuvetę su sklaida.

$I_0$  – Ti:Sa emituotos šviesos intensyvumas, šviesai praėjus pro kiuvetę be sklaidos.



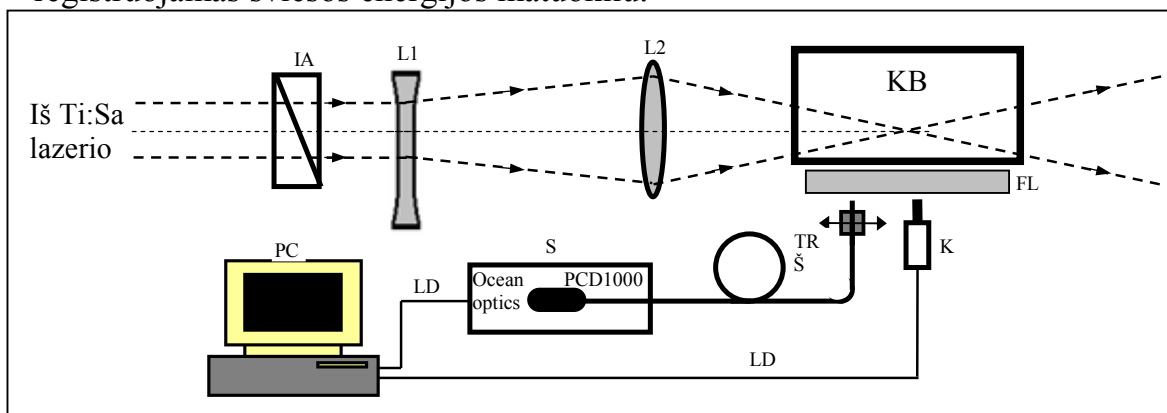
Modifikuotas Lamberto-Bugerio dėsnis sklaidos gesinimo koeficientui nustatyti:

$$I = I_0 \exp(-L(\varepsilon^R(\lambda))). \quad (22)$$

**b dalis** skirta fluorescencijos sužadanimui dvifotoniu būdu. Detalesnė šios dalies schema pavaizduota 17 pav.

Šviesos srautas išspinduliuotas titano safyro lazerio, lęšių pagalba, buvo formuojama į kūgio formos žadinančios šviesos srautą, kurio viršūnė nukreipiama į 5 cm ilgio kiuvetės centrą. Fluorescencijos spektrai bei fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymas registruojami ties priekine kiuvetės sienele keičiant transliacinį stalielį šviesolaidinio spektrometro įvado padėti išilgai žadinančio šviesos srauto. Fluorescencijos spektrai ir fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymas ties priekine kiuvetės sienele matuoti su šviesolaidiniu firmos “OCEAN OPTICS” fluorimetru. Fluorescencijos erdvinis pasiskirstymas matuotas firmos “Leica DSC290“ CCD kamera. Ti:Sa lazerio naudojimo instrukcija pateikta Ti:Sa lazerio apraše.

Ti:Sa lazerio išspinduliuotos šviesos intensyvumas keičiamas šviesos intensyvumo atenuatoriumi. Išspinduliuotos šviesos intensyvumas registruojamas šviesos energijos matuokliu.



17 pav. Fluorescencijos spektrų bei fluorescencijos intensyvumo matavimų schema, žadinant dvifotoniškai

(S – spektrofotometras; PC – personalinis kompiuteris; LD – laidas; Š – šviesolaidis; KB – kiuvetė su bandiniu; L1 – sklaidomasis lęšis; L2 – glaudžiamasis lęšis; K – CCD kamera; IA – intensyvumo atenuatorius, TR – transliacinis stalielis, FL – atkirtimo filtras)

## **6. Darbo eiga**

### Fotosensibilizatorių sugerties ir fluorescencijos spektrų matavimai

1. Išmatuoti Hemato porfirino ir rodamino sugerties spektrus. Matuojant sugertį, fotosensibilizatorių koncentracija parenkama taip, kad sugertis ties visais bangos ilgiais neviršytu 1 optinio tankio. Gautus duomenis sunormuoti ir pavaizduoti grafiškai.
2. Išmatuoti Hemato porfirino ir rodamino fluorescencijos spektrus. Matavimams naudojami tų pačių koncentracijų fotosensibilizatoriai kaip ir sugerties matavimuose. Gautus duomenis sunormuoti ir pavaizduojami grafiškai.
3. Sugerties ir fluorescencijos spektrus atvaizduoti viename grafike ir patikrinti Stokso taisyklę.

### Fotosensibilizatorių fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymas, išilgai 5 cm kiuvetės matavimai, esant vienfotoniam žadinimui.

1. Pagaminti  $2 \cdot 10^{-4}$  ir  $2 \cdot 10^{-5}$  rodamino bei  $5 \cdot 10^{-5}$  ir  $5 \cdot 10^{-6}$  hemato porfirino tirpalus.
2. Filtrų pagalba, nufiltruoti žadinančią spinduliuotę ir užregistruoti sensibilizatorių fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymą 5cm kiuvetėje. Naudoti pagamintas fotosensibilizatorių koncentracijas.
3. Išmatuoti fotosensibilizatorių fluorescenciją išilgai 5 cm kiuvetės. Fluorescencija išilgai kiuvetės matuojama keičiant fluorimetro įvadą transliaciniu staliu. Spektrai registruojami kas 1-2 mm. Matavimai atliekami su kiekviena pagaminta koncentracija. Apskaičiuojama kiekvieno fluorescencijos spektro, kiekvienai koncentracijai, integralinį fluorescencijos intensyvumą. Rezultatus atvaizduojame grafiškai.

### Sklaidančios terpės įtakos fotosensibilizatoriaus žadinimo efektyvumui matavimai esant vienfotoniam žadinimui

1. Pagaminti trijų koncentracijų sklaidančias terpes. Koncentracijos parenkamos taip, kad šviesos intensyvumo santykis prieš kiuvetę su sklaida ir už kiuvetės su sklaida būtų lygu 2,5,10.
2. Naudojantis Lamberto – Bugerio dėsnio apskaičiuoti sklaidos gesinimo koeficientą kiekvienai sklaidančios terpės koncentracijai.
3. Užfiksuoti fotosensibilizatorių fluorescencijos spektrus išilgai kiuvetės kai sensibilizatoriaus tirpalas yra sumaišytas su sklaidančia terpe. Fluorescencija išilgai kiuvetės matuojama keičiant fluorimetro įvadą transliaciniu stakleliu. Spektrai registruojami kas 1-2 mm. Matavimai atliekami su  $2 \cdot 10^{-5}$  rodamino bei  $5 \cdot 10^{-6}$  hemato porfirino tirpalo koncentracija, įmaišius į tirpalą sklaidą (kurios koncentracija nustatyta 1 punkte).
4. Filtrų pagalba, nufiltruoti žadinančią spinduliuotę ir užregistruoti sensibilizatorių fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymą 5cm kiuvetėje kai sensibilizatoriaus tirpalas yra sumaišytas su sklaidančia terpe.
5. Palyginti fotosensibilizatorių fluorescencijos spektrų bei fluorescencijos intensyvumo pasiskirstymą išilgai kiuvetės, gautus su sklaida ir be jos.

#### Ti:Sa emituotos šviesos sklaidos matavimai

1. Apskaičiuoti sklaidos gesinimo koeficientus jau pagamintoms sklaidančios terpės koncentracijoms, bet šiuo atveju naudoti Ti:Sa emituota šviesa;
  - a. Išmatuoti Ti:Sa emituotos šviesos intensyvumą už kiuvetės be sklaidos
  - b. Išmatuoti Ti:Sa emituotos šviesos intensyvumą už kiuvetės su sklaidos
  - c. Įsistatę gautas reikšmes į formulę  $I = I_0 \exp(-L(\epsilon^R(\lambda)))$  apskaičiuoti gesinimo koeficientą.

2. Palyginti gesinimo koeficientus gautus naudojant 635 nm diodinį lazerį ir 800 nm Ti:Sa lazerį.

### Fluorescencijos, sužadintos dvifotoniškai, matavimai

1. Naudojant lęšių sistemą ar objektyvu, Ti:Sa lazerio emituotą šviesą suformuoti į kūgio formos žadinančios šviesos srautą ir nukreipti į kiuvetės vidurį.
2. Naudojant 800 nm. filtrus, užfiksuoti fotosensibilizatorių fluorescencijos spektrus, žadinant juos dvifotoniškai.
3. Gautus fotosensibilizatorių fluorescencijos spektrus palyginti su jau mūsų išmatuotai, klasikiniu būdu, fluorescencijos spektrais.

### 7. Kontroliniai klausymai

- a. Sugertis, jos pagrindiniai dėsniniai.
- b. Fluorescencija, jos pagrindiniai dėsniniai.
- c. Sklaida ir jos pagrindiniai dėsniniai.
- d. Kas vyksta molekulėse, jas sužadinus šviesa?
- e. Kokios sąlygos turi būti patenkintos, kad molekulė būtų sužadinta dvifotoniškai

### 8. Literatūra

1. BAGDONAS, S., L.-W. MA, V. IANI, R. ROTOMSKIS, P. JUZENAAS and J. MOAN. Phototransformations of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX *in vitro*: A spectroscopic study. 2000, *Photochem. Photobiol.* **72**, 186-192.
2. BHAWALKAR, J.D., N.D. KUMAR, C.-F. ZHAO and P.N. PRASAD. Two-photon photodynamic therapy. 1997, *J. Clin. Las. Med. Surg.* **15**, 201-204.

3. DICKSON G., E.F. and R.H. POTTIER. On the role of protoporphyrin IX photoproducts in photodynamic therapy. 1995, *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* **29**, 91-93.
4. FISCHER, W.G., W.P. PARTRIDGE, Jr., C. DEES and E.A. WACHTER Simultaneous two-photon activation of type-I photodynamic therapy agents. 1997, *Photochem. Photobiol.* **66**, 141-155.
5. KENNEDY, J.C., R.H. POTTIER and D.C. PROSS Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical practice. 1990, *J. Photochem. Photobiol B* **6**, 143-148.
6. Liuminescensijos laboratoriniai darbai: magistrantams/ Parengė doc. V. Urba.- 1997, p. 3-16.
7. MADSE, S.J., C.-H. SUN, B.J. TROMBER, V.P. WALLACE and H. HIRSCHBER. Photodynamic therapy of human glioma spheroids using 5-aminolevulinic acid. 2000, *Photochem. Photobiol.* **72**, 128-134.
8. ROTOMSKIS R., STRECKYTĖ G., GRICIŪTĖ L. Fotosensibilizuota navikų terapija: pirminiai vyksmai: monografija.- Vilnius: Lietuvos mokslas, 2002, p. 50-68.
9. ŠALNA Vaidutis Antanas. Optika: mokymo priemonė universitetų fizikos specialybės studentams.- Vilnius, 2000, p. 9-10.