

Laboratorinis darbas

# **Giluminė fluorescencinė diagnostika**

2008  
Vilnius

# Giluminė fluorescencinė diagnostika

## 1. Darbo tikslas.

Išsiaiškinti fluorescencijos registravimo dėsningumus iš gilesnių sklaidančiosios aplinkos sluoksnių kas sudarytų prielaidas fluorescencijos iš fiksuotame gylyje esančių objektų registravimui.

## 2. Darbo uždaviniai.

1. Užregistruoti tam tikrame sklaidančiosios terpės gylyje esančio fluorescuojančio objekto fluorescenciją terpės paviršiuje.
2. Išmatuoti dviejų fluorescuojančių sluoksnių fluorescenciją terpės paviršiuje. Atlikus tam tikrus fluorescuojančio sluoksnio pokyčius (sustorėjimas/suplonėjimas), nustatyti juos iš giluminės fluorescencijos spektrų.
3. Išmatuoti fluorescencijos intensyvumą pasiskirstymus sklaidančiosios terpės paviršiuje, kai fluorescuojantis objektas yra skirtinguose gyliuose (1, 2, 3 ... 6 mm).
4. Apskaičiuoti intensyvumą pasiskirstymo konstantas kiekvienam gyliui ir sudaryti atraminę kreivę fluorescuojančio objekto gyliui nustatyti.
5. Išmatuoti nežinomame gylyje esančio objekto fluorescenciją, apskaičiuoti nežinomame gylyje esančio objekto intensyvumą pasiskirstymo konstantą ir iš atraminės kreivės įvertinti objekto gylį.

## 2. 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. 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 specifiškumus, kurie sunkiai detektuojami kitais būdais.

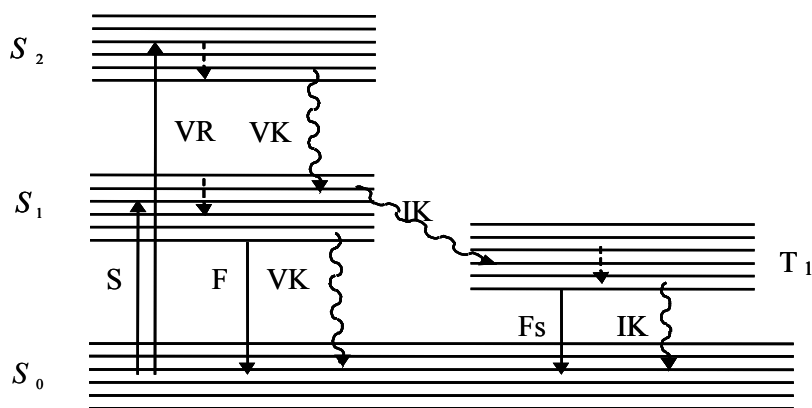
Fluorescencija yra vienas iš atskirų liuminescencijos atvejų. Pagal dalelių sužadavimo pobūdį liuminescencija būna kelių rūšių:

- fotoliuminescencija – medžiaga švyti sugėrusi ultravioletinę ar regimąją spinduliuotę;
- chemiliuminescencija – kai švytėjimą sukelia savitos cheminės reakcijos;
- rentgenoliuminescencija – švytėjimas sugėrus rentgeno spinduliuotę;
- elektroliuminescencija – 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 molekūlės relaksacija iš sužadinto singuletinio ir tripletinio lygmenų.

Molekulė, sugėrusi šviesos kvantą, tampa sužadinta – išorinės orbitalės elektronas peršoka į vieną iš laisvų molekūlės elektroninių lygmenų. Tokia molekūlės būseną yra nestabili, todėl per labai trumpą laiką ji grįžta į pagrindinę būseną, perteklinę energiją atiduodama aplinkinėms molekūlėms, 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 molekūlės nespinduliniu keliu per  $\sim 10^{-13}$ s relaksuoja į pirmo sužadinto elektroninio lygmens nulinių virpesinių polygmenų. 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 būseną – iš singleto į tripletą) ir fluorescencija – molekūlės grįžimas į pagrindinę būseną išspinduliuojant fotoną. Šių vyksmų tikimybės priklauso nuo molekūlės simetrijos ir taip pat nuo  $S_1$  ir  $S_0$  lygmenų energijų skirtumo. Kuo  $\Delta E$  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 lygmens. 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  $\varphi$ , 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  $\varphi$ , 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:

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

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. Sklaida

Kai elektromagnetinės bangos kelyje pasitaiko kliūtis (dalelė) gali vykti sugertis arba sklaida. Sugerties atveju dalelė įgauna perteklinės energijos, kurią gali atiduoti šilumos pavidalu arba išfluorescuoti elektromagnetinę bangą, kurios dažnis bus mažesnis nei sugertos bangos. Sklaidos atveju elektromagnetinė banga indukuoja dipolinį momentą, kuris osciliuoja tokiu dažniu kaip ir pati banga. Tokio indukuoto dipolio virpesiai ir sukelia

išsklaidytą bangą. Elastinės sklaidos atveju šie atsakomieji virpesiai būna tokio pačio dažnio kaip ir juos sukėlusio banga. Kai sklaidanti dalelė yra mažesnė nei krintančios bangos matmenys, vyksta Reilėjaus sklaida. Šiuo atveju skirtingi bangos ilgiai bus išsklaidyti skirtingais kampais:

$$I(\theta) = I_0 \frac{8\pi^4 N \alpha^2}{\lambda^4 R^2} (1 + \cos^2 \theta) \quad (5)$$

$N$  – sklaidančiųjų dalelių skaičius,  $R$  – atstumas nuo sklaidos taško,  $\alpha$  – poliarizuotumas. Išsklaidytos šviesos intensyvumas stipriai priklauso nuo bangos ilgio  $I_s \sim \frac{1}{\lambda^4}$ , tai reiškia kad trumpesnės bangos (mėlyna) bus sklaidomos labiau nei ilgosios (raudona). Dėl šios priežasties giedrą dieną dangaus skliautas atrodo mėlynas. Išsklaidytos šviesos intensyvumas proporcingas  $1 + \cos^2 \theta$ , taigi spinduliuotės, išsklaidytos į priekį ir atgal, intensyvumai yra vienodi.

Kai sklaidanti dalelė yra didesnė nei krintančios bangos matmenys, vyksta Mi sklaida. Mi sklaida nuo Reilėjaus skiriasi dviem pagrindiniais aspektais: pirma – silpnesnė priklausomybė nuo bangos ilgio ( $\sim \lambda^{-x}$ , kai  $0,4 \leq x \leq 0,5$ ) ir antra – Mi sklaidos atveju spinduliuotė dažniausiai yra sklaidoma



2 pav. Išsklaidytų dalelių kryptys Reilėjaus bei Mi sklaidos atvejais

nedideliais kampais – nedaug nukrypsta nuo pradinės krypties. Dalelių sklaida Reilėjaus ir Mi atvejais pavaizduota 2 paveiksle.

Sklaida audinyje vyksta dviejų skirtingo optinio tankumo terpių sandūroje – skirtingų ląstelių sluoksnių, citozolio bei ląstelės membranos, citoplazmos bei

ląstelės organelių. Sklaidą audinyje apibūdinti yra gana sudėtinga, kadangi ji priklauso ir nuo audinio morfologijos, ir nuo ląstelių formos, ir nuo jose esančių organelių. Pastebėta, kad daugumoje biologinių audinių sklaida vyksta nedideliais kampais, taigi atrodytų, kad audiniuose vyraujanti yra Mia sklaida, tačiau stebima sklaidos kampo priklausomybė nuo bangos ilgio yra kur kas artimesnė Reilėjaus sklaidai. Dažniausiai patekusi į audinį šviesa bus sklaidoma visų aukščiau paminėtų sklaidos elementų, kurių dydžiai labai įvairūs, todėl audinyje vyksta tiek Reilėjaus, tiek Mia sklaida.

Norint aprašyti sklaidą audiniuose įvedama fazinė funkcija  $p(\theta)$ , kuri nusako tikimybę fotonui būti išsklaidytam kampu  $\theta$ . Dažniausiai naudojama fazinė funkcija yra Henėjaus – Grynšteino (*Henryey – Greenstein*):

$$p(\theta) = \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{3/2}} \quad (6)$$

Jei  $p(\theta)$  nepriklauso nuo  $\theta$  – vyksta izotropinė sklaida, jei priklauso – anizotropinė. Sklaidančios terpės anizotropija yra apibūdinama anizotropijos koeficientu  $g$ , kuris apytiksliai lygus sklaidos kampo  $\theta$  kosinusui. Kai  $g = 1$  vyksta sklaida į priekį (spinduliuotės sklaidimo kryptimi), kai  $g = -1$  sklaida vyksta atgal (kryptimi, priešinga spinduliuotės sklaidimui), o kai  $g = 0$  sklaida gali vykti bet kokiais kampais (izotropinė sklaida). Audiniuose  $g$  kinta nuo 0,7 iki 0,99 ir tai reiškia, kad šviesa dažniausiai išsklaidoma  $8^\circ - 45^\circ$  kampais.

Audiniuose taip pat vyksta ir konkuruojantis procesas – sugertis, todėl reikia atsižvelgti ir į šį spinduliuotės silpimo procesą. Tiksliai aprašyti fotono kelią dėl sudėtingo sklaidančiųjų bei sugeriančiųjų elementų erdvinio išsidėstymo, o taip pat ir vykstančios įvairių tipų sklaidos yra sudėtinga. Sprendimo palengvinimui yra įvedamas dydis *optinis albedo*  $a$ , kuris apibrėžiamas:

$$a = \frac{\alpha_{sk}}{\alpha_{sk} + \alpha_{sg}} \quad (7)$$



kur  $\alpha_{sk}$  atitinka sklaidos koeficientą, o  $\alpha_{sg}$  sugerties koeficientą.  $a = 0$  reiškia, kad šviesos silpimas yra tik dėl sugerties, o  $a = 1$  nurodo šviesos silpimą dėl sklaidos.

Atsižvelgiant į dualizmo teoriją (šviesa yra ir elektromagnetinės bangos, ir dalelės) spinduliuotę patekusią į audinį galima aprašyti Maksvelo lygtimis arba fotonų transporto teorija. Nors pirmuoju atveju sprendimas yra tikslesnis, tačiau dėl kompleksinių kintamųjų skaičiavimai yra sudėtingi, todėl dažniau yra taikoma transporto teorija, kuri šviesą nagrinėja kaip diskrečių dalelių srautą. Fundamentinis dydis šioje teorijoje yra skaistis  $J$  [ $W/cm^2 \cdot sr$ ]. Jis nurodo galios srauto tankį tam tikra kryptimi erdviniam kampe. Spinduliuotei sklindant audinyje skaistį galima išskirti į koherentinį ir difuzinį. Koherentinis skaistis apibūdinamas kaip tiesiai sklindanti spinduliuotė, kurios silpimas susijęs su sugertimi ar bet koku šviesos nuokrypiu nuo tiesaus kelio dėl sklaidos. Tokios spinduliuotės gesimas neskaidriose aplinkose nesudėtingai gali būti aprašomas eksponentiniu dėsnio, tačiau pagrindinė problema yra difuzinio skaisčio įvertinimas, kadangi išsklaidytų fotonų kelias nėra griežtai apibrėžtas. Tam naudojami pirmos eilės išsklaidymo (*first – order scattering*), Kubelka – Munk (*Kubelka – Munk*) teorija, difuzinė aproksimacija (*diffusion approximation*), Monte Karlo modeliavimas arba atvirkštinio pridėjimo - dvigubavimo (*inverse adding - doubling*) metodai. Dažniausiai naudojamas metodas yra Monte Karlo modeliavimas, kadangi Kubelka – Munk teorija tinka tik difuzinio skaisčio skaičiavimams ir tik tuomet, kai sklaida viršija sugertį, difuzinės aproksimacijos taikymas taip pat apsiriboja skaičiavimais, kai dominuojantis procesas yra sklaida.

### **Monte Karlo modeliavimas.**

Monte Karlo metodu yra modeliuojamas  $N$  fotonų atsitiktinis elgesys. Tai yra statistinis metodas, kurio tikslumas proporcingas  $\sqrt{N}$ , todėl  $N$  turi būti pakankamai didelis. Pagrindinė idėja – sekti fotono judėjimą neskaidrioje

terpėje. Pirmasis žingsnis yra fotonų generavimas. Jų erdvinis pasiskirstymas atitinka tam tikrą spindulio formą, pvz. Gauso. Sekantis žingsnis – apibrėžiamas fotono elgesys: nustatomas atstumas iki pirmo susidūrimo su audinyje esančiomis dalelėmis. Laisvasis kelias:

$$S = 1 / \rho \sigma_s \quad (8)$$

kur  $\rho$  - dalelių tankis, o  $\sigma_s$  jų sklaidos skerspjūvis. Atstumui iki susidūrimo apskaičiuoti įvedamas atsitiktinis skaičius  $\xi_1$ , kuris nusako dalelių išsidėstymą. Tuomet

$$L(\xi_1) = -\ln \xi_1 / \rho \sigma_s \quad (9)$$

Sklaidos kampas yra apibūdinamas dar vienu atsitiktiniu skaičiumi  $\xi_2$ . Sklaida vyksta pagal tam tikrą funkciją, apibūdinančią tikimybę fotonui būti išsklaidytam tam tikru kampu. Dar vienas vyksmas, kuris turi būti įskaitomas, tai sugertis. Kiekvienam sugeneruotam fotonui yra priskiriamas tam tikras svoris, kuris mažėja dėsniu  $\exp[-\alpha L(\xi_1)]$ . Svoriumi pasiekus tam tikrą minimalią reikšmę, fotonas sugeriamas. Kaip alternatyva svorių priskyrimui gali būti generuojamas dar vienas atsitiktinis skaičius  $\xi_3$  tarp 1 ir 0. Jei  $\xi_3 < a$  (kur  $a$  yra albedo), vyks sklaida, o jei  $\xi_3 > a$ , fotonas bus sugertas. Paskutinis žingsnis – fotono užregistravimas. Registruojamas taip pat yra ir visas fotono kelias, t.y. galima pasakyti kur, koku kampu ir kiek kartų jis buvo išsklaidytas.

### III. Šviesolaidžiai

Priklausomai nuo tyrimo tipo bei tiriamojo objekto fluorescencijos registravimo sistemos gali būti labai įvairios, tačiau visas jas galima suskirstyti į du tipus:

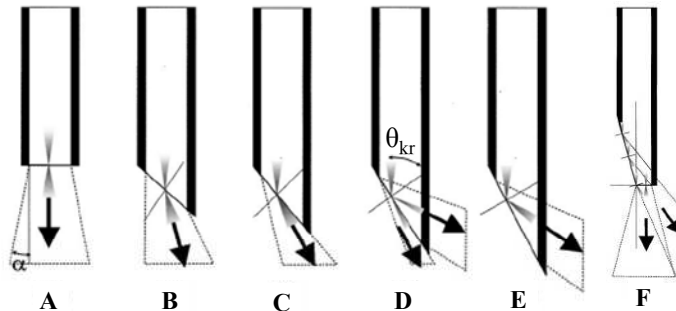
- spindulinės;
- šviesolaidinės.

Iš esmės šios sistemos skiriasi fluorescencijos žadinimo – surinkimo sistema. Pirmu atveju žadinančioji spinduliuotė optinių sistemų pagalba yra

fokusuojama tiesiai į tiriamąjį objektą bei išfluorescuota šviesa taipogi naudojant atitinkamas lęšių bei veidrodžių sistemas yra nuvedama į detektorių. Antru atveju žadinimo spinduliuotė iki tiriamojo objekto yra nuvedama šviesolaidžiu, taip pat ir fluorescencija yra surenkama ir nuvedama iki detektoriaus šviesolaidžiu. Šviesolaidinės sistemos yra kur kas patogesnės naudojimui, tačiau spindulinės yra jautresnės ir tikslesnės. Giluminę fluorescenciją laboratoriniame darbe registruosime šviesolaidine sistema, todėl pakalbėsime plačiau apie įvairių tipų šviesolaidines sistemas.

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

1. Antgaliai su bukais galais (3 A pav). Šviesa iš šviesolaidžio sklinda tiesiai. Kokiu kampu skečiasi išėjusi šviesa apsprendžia šviesolaidžio skaitinė apertūra.



3 pav. Šviesolaidinių zondu antgaliai: A) bukas. B- E – nuožulnus. F) mišrus.

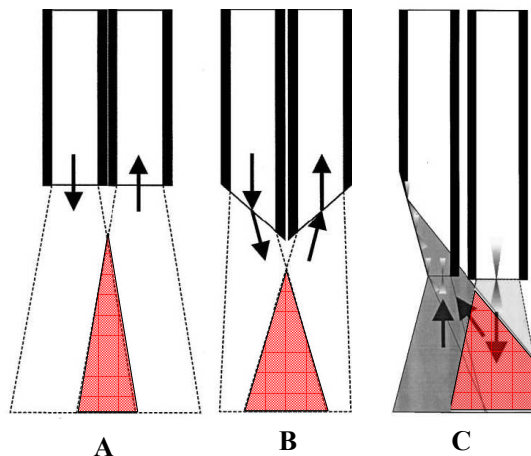
2. Antgaliai su nuožulniais galais. Šviesa išeina pro šviesolaidžio galą, tačiau skėstis ir kryptis yra apsprendžiama šviesolaidžio skaitinės apertūros bei nuožulnumo kampo (3 B,C pav). Pasiėkus tam tikrą kritinį kampą  $\theta_{kr}$  vyksta visiškas šviesos atspindys ir dalis spinduliuotės iš šviesolaidžio išeina pro jo šoną (3 D pav.). Tokiu atveju šviesolaidžio apsauginis apvalkalas turi būti nuvalytas paliekant tik skaidrius sluoksnius. Dar padidinus nuožulnumo kampą visa šviesa išeis tik pro šviesolaidžio šoną (3 E pav.). Siekiant padidinti atspindį nuo nuožulniosios plokštumos, ji papildomai gali būti dengiama atspindinčia

medžiaga. Taip pat yra galimybė apjungti abiejų tipų šviesolaidžio galus, tokiu būdu gaunamas mišraus tipo antgalis (3 F pav).

Tam tikras šviesolaidinių zondu antgalių pasirinkimas sąlygoja atitinkamas zondo savybes žadinant bei surenkant fluorescenciją. Jei optinės biopsijos žadinimo – surinkimo sistemoje yra tik vienas šviesolaidis, tam beveik visada yra naudojamas buko tipo antgalis, retkarčiais – mišraus tipo. Tačiau kuomet žadinimo – surinkimo sistemai yra naudojami du ir daugiau šviesolaidžių, tam tikrais atvejais yra naudinga naudoti arba bukus, arba nuožulnius, arba apjungti abiejų tipų šviesolaidžių antgalius. Nuo žadinimo – surinkimo sistemos tipo priklauso ir šios sistemos savybės, pavyzdžiui zondas, sudarytas iš dviejų nuožulnių šviesolaidžių, yra maždaug 1,5 karto efektyvesnis nei zondas, sudarytas iš dviejų bukų šviesolaidžių. Taip yra todėl, kad apšvietimo ir surinkimo plotai persidengia daugiau (4 A,B pav.) ir didesnė dalis sužadintų molekulių fluorescencijos

patenka į šviesolaidžių galimo surinkimo erdvę. Tačiau tūris, iš kurio nuožulniuojamu zonda yra renkama informacija, yra mažesnis bei lokalizuotas arčiau zondo. Dar vieno tipo zondas, kuriame fluorescencija yra surenkama netgi iš viso apšviečiamo ploto, gali būti sukonstruotas naudojant mišraus ir buko tipo antgalius (4 C pav.). Tokio zondo, palyginus jį su bukų antgalių zonda, efektyvumas yra

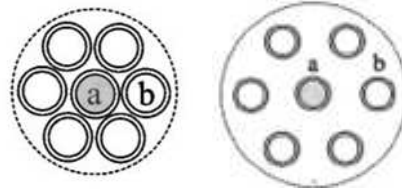
didesnis nuo 6,5 iki 20 kartų, priklausomai nuo nuožulnumo kampo. Siekiant dar labiau padidinti optinio signalo surinkimo efektyvumą žadinimui/surinkimui galima naudoti ne vieną šviesolaidį. Populiariausias tokio tipo zondas yra ratu



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

išdėstyti surinkimo šviesolaidžiai aplink vieną žadinimo šviesolaidį (5 pav).

Surinkimo šviesolaidžiai galiausiai yra apjungiami į vieną šviesolaidį ir gaunamas tradicinis dviejų atšakų bifurkacinis šviesolaidis. Tokiu zondo atveju žadinimo šviesolaidžio apšviečiamas plotas persikloja su visų šešių aplink išdėstytų šviesolaidžių surinkimo plotais ir tokio

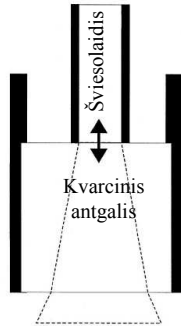


5 pav. Optinis zondas sudarytas iš 7 šviesolaidžių. (a) šviesolaidis skirtas žadinimui, (b) šviesolaidžiai skirti surinkimui.

zondo efektyvumas gaunamas iki šešių kartų didesnis nei dviejų šviesolaidžių zondo. Reikalui esant centrinį šviesolaidį galima naudoti surinkimui, o žadinimui – aplink jį išsidėsčiusius šviesolaidžius. Taipogi yra galimi įvairūs tokio tipo zondo variantai – šviesolaidžiai su bukais galais, nuožulniais galais arba mišraus tipo galais, arba įvairių tipų šviesolaidžių deriniai. Reikia atkreipti dėmesį, kad, optinės biopsijos aparatuose naudojant atskirus šviesolaidžius žadinimui bei surinkimui, kelyje iki surinkimo šviesolaidžio fluorescencijos signalas gali būti iškraipytas. Tai sąlygoje išfluorescuoto fotono kelyje pasitaikantys sugeriantys bei sklaidantys elementai. Kuo didesnis atstumas tarp žadinimo ir surinkimo šviesolaidžių, tuo daugiau bus modifikuotas fluorescencijos signalas.

Dar vienas būdas, leidžiantis padidinti apšvietimo bei surinkimo persidengimo plotą – tai šviesolaidinį zondą nuo audinio laikyti tam tikrame atstume, kuomet šis plotas yra didžiausias. 4 paveiksle matyti, kad tostant nuo šviesolaidžių antgalių, persidengimo plotas didėja. Praktikoje yra naudojami specialūs šviesolaidžiai su tam tikro storio kvarciniais antgaliais. Kvarcinio antgalio storis ir apsprendžia atstumą, kuriame zondas bus nutolęs nuo audinio. Tačiau tokiu atveju mažėja surinkimo efektyvumas  $\frac{1}{d^2}$ , kai  $d$  yra atstumas nuo zondo iki audinio. Buvo atlikti tokios sistemos tyrimai, kai optinei biopsijai buvo naudojama vieno šviesolaidžio sistema (6 pav.). Tyrimai atlikti su įvairių

skersmenų šviesolaidžiais. Padidinus šviesolaidžio skersmenį nuo 0,1 mm iki 1

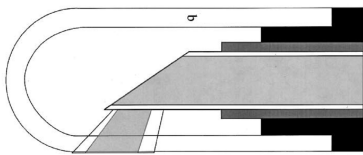


6 pav. Vieno šviesolaidžio sistema su kvarciniu antgaliu prieš šviesolaidį.

mm fluorescencijos surinkimas padidėjo daugiau nei 3,5 karto, kai fluorescencija registruota prie pat audinio. Gylis, iš kurio buvo surinkta maždaug 80% fluorescencijos signalo, priklausomai nuo skersmens siekė nuo 0,175 mm iki 0,375 mm. Prieš zondą įdėjus 5 mm kvarcinį antgalį, gylis iš kurio surinkta 80% fluorescencijos padidėjo iki 0,425 mm, kai tuo tarpu užregistruotos fluorescencijos intensyvumas sumažėjo nuo 5 iki 20 kartų (priklausomai nuo šviesolaidžio skersmens). Taigi, zondą priglaudus

tiesiai prie audinio užregistruojamas didesnis fluorescencijos intensyvumas, tačiau tiriamasis gylis yra mažesnis negu naudojant zondą su papildomu kvarciniu stikliuku. Panašaus efekto galima pasiekti ir keičiant šviesolaidžio skaitinę apertūrą, tokiu būdu nereikia naudoti papildomų kvarcinių antgalių.

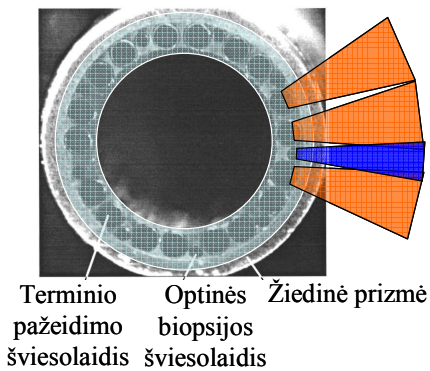
Tam tikrais atvejais labai patogiu naudoti nuožulnaus tipo antgalių zondus. Jie yra ypatingai patogūs kai tiriamoji vieta yra šviesolaidžio šone, tuomet netgi nekraipant šviesolaidžio galima apšviesti bandinį bei užregistruoti jo fluorescenciją. Pavyzdžiui tiriant kraujagyslių sienėles, gimdos kaklelį ir pan. Tokie zondai vadinami *šoniniais zondais* (7 pav). Šoninių zondų yra įvairių



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

tipų: vieno šviesolaidžio, dviejų šviesolaidžių bei daugelio šviesolaidžių, išdėstytų ratu. Fluorescencijos žadinimui bei surinkimui naudojant skirtingus šviesolaidžius, juos reikia suderinti taip, kad jų apšvietimo/surinkimo plotai persidengtų – juos reikia pasukti tam tikru kampu vienas kito atžvilgiu. Kartais, kai

naudojama ratu išdėstytų šviesolaidžių sistema, yra naudojami buko tipo šviesolaidžiai ir zondo gale dedama speciali žiedinė prizmė, kuri nukreipia

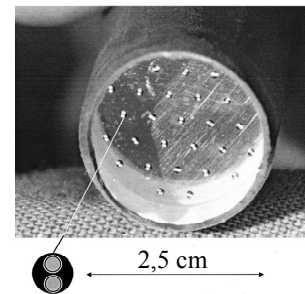


8 pav. Šoninis zondas. Ratu išdėstytais terminio pažeidimo šviesolaidžiais yra atliekama abliacija, o tarpe jų esančiais, mažesniais, atliekama diagnostika.

spindulius į šoną. 8 paveiksle yra pavaizduotas zondas, kuriuo yra atliekami terminiai pažeidimai. Tarpuose šviesolaidžių, kurie yra skirti abliacijai, yra įterpti diagnostikos šviesolaidžiai, kuriais galima atlikti optinę biopsiją. Tokiu būdu gaunamas zondas, kuriuo vienu metu visame tiriamos ertmės vidiniame paviršiuje galima ir gydyti, ir stebėti gydymo eigą.

Naudojant visus aukščiau minėtus šviesolaidinius zondus informaciją vienu

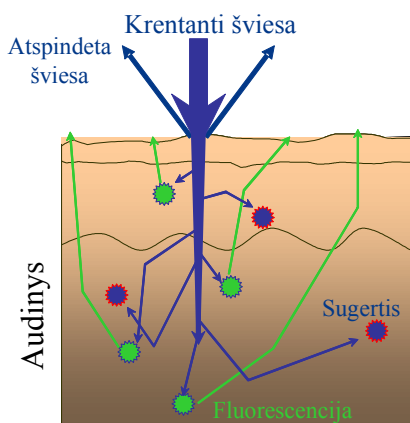
metu galima rinkti tik iš vienos vietos, t.y. tik iš mažo audinio tūrio. Tai yra labai naudinga, kuomet reikalinga informacija iš tikslios audinio vietos, tačiau dažnai biomediciniuose tyrimuose reikia ištirti didelius audinio paviršiaus plotus, kad įvertinti pažeidimo laipsnį ar nustatyti pažeidimo ribas. Tokiu būdu galima naudoti optinės biopsijos zondą, kuriame yra integruota keletas žadinimo – surinkimo sistemų. 9 pav. pateiktas optinės biopsijos zondas, kuriame yra integruota 31 žadinimo – surinkimo sistema. Kiekviena sistema sudaryta iš vieno žadinimo šviesolaidžio ir vieno surinkimo šviesolaidžio. Užregistravus šiuo zondų optinius signalus galima sudaryti audinio fluorescencinius „žemėlapius“, iš kurių galima atlikti audinio fluorescencinį vaizdinimą. Šiuo metu yra sukurta sistema iš 120 žadinimo – surinkimo sistemų, tačiau norint dar labiau padidinti tiriamų vietų skaičių naudingiau yra naudoti spindulines žadinimo surinkimo sistemas su audinio skanavimo galimybe.



9 pav. optinės biopsijos zondas, kuriame yra integruota 31 žadinimo – surinkimo sistema.

#### IV. Giluminė fluorescencinė diagnostika

Giluminės fluorescencijos registravimui dažnai yra naudojamos spindulinės sistemos, t.y. konfokalinės bei daugiafotonės, tačiau tai yra labai sudėtingos, brangios bei nevisada patogios naudoti sistemos. Todėl bandoma pereiti prie daug paprastesnės, bei pigesnės šviesolaidinės sistemos. Paprastais bifurkaciniais šviesolaidžiais registruojama fluorescencija yra mišinys iš įvairių sluoksnių ateinančių signalų, kuriuos sukelia sugerta spinduliuotė. Keičiant žadinimo bangos ilgį galima pasiekti didesnę šviesos įsiskverbimo gylį kol ji bus visiškai sugerta. Remiantis sklaidos teorija, fotonai, išfluorescuoti paviršiuje, yra mažai veikiami sklaidos ir todėl jie sklinda beveik tiesiai į paviršių – šalia žadinimo šviesolaidžio. Tuo tarpu giliau išfluorescuoti fotonai savo kelyje iki paviršiaus sutinka kur kas daugiau sklaidančiųjų dalelių, todėl audinį palieka tam tikru atstumu nuo žadinimo šviesolaidžio 10 pav. Taigi, surinkimo



10 pav. Šviesos spindulių eiga audinyje.

šviesolaidžiui esant šalia žadinimo arba netgi esant keliems surinkimo šviesolaidžiams, bet išdėstytiems tokiu pačiu atstumu, smarkiai išsklaidyti fotonai nėra užregistruojami, tačiau panaudojus tam tikras šviesolaidines sistemas, galinčias užregistruoti įvairiu atstumu nuo žadinančiojo šviesolaidžio išlekiančius fotonus, galima būtų gauti informaciją ir iš gilesnių audinių sluoksnių.

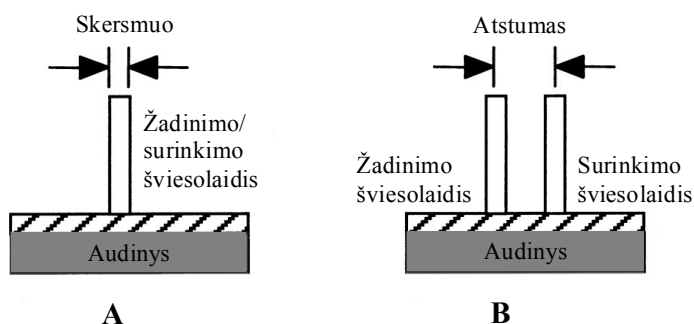
Kai kuriais atvejais tai yra labai naudinga informacija, nulemianti sėkmingą ligos diagnozavimą ar tam tikro susirgimo gydymą. Pavyzdžiui lazeriu koaguluojant širdies audinio sienelės svarbu žinoti ar sienelė buvo koaguluota per visą jos storį. Jei terminis pažeidimas būna atliktas tik dalyje sienelės, operacija laikoma nesėkminga. Taip pat fotosensibilizuotos navikų



terapijos metu būtų naudinga žinoti sensibilizatoriaus kaupimąsi visame naviko tūryje, o pačios terapijos metu stebėti naviko nekrozę. Šiuo metodu taip pat galima pagerinti ankstyvųjų stadijų navikų diagnostiką. Nemaža dalis visų onkologinių susirgimų kyla epiteliniuose audiniuose. Yra žinoma, kad vystantis tam tikriems navikams epitelio storis didėja, kai tuo tarpu senstant plonėja, todėl užregistravus fluorescenciją iš gilesnių audinių sluoksnių galima būtų pasakyti apie epitelio storio pokyčius ir iš to nuspręsti ar audinyje vystosi navikas.

## V. Gilesnių sluoksnių fluorescencijos tyrimas

Vienas iš svarbiausių komponentų diagnostinėje fluorescencinės spektroskopijos aparatūroje yra žadinimo surinkimo sistema. Giluminei diagnostikai galima išskirti dvi pagrindines šviesolaidines sistemas – kai žadinimo ir surinkimo šviesolaidžiai persikloja (naudojamas tas pats šviesolaidis) ir kai žadinimo ir surinkimo šviesolaidžiai nutolę vienas nuo kito tam tikru atstumu. Pirmuoju atveju galima keisti šviesolaidžio skersmenį taip keičiant ir sistemos savybes. Tokia fluorescencijos registravimo sistema vadinama įvairių skersmenų (VA – various aperture). Antruoju atveju galima keisti tiek šviesolaidžių skersmenis, tiek atstumus tarp žadinimo ir surinkimo šviesolaidžių. Tokia sistema vadinama įvairių atstumų (MD – multidistance) (11 pav.). Šių sistemų savybės yra tiriamos teoriniais modeliavimo metodais ir tik



11 pav. VA (A) ir MD (B) sistemos.

keli darbai atlikti praktiškai matuojant fluorescenciją.

Hyde ir kt. nagrinėjo MD savybes registruojant dvisluoksnės neskaidrios sistemos fluorescenciją.

Dvisluoksnė sistema dažniausiai yra pasirenkama tam, kad imituoti odos

paviršių, kuris taip pat sudarytas iš dviejų sluoksnių – viršutinio epitelinio ir gilesnio – stromos. Atitinkamai pagal audinio savybes parenkami ir sklaidos bei sugerties koeficientai. Modeliavimo eksperimentuose autoriai parodė, kad, mažėjant/didėjant fluoroforų koncentracijai gilesniuose modelinės sistemos sluoksniuose, skirtingu atstumu nuo žadinimo nutolusiuose šviesolaidžiuose registruojamas skirtingas fluorescencijos intensyvumas, tačiau spektrinių kreivių formos labai panašios. Pastebėta, kad tokio tipo (MD) sistema registruojami skirtumai (tiek intensyvumų, tiek ir spektrinių kreivių formų) yra didesni, kai didžiausi koncentracijos skirtumai yra gilesniuose sluoksniuose.

Dauguma navikų pradeda vystytis giliai epitelyje prie bazinės membranos ir proliferuoja į viršų (neinvazinis navikas), arba perauga membraną ir išsiskverbia į stromą (invazinis navikas), todėl reikalingi diagnostikos metodai, kurie kaip tik ir būtų jautresni gilesniems sluoksniams. Tačiau kartais naviko vystymasis yra susijęs ir su struktūriniais audinių pokyčiais – vystantis gimdos kaklelio vėžiui plonėja epitelio sluoksnis, todėl šiuo atveju reikalingas didesnis jautrumas viršutiniams sluoksniams. Zhu ir kt. tyrė optinės šviesolaidinės sistemos matmenų (VA ir MD sistemų) įtaką registruojamai fluorescencijai iš dvisluoksnės neskaidrios terpės. Analizę atliko Monte Karlo modeliavimo metodu. Tyrimo metu buvo analizuojama visa užregistruota fluorescencija (užregistruotų ir išfluorescuotų fotonų santykis), išsiskverbimo gylis (gylis, kuriame išfluorescuojama 80% visų fotonų) ir jautrumas pirmam sluoksniui (fotonų, užregistruotų iš pirmojo sluoksnio santykis su visa užregistruota fluorescencija). Atlikus eksperimentą paaiškėjo, kad VA sistema registruojamos fluorescencijos intensyvumas yra didesnis nei MD, kadangi intensyviausiai fluorescencija vyksta po žadinimo šviesolaidžiu, o šiuo atveju žadinimo ir surinkimo šviesolaidis yra tas pats. Taip pat ši sistema pasirodė esanti jautresnė viršutiniam sluoksniui, tačiau MD sistemos išsiskverbimo gylis yra didesnis maždaug du kartus. Didinant VA sistemos šviesolaidžio skersmenį didėja išsiskverbimo gylis, bet mažėja jautrumas pirmam sluoksniui. MD atveju

didinant atstumą tarp surinkimo ir žadinimo šviesolaidžių išsiskverbimo gylis dar labiau padidėja bei mažėja jautrumas viršutiniam sluoksniui. Taigi, kaip ir Hyde ir kt. atlikti tyrimai, šie eksperimentai įrodo, kad MD sistema yra jautresnė gilesniems sluoksniams ir tokio tipo sistema galima būtų registruoti giluminę audinių fluorescenciją, kai tuo tarpu VA yra tinkamesnė registruojant paviršinę fluorescenciją.

Išsamiau pačio šviesolaidžio skersmens įtaką registruojamai fluorescencijai nagrinėjo Brian ir Burke. Atlikę Monte Karlo modeliavimo eksperimentus parodė, kad didinant fluorescencijos surinkimo šviesolaidžio skersmenį, į jį pakliūdavo fotonai, kurie savo kelyje patirdavo daug sklaidos įvykių. Šviesolaidžio skersmeniui esant mažesniam nei laisvasis kelias (kelias, kurį nueina fotonas nuo vieno susidūrimo iki kito), užregistruojami fotonai, kurie yra gerokai mažiau išsklaidyti. Registruojant fluorescenciją mažo skersmens (~ 100 μm) šviesolaidžiais, galima nepaisyti tam tikrų audinio parametrų – kadangi registruojami fotonai nedaug susiduria su audinyje esančiomis dalelėmis, todėl mažai įvyksta tiek sklaidos, tiek ir sugerties įvykių. Šiuo atveju fluorescencija priklauso tik nuo audinyje esančių fluoroforų bei jų koncentracijos ir nepriklauso nuo sklaidančiųjų ar sugeriančiųjų elementų kiekio.

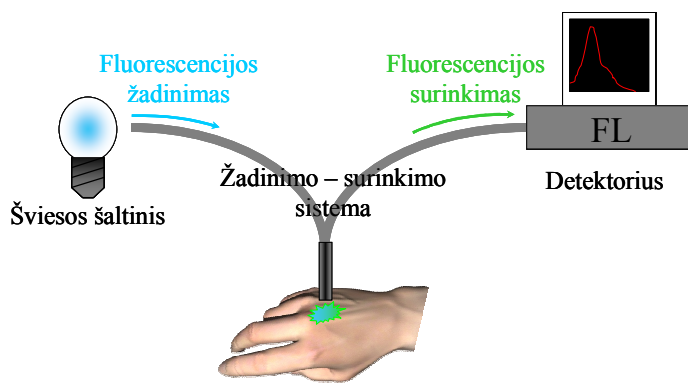
Taigi naudojant atitinkamos geometrijos šviesolaidines sistemas galima praplėsti neinvazinės fluorescencinės spektroskopijos taikymo galimybes medicininės diagnostikos srityse. Jau dabar praktikoje yra naudojami paviršinės fluorescencinės diagnostikos metodai, tačiau ištobulinius aukščiau minėtas MD ir VA sistemas bei padarius tinkamas taikymui klinikoje, jomis galima būtų stebėti endogeninių ar egzogeninių fluoroforų koncentracijos pokyčius, audinių sluoksnių storio pokyčius, fotovaisto pasiskirstymą ar jo fotoblyškimą sensibilizuotos navikų terapijos metu bei registruoti gilesnių sluoksnių fluorescenciją nepažeidžiant viršutinių audinių.

### 3. Praktinės užduotys.

1. Turime dvi kiuvetes, kuriose yra tas pats fluorescuojantis tirpalas. Vienos kiuvetės storis 1 cm, kitos kiuvetės storis 1mm. Kaip keisis fluorescencijos intensyvumas registruojant fluorescenciją vienos kiuvetės ir kitos, jei koncentracijos yra vienodos?
2. Paskaičiuoti sklaidos koeficientą 530 nm spinduliutei pieno tirpale, jei šio tirpalo sugertis 1 cm kiuvetėje ties 530 nm siekia 0,1 optinio tankio vieneta?

### 4. Aparatūra ir darbo metodika.

Laboratoriniame darbe giluminė fluorescencija bus registruojama MD tipo šviesolaine fluorescencijos registravimo sistema. Šią sistemą sudaro šviesos šaltinis fluorescuojančių objektų žadinimui, žadinimo – surinkimo sistema bei detektorius 12 pav. Šviesos šaltinis parenkamas atsižvelgiant į fluorescuojančių

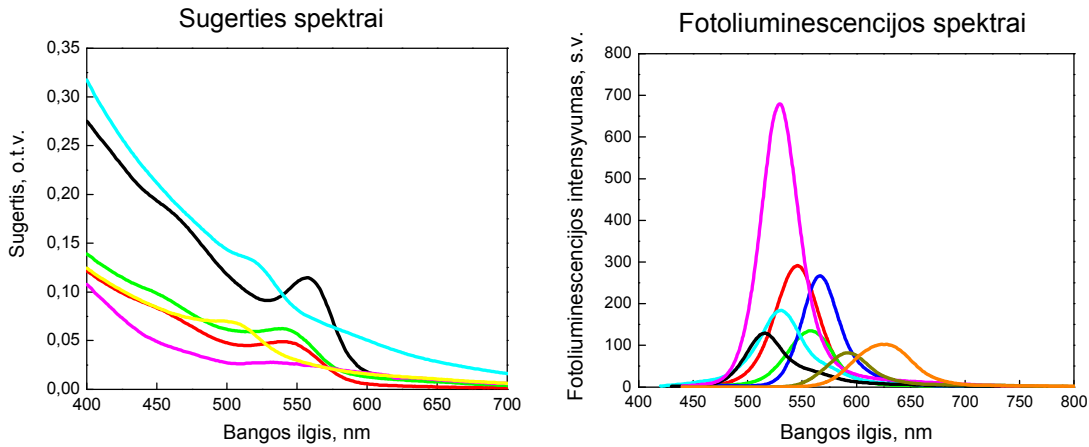


12 pav. Principinė šviesolaidinė fluorescencijos registravimo schema.

objektų sugertį. Laboratoriniame darbe tikslinga naudoti stabilias bei aukšto kvantinio našumo fluorescuojančias medžiagas. Šiam tikslui dėl geresnių savo savybių, lyginant su standartiniais dažikliais, gali būti naudojami

kvantiniai taškai (Kt). 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) 13 pav. Sritis,



13 pav. Įvairių dydžių kvantinių taškų sugerties bei fotoluminescencijos spektrai.

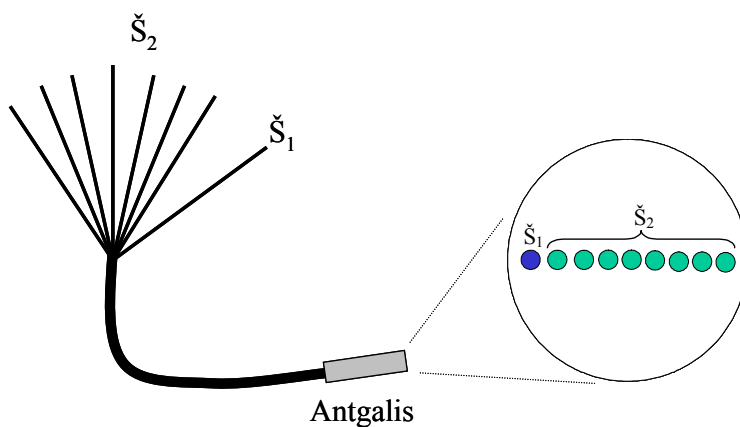
kurioje Kt liuminescuoja, priklauso nuo jų dydžio. Šio laboratorinio metu galima naudoti kvantinių taškų koloidinį tirpalą (1-2 mg Kt suspenduota 4 mL tirpiklio). Ypatinga Kt savybė – platus sugerties spektras – suteikia galimybę vienu šviesos šaltiniu sužadinti keletą skirtingų kvantinių taškų. 13 pav. pavaizduoti Kt fluorescencijos bei sugerties spektrai. Kt liuminescencijos žadinimui laboratoriniame darbe naudosime šviesą emituojantį diodą (LED). Jis yra įtvirtintas specialiai paruoštame korpuse, kuriame yra visi reikalingi optiniai ir mechaniniai elementai šviesolaidžio prijungimui prie šviesos šaltinio. 14 paveiksle pavaizduotas šviesos šaltinis, naudojamas kvantinių taškų liuminescencijos žadinimui. Iš esmės tai yra vieno bangos ilgio šviesos šaltinis, nors jo emituojamos spinduliuotės spektro plotis siekia 10 – 15 nm. Jo viduje įmontuotas 5 mm skersmens šviesos diodas, kurį



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

reikalui esant, galima pakeisti kito bangos ilgio šviesos diodu. Visi šviesolaidinės fluorescencijos registravimo 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 užduoties. Dažniausiai tai būna bifurkacinė šviesolaidinė sistema su įvairių tipų antgaliais. Kaip jau aukščiau buvo minėta, nuo sistemos antgalio priklauso detektavimo gylis. Šiame laboratoriniame darbe naudosime specialią daugianuotolinę fluorescencijos žadinimo – registravimo sistemą (15 pav.). Tai

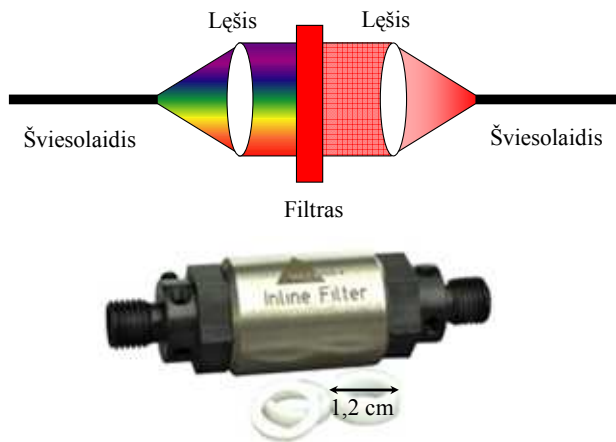


15 pav. Daugianuotolinė fluorescencijos žadinimo – registravimo sistema bei jos antgalis.

yra ypatingos formos šviesolaidis. Jį sudaro 9 skaidulos kurios suvestos į vieną antgalį. Šis antgalis pavaizduotas 15 pav. Vienos skaidulos skersmuo 600  $\mu\text{m}$ , o atstumai

tarp jų 1 mm. Pirmoji skaidula ( $\check{S}_1$ ) prijungiama prie šviesos šaltinio, o likusios aštuonios ( $\check{S}_2$ ) jungiamos prie detektoriaus. Tokia šviesolaidinė sistema galima registruoti fluorescenciją įvairiuose atstumuose nuo žadinimo šviesolaidžio, tokiu būdu užregistruojant vis daugiau fotonų iš gilesnių sluoksnių.

Papildomai surinktos fluorescencijos kelyje yra būtina spektrinės sudėties modifikavimo sistema. Šios sistemos esmė – grubiai filtruoti šviesos spektrinę sudėtį, dažniausiai tai yra praleisti arba nufiltruoti tam tikros spalvos šviesą. Audinys, apšviestas tinkamo bangos ilgio (spalvos) šviesa, išduos optinį atsaką – fluorescenciją – kuri jau bus kitos spalvos nei žadinimo spinduliuotė, ir jei šis spalvinis skirtumas yra pakankamai didelis, pvz., jei žadinimui naudojama mėlyna šviesa, o fluorescencija stebima žalios arba raudonos spalvos, tai filtrinis spektrų atskyrimas bus pakankamai efektyvus. Paprastai tokios spektrinės sudėties modifikavimo sistemos pilnai užtenka. Tai yra labai paprasta sistema, kurią sudaro filtrų laikiklis bei pora lęšių spinduliuotės fokusavimui. Filtrinės spektrų modifikavimo sistemos schema pateikta 16 pav. Kadangi ši



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

sistema yra naudojama šviesolaidinėje sistemoje, tai ji turi būti tinkama naudojimui su šviesolaidžiais bei atitikti tam tikrus reikalavimus, t.y. filtravimas turi būti atliekamas su minimaliais intensyvumo nuostoliais. Būtent dėl to ir yra naudojami lęšiai. Sistemos veikimo principas labai paprastas: spinduliuotė išėjusi iš šviesolaidžio skeliasi tam tikru

kampu, kuri apibrėžia šviesolaidžio skaitinė apertūra. Tam tikrame atstume nuo šviesolaidžio pastatytas glaudžiamasis lęšis iš besiskečiančio pluošto suformuoja lygiagretų pluoštą. Tuomet lygiagretaus pluošto kelyje yra statomas filtras. Filtrą praėjęs pluoštas išlieka lygiagretus, o jo kelyje pastatytas dar vienas glaudžiamasis lęšis vėl sufokusuoja spinduliuotę ir ji vėl yra suvedama į šviesolaidį.

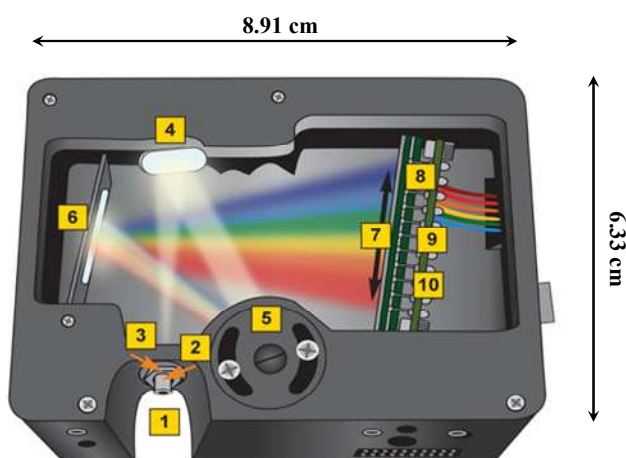
Taigi, spinduliuotei praėjus pro spektrinės sudėties modifikavimo sistemą yra nufiltruojama didžioji dalis pašalinės spinduliuotės ir lieka tik tai fluorescencija. Šis signalas toliau keliauja į detektorius. Kadangi registruojant giluminę fluorescenciją skirtumai tarp skirtingais atstumais nutolusių registravimo šviesolaidžių  $\lambda_2$  dažniausiai yra tik kiekybiniai (stebimas nevienodas intensyvumas), tai labai svarbios yra eksperimento sąlygos, t.y. kokiomis sąlygomis buvo užregistruota fluorescencija pirmame surinkimo šviesolaidyje, tokiomis sąlygomis turi būti registruojama fluorescencija ir likusuose šviesolaidžiuose. Šiuo atveju labai svarbus yra antgalio priglaidimas prie tiriamojo objekto. Bet koks antgalio pokrypis ar priglaidimo vietos pokytis tyrimo metu gal reikšmingai įtakoti rezultatus. Išlaikyti vienodas sąlygas visiems matavimams yra labai sudėtinga, kadangi matavimus reikia atlikti net su 8 šviesolaidžiais. Todėl eksperimento metu šviesolaidinės registravimo sistemos antgalis turi būti nejudamai įtvirtintas ir priglaidomas prie tiriamojo objekto. Deja, bet praktikoje, o ypač atliekant tyrimus su gyvais biologiniais objektais, tai būna beveik neįmanoma, todėl giluminės fluorescencijos tyrimams yra naudojamas specialus daugiakanalis spektrometras 17 pav. Tai yra 8 visiškai



17 pav. 8 nepriklausomų kanalų daugiakanalis spektrometras.



ne priklausomų kanalų šviesolaidinis spektrometras, kuriuo visais 8 šviesolaidžiais perduodamus spektrus galima registruoti vienu metu. Šis prietaisas yra sudarytas iš 8 šviesolaidinių spektrų registravimo įrenginių, sujungtų į vieną visumą, todėl jo veikimo principui suprasti pilnai pakanka išsiaiškinti vieno spektrų registravimo įrenginio veikimą. Šviesolaidiniame prietaise visi detektavimui reikalingi komponentai yra pačiame spektrų registravimo įrenginyje. 18 paveiksle pavaizduotas šviesolaidinis spektrų



18 pav. Šviesolaidinis spektrų registravimo įrenginys.

registravimo įrenginys.

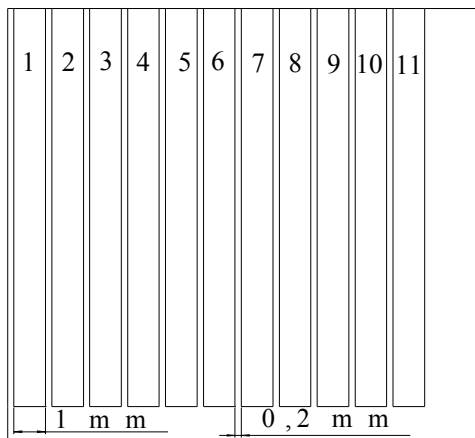
Spinduliuotė iš šviesolaidžio per SMA 905 jungtį (1) patenka į prietaisą. Šviesos srautas įėjime yra apribojamas specialaus plyšio (2), kurio plotis gali būti nuo kelių mikronų iki kelių šimtų mikronų. Šis plyšys įtakoja

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  $\mu\text{m}$ ) sumažinant prietaiso skiriamąją gebą. Kartais, kuomet yra naudojami ploni šviesolaidžiai (200  $\mu\text{m}$  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 režių formos yra optimizuotos tik tam tikrai spektrinei sričiai. Režių skaičius difrakcinėje gardelėje įtakoja skiriamąją gebą. Didesnis režių skaičius nulems geresnę skiriamąją gebą, tačiau tokia gardelė bus galima registruoti siauresnį bangos ilgių diapazoną. Pvz., jei prietaiso įėjime yra 200  $\mu\text{m}$  pločio plyšys ir yra įmontuota gardelė, kurioje yra 1200 režių/mm, tai jos skiriamoji geba bus  $\sim 1,5$  nm ir ja bus galima registruoti  $\sim 220$  nm pločio spektrą (pvz. nuo 400 nm iki 620 nm). Atitinkamai jei yra gardelė, kurioje yra 600 režių/mm, turėsime  $\sim 4$  nm skiriamąją gebą bei galėsime registruoti  $\sim 500$  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 jėjimo langelis (9). Skirtumas yra toks – jei spektrai bus registruojami UV srityje yra naudojamas kvarcinis langelis, jei ne – naudojamas paprastas stiklas.

Daugiakanalis spektrometras, sudarytas iš 8 aukščiau aptartų spektrų registravimo įrenginių, yra prijungiamas prie kompiuterio ir ekrane pateikiami visi 8 spektrai vienu metu, todėl bet koks giluminės fluorescencijos tyrimams naudojamos šviesolaidinės sistemos antgalio pokrypis ar padėties pokytis beveik vienodai įtakos visus 8 spektrus.



19 pav. Speciali kiuvetė giluminės fluorescencijos tyrimams.

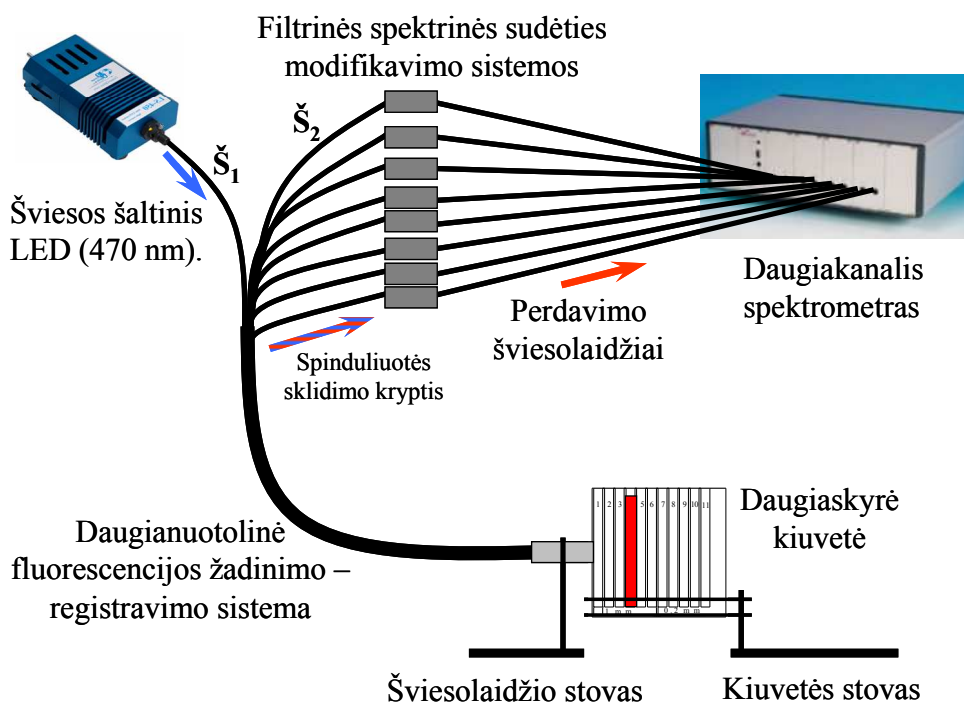
Šiame laboratoriniame darbe giluminę fluorescenciją tirsime modelinėje daugiasluoksnėje sistemoje. Tokia sistema gali būti realizuota specialioje daugiaskyrėje kiuvetėje (19 pav.), sudarytoje iš 11 skyrių, kurių kiekvieno storis 1 mm, o pertvarėlių storis 0,14 mm. Kiuvetė yra užpildoma sklaidančia medžiaga (tai gali būti atitinkamos

koncentracijos pieno tirpalas), o tam tikras jos skyrelis (arba keli skyreliai) yra užpildomi fluorescuojančia medžiaga, pvz kvantiniais taškais, taip realizuojant tam tikrame gylyje esantį fluorescuojantį objektą. Šioje kiuvetėje galima keisti fluorescuojančio sluoksnio gylį nuo paviršiaus (fluorescuojantis sluoksnis yra pirmame skyrelyje) iki 10 mm gylio (fluorescuojantis sluoksnis yra 11 skyrelyje). Eksperimento metu šviesolaidžio antgalis yra priglaudžiamas prie priekinės kiuvetės sienelės (prie pirmo skyrelio sienelės).

Laboratorinio darbo schema yra pavaizduota 20 paveiksle.

## 5. Darbo eiga.

Laboratorinis darbas susideda iš tiriamųjų medžiagų paruošimo, įrangos sujungimo bei suderinimo ir numatytų užduočių atlikimo. Taigi pirmiausia reikia pasiruošti sklaidančiąją terpę. Tam tikslui galima naudoti pieno tirpalą (pienas praskiestas vandeniu) arba pieno miltelius ištirpintus vandenyje. Tirpalo



20 pav. Giluminės fluorescencijos tyrimo laboratorinio darbo schema.

sklaidos koeficientas turi neviršyti  $5 \text{ cm}^{-1}$ . Tokios sklaidos tirpalas bus naudojamas viso laboratorinio darbo metu. Biologinio audinio sklaida paprastai yra didesnė, tačiau norint išmatuoti fluorescenciją iš kuo gilesnių sluoksnių, ji parenkama truputį mažesnė. Sklaidos koeficientą apskaičiuosime naudodami Lamberto-Bugero dėsnį. Šviesos silpimas tirpaluose yra sąlygotas dviejų vyksmų – sugerties bei sklaidos:

$$I = I_0 e^{-L(\sigma + \varepsilon^R + \varepsilon^M)} \quad (10)$$

L – kelias, kurį tirpale nueina šviesa (jei matavimai atliekami kiuvetėje, tai yra kiuvetės storis);

$\sigma$  – sugerties pagavos skerspjūvis. Kadangi pieno baltymai regimojoje spektro srityje neturi sugerties, tai visas šviesos silpimas pagrinde yra dėl sklaidos. Todėl šis pagavos skerspjūvis lygus 0.

$\varepsilon^M$  – Mi sklaidos koeficientas. Ši sklaida vyks jei sklaidančios dalelės yra didelės (didesnės nei krintančios bangos matmenys). Šį narį taipogi galime atmesti nes pieno baltymai yra mažesni nei regimosios spinduliuotės bangos matmenys.

Modifikuotas Lamberto-Bugero dėsnis sklaidos koeficientui nustatyti:

$$I = I_0 e^{-L\varepsilon^R} \quad (11)$$

$$\ln \frac{I}{I_0} = -L\varepsilon^R \quad (12)$$

$$\varepsilon^R = -\frac{\ln \frac{I}{I_0}}{L} \quad (13)$$

Dydis  $\ln \frac{I}{I_0}$  išmatuojamas Varian 50 Scan UV-Visible spektrofotometru.

Darbas su šiuo spektrometru pateikiamas prie spektrometro esančiame apraše.

Sekantis žingsnis yra fluorescuojančių sluoksnių paruošimas. Kadangi laboratoriniame darbe bus reikalingi dviejų tipų fluorescuojantys sluoksniai, tai svarbu parinkti tokias medžiagas, kurių fluorescencijos spektrai nepersiklotų, o sugerties spektrai persiklotų – jas būtų galima sužadinti tuo pačiu šviesos šaltiniu. Taigi šiam tikslui galima naudoti įvairius kvantinius taškus. Koncentracija yra parenkama tokia, kad sugertis 1 mm optinio kelio kiuvetėje būtų apie 1 optinio tankio vieneta.

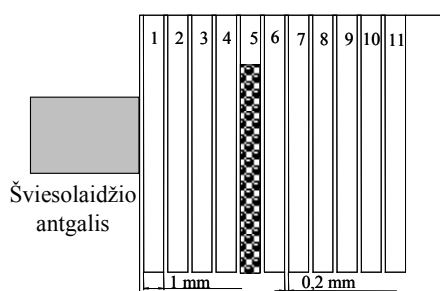
Toliau seka aparatūros sujungimas bei suderinimas. Šviesos šaltinis yra sujungiamas su daugianuotolinės šviesolaidinės sistemos 1 šviesolaidžiu – tai bus žadinimo šviesolaidis. Sekantys 8 šviesolaidžiai (tai bus fluorescencijos registravimo šviesolaidžiai) sujungiami su spinduliuotės spektrinės sudėties modifikavimo sistemomis. Atsižvelgiant į žadinimo spinduliuotę, reikia parinkti

tinkamus filtrus fluorescencijos išskyrimui. Prie spektrinės sudėties modifikavimo sistemų išėjimo prijungiami perdavimo šviesolaidžiai kuriais jos yra sujungiamos su atitinkamais daugiakanalio spektrometro įėjimais. Kadangi daugianuotolinėje šviesolaidinėje sistemoje pirmasis šviesolaidis skirtas žadinimui, tai pagal numeraciją pirmasis surinkimo šviesolaidis (nuo žadinimo nutolęs per 1 mm) bus 2 šviesolaidis. Antrasis surinkimo šviesolaidis bus pažymėtas 3 numeriu ir t.t. Kiekviena fluorescencijos registravimo atšaka sudaryta iš daugianuotolinės šviesolaidinės sistemos registravimo šviesolaidžio, spektrinės sudėties modifikavimo sistemos ir perdavimo šviesolaidžio. Sujungus visus komponentus tarpusavyje ir prijungus juos prie daugiakanalio spektrų registravimo įrenginio įjungiamas kompiuteris bei paleidžiama programa AvaSoft. Darbas su programa pateikiamas prie spektrometro esančiame apraše.

Paruošus tiriamąsias medžiagas bei suderinus ir parengus aparatūrą darbui, galima atlikti laboratoriniame darbe numatytas užduotis:

1. Užregistruoti tam tikrame sklaidančiosios terpės gylyje esančio fluorescuojančio objekto fluorescenciją terpės paviršiuje.

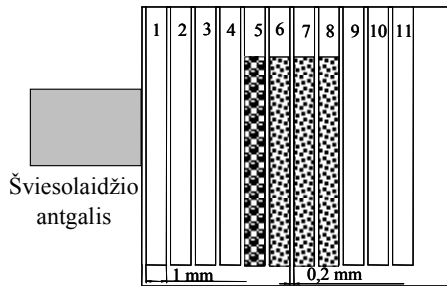
Prieš atliekant šią užduotį reikia įtvirtinti į stovą daugiaskyrę kiuvetę bei prie jos priekinės sienelės priglausti daugianuotolinės šviesolaidinės sistemos antgalį. Antgalis turi būti priglaustas statmenai priekinei sienelei. Tuomet reikia



21 pav. Kiuvetės užpildymo schema pirmajai užduočiai.

pasirinkti kokiame gylyje patalpinsite fluorescuojantį sluoksnį. Tai galėtų būti 3 – 4 mm gylys. Tada atitinkamas kiuvetės skyrelis švirkštu yra užpildomas fluorescuojančia medžiaga – tai bus fluorescuojantis sluoksnis. Prieš jį esantys tušti skyreliai užpildomi sklaidančiąja terpe. Kad imituoti biologinį objektą, už

fluorescuojančio sluoksnio esantys skyreliai taipogi yra užpildomi sklaidančiąja terpe 21 pav. Kai viskas paruošta – užregistruojami fluorescencijos spektrai



22 pav. Kiuvetės užpildymo schema antrajai užduočiai.

skirtinguose atstumuose nuo fluorescencijos žadinimo šviesolaidžio ir duomenys išsaugomi kompiuteryje. Vėliau jie yra atvaizduojami grafiškai.

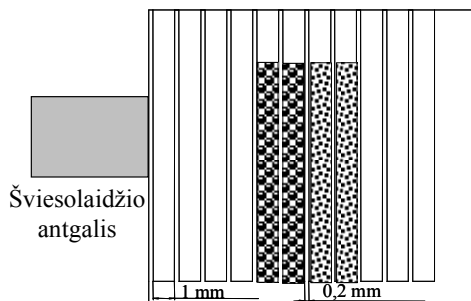
2. Išmatuoti dviejų fluorescuojančių sluoksnių fluorescenciją terpės paviršiuje.

Atlikus tam tikrus fluorescuojančio sluoksnio pokyčius (sustorėjimas/suplonėjimas), nustatyti juos iš giluminės fluorescencijos spektrų.

Prieš atliekant užduotį reikia kruopščiai išplauti kiuvetę. Šioje užduotyje jau naudosime dviejų dydžių kvantinius taškus. Tai galėtų būti Kt, kurių fluorescencija stebima ties 540 nm (Kt1) ir ties 610 nm (Kt2). Pirmajam fluorescuojančiam sluoksniui turi būti parinkti Kt1, o sekančiam, giliau esančiam – Kt2. Tokia kombinacija yra parinkta dėl to, kad pirmutinis sluoksnis nesugertų iš gilesniojo sluoksnio ateinančios fluorescencijos. Taigi Kt1 yra patalpinami 3 – 4 mm gylyje, o už jų sekančiuose trijuose skyreliuose patalpinami Kt2. Kaip ir pirmame eksperimente, prieš fluorescuojančius sluoksnius ir už jų yra pilamas sklaidos tirpalas. 22 pav. pateikta antros užduoties kiuvetės užpildymo schema. Jei atliekant pirmąją užduotį į 5-ąją skyrelį buvo įpilti tie patys kvantiniai taškai, tai atliekant antrąją užduotį jų išpilti nereikia. Šiuo atveju nereikia ir išplauti kiuvetės. Parengus daugiasluoksnią modelinę sistemą užregistruojamas giluminės fluorescencijos pasiskirstymas paviršiuje – užregistruojami fluorescencijos spektrai skirtinguose atstumuose nuo žadinimo šviesolaidžio ir išsaugomi kompiuteryje. Paskaičiuojami kvantinių taškų intensyvumų santykiai kiekviename atstume (1,2,3,...8 mm) nuo žadinimo šviesolaidžio  $\frac{I_x(Kt_2)}{I_x(Kt_1)}$ , kai  $x = 1, 2, \dots, 8$  mm. Šiuo atveju yra imami intensyvumai ties Kt liuminescencijos smailėmis.

Paskaičiuotus šiuos santykius nubrėžiamas jų priklausomybės nuo registravimo atstumo grafikas.

Sekančioje šios užduoties dalyje bus imituojamas sluoksnio storių pokytis. Biologiniame objekte tai atitinka tam tikrus procesus vykstančius audinyje, pvz. vidinių sluoksnių storėjimą/plonėjimą, kas kartais gali rodyti naviko vystymąsi, arba sensibilizatoriaus kaupimosi audinyje dinamiką ar naviko nekrozę. Taigi bus pastorintas viršutinis fluorescuojantis sluoksnis (Kt1) ir suplonintas apatinis fluorescuojantis sluoksnis (Kt2). Tam tikslui yra išsiurbiamas vienas (pirmasis) Kt2 užpildytas skyrelis ir jis yra užpildomas Kt1. Prieš fluorescuojančius sluoksnius ir už jų yra pilama sklaida. Užpildymo



23 pav. Kiuvetės užpildymo schema antrajai antros užduoties daliai.

schema pateikta 23 pav. Užregistruoti fluorescencijos intensyvumų pasiskirstymai išsaugomi kompiuteryje. Toliau reikia paskaičiuoti fluorescencijos intensyvumų pokyčius mažiausiai (1 mm atstumu) ir daugiausiai (8 mm atstumu) nuo žadinimo šviesolaidžio nutolusiuose šviesolaidžiuose  $\frac{I_1(Kt_1)}{I_1(Kt_1)}$  ir  $\frac{I_8(Kt_1)}{I_8(Kt_1)}$ . Šiuo

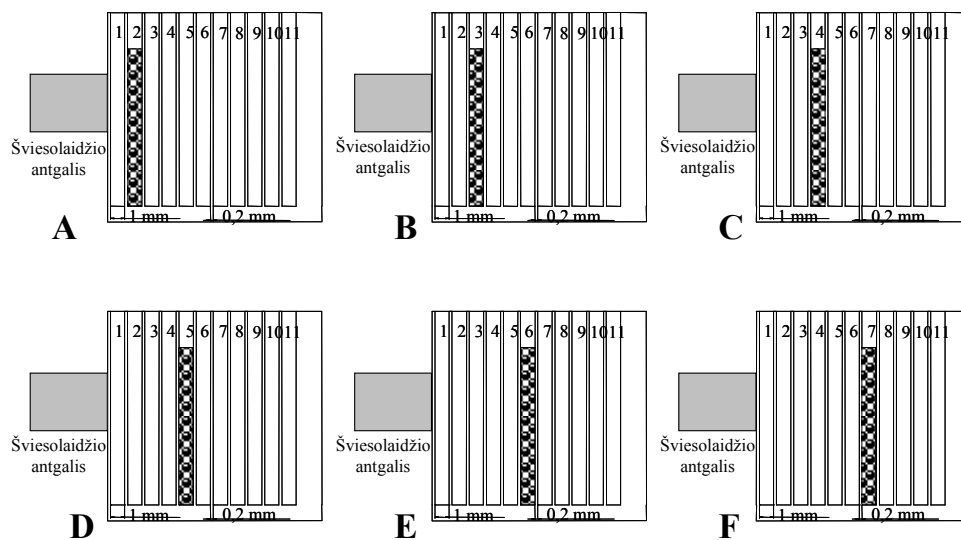
atveju yra imamas Kt intensyvumas prieš sluoksnio storio pokytį ir po pakeitimo. Tie patys skaičiavimai atliekami ir su Kt2. Iš šių intensyvumų pokyčių reikia nustatyti ar yra įmanoma remiantis vien tik giluminės fluorescencijos spektrais nusakyti kokie pokyčiai įvyko sistemoje. Kaip pavyzdį galime paanalizuoti Kt1 fluorescencijos elgseną. Atlikus sluoksnio storio pakeitimus fluorescencijos intensyvumas turėtų padidėti. Jei papildomas sluoksnis buvo pridėtas iš giliau, tai fluorescencijos intensyvumas daugiau turėjo padidėti tolimiausiame šviesolaidyje, lyginant su artimiausiu. Taip yra todėl, kad arti žadinimo šviesolaidžio esantys surinkimo šviesolaidžiai yra labiau jautresni viršutiniams sluoksniams, o toliau nuo žadinimo esantys



surinkimo šviesolaidžiai yra jautresni gilesniems sluoksniams, todėl fluorescencijos intensyvumo padidėjimas 8 šviesoliadyje ir buvo didesnis. Analogiškos išvados gali būti padarytos analizuojant ir gilesniojo sluoksnio fluorescenciją. Šiuo atveju intensyvumas turėjo sumažėti, kadangi fluorescuojantis sluoksnis buvo suplonintas. Remiantis teorija, arti žadinimo šviesolaidžio esančiuose surinkimo šviesolaidžiuose intensyvumas turėjo sumažėti daugiau nei tolimuosiuose šviesolaidžiuose, kadangi fluorescuojantis sluoksnis buvo suplonintas iš viršaus.

3. Išmatuoti fluorescencijos intensyvumų pasiskirstymus sklaidančiosios terpės paviršiuje, kai fluorescuojantis objektas yra skirtinguose gyliuose (1, 2, 3 ... 6 mm).

Prieš atliekant užduotį reikia kruopščiai išplauti kiuvetę. Toliau eksperimentai bus atliekami naudojant tik vieno tipo kvantinius taškus. Šioje užduotyje kvantiniai taškai bus pirmiausia patalpinami į antrąjį kiuvetės skyrelį (sluoksnis bus 1 mm gylyje). Atitinkamai skyrelis prieš jį ir skyreliai už jo bus užpildomi sklaida. Užregistruojamas fluorescencijos intensyvumų pasiskirstymas ir rezultatai išsaugomi kompiuteryje. Toliau kvantiniai taškai yra



24 pav. Trečiosios užduoties kiuvetės užpildymo schema. A – fluorescuojantis sluoksnis yra 1 mm gylyje, B – 2 mm, C – 3 mm, D – 4 mm, E – 5 mm, F – 6 mm.

išsiurbiami iš antrojo skyrelio ir patalpinami trečiajame (sluoksnis bus 2 mm gylyje). Vėlgi skyreliai prieš Kt ir už jų užpildomi sklaida. Užregistruojamas fluorescencijos intensyvumų pasiskirstymas ir rezultatai išsaugomi kompiuteryje. Eksperimentas kartojamas kol kvantiniai taškai bus patalpinti į septintąjį skyrelį (sluoksnis bus 6 mm gylyje). Kiuvetės užpildymo schema visiems trečiosios užduoties etapams pavaizduota 24 pav.

4. Apskaičiuoti intensyvumų pasiskirstymo konstantas kiekvienam gyliui ir sudaryti atraminę kreivę fluorescuojančio objekto gyliui nustatyti.

Šiuo tikslu yra surandamos Kt liuminescencijos smailių intensyvumų vertės visiems 8 šviesolaidžiams kiekvienam fluorescuojančio sluoksnio gyliui. Šios vertės yra atidedamos priklausomai nuo fluorescencijos registravimo nuo žadinimo šviesolaidžio atstumo ir gauta kreivė aproksimuojama pirmos eilės eksponente  $y = y_0 + A_1 e^{-x/t}$ . Gautas gesimo koeficientas t bus specifinis visiems fluorescuojančio sluoksnio gyliams. Taigi atlikę skaičiavimus gausime 6 gesimo koeficientus, kurie atitinka intensyvumų pasiskirstymo konstantas. Nubrėžiama atraminė kreivė (intensyvumo pasiskirstymo konstantos priklausomybė nuo fluorescuojančio sluoksnio gylio).

5. Išmatuoti nežinomame gylyje esančio objekto fluorescenciją, apskaičiuoti nežinomame gylyje esančio objekto intensyvumų pasiskirstymo konstantą ir iš atraminės kreivės įvertinti objekto gylį.

Paskutinėje užduotyje kvantiniai taškai yra patalpinami į bet kurį gylį (į bet kurį kiuvetės skyrelį). Užregistruojamas intensyvumų pasiskirstymas. Surandami intensyvumai ties liuminescencijos smailėmis visiems registravimo atstumams ir atidedami grafiškai priklausomai nuo registravimo atstumo. Gauta kreivė yra aproksimuojama pirmos eilės eksponente  $y = y_0 + A_1 e^{-x/t}$  ir

randama intensyvumų pasiskirstymo konstanta. Iš 4 užduotyje nubrėžtos atraminės kreivės įvertinamas fluorescuojančio objekto gylis.

## **6. Kontroliniai klausimai.**

1. Fluorescencijos reiškiny. Jablonskio diagrama.
2. Sklaida biologiniuose objektuose ir jos registravimo būdai.
3. Šviesolaidžių tipai ir jų taikymas diagnostikoje.
4. Giluminės fluorescencijos registravimo būdai.
5. Šviesolaidinis spektrų registravimo įrenginys.

## **7. 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. Markolf H. Niemz, Laser – tissue interactions. Germany, 1996, p. 9-44.
4. Zhu Ch., Liu Q., Ramanujam N. Effect of fiber optic probe geometry on depth-resolved fluorescence measurements from epithelial tissues: a Monte Carlo simulation. J. of Biomed. Opt. 2003, 8(2), p. 237-247.
5. U. Utzinger, R.R. Richards-Kortum, Fiber optics probes for biomedical optical spectroscopy. Journal of Biomedical Optics 8(1), 2003, p.121-147.
6. Wu Y., Xi P., Qu J. Y. Depth-resolved fluorescence spectroscopy reveals layered structure of tissue. Optics Express. 2004, 12(14), p. 3218-3223.
7. Brian W., Burke P., Burke G. Fiber-optic bundle design for quantitative fluorescence measurement from tissue. Applied Optics. 1998, 37(31), p. 7429-7436.
8. Hyde D. E., Farrell T. J., Patterson M. S., Wilson B. C. A diffusion theory model of spatially resolved fluorescence from depth-dependent fluorophore concentrations. Phys. Med. Biol. 2001, 46, p. 369-383.