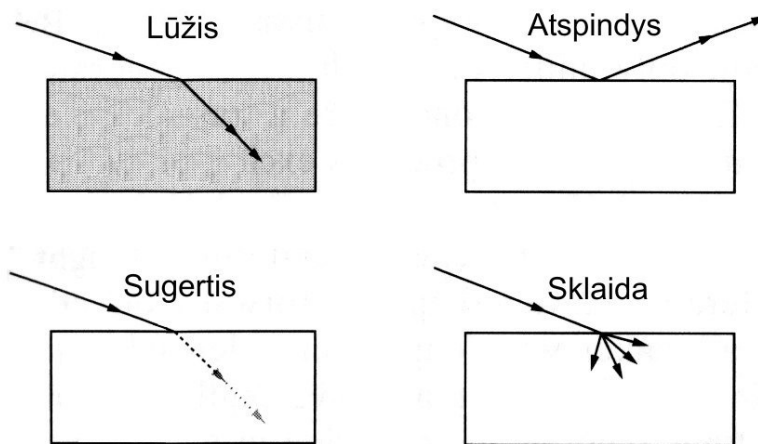


### 3. ŠVIESOS SKLIDIMAS BIOLOGINĖSE TERPĖSE

Optinė biopsija, įgalinanti charakterizuoti audinius ir diagnozuoti jų pokyčius, pagrįsta šviesos sąveika su biologiniais audiniais. Skirtingai negu ląstelių kultūros, kurias aplinkoje palaiko terpė, audiniai yra vientisa pati save palaikanti struktūra ir terpė, kurioje šviesą sugeriantys ir šviesą sklaidantys centrai išsidėstę atsitiktine tvarka. Šviesos sklidimas audiniu, kaip ir kiekviena neskaidria aplinka, sukelia įvairius vyksmus: lūžį, atspindį, sklaidą ir sugertį (3.1 pav.).



3.1 pav. Šviesos sąveikos su neskaidria aplinka sukelti vyksmai

Šviesos lūžis ir atspindys yra glaudžiai susiję tarpusavyje ir aprašomi Frenelio dėsniais. Atspindys priklauso nuo šviesos kritimo kampo: kuo jis didesnis, tuo didesnis atspindys nuo paviršiaus. Taigi daugiausia šviesos prasiskverbs į audinį, jei ji kris  $90^\circ$  kampu (t. y. šviesos spindulys bus statmenas audinio paviršiui). Labiausiai pastebimas reiškinys yra šviesos *sklaida*, nes biologinis audinys yra labai sklaidanti terpė. Audinio drumstumas, jo nepralaidumas šviesai “susidaro” dėl sudėtinės sklaidos nuo heterogeninių audinio komponentų: makromolekulių, ląstelių organėlių, mikroskopinių vandens sankaupų. Manoma, kad sklaida kyla dėl įvairių audinio komponentų nedidelių lūžio rodiklių skirtumų. Šie skirtumai šiek tiek keičia šviesos sklaidimo audiniu kryptis. Nors krypčių pokyčiai yra menki, jų visuma šviesai sklindant audiniu sukelia ženklus vyksmus.

Dėl audinio ir išorinės terpės lūžio rodiklių skirtumo susiformuoja atspindys ir lūžis ties terpių riba. Kai krintanti šviesa atsispindi nuo audinio paviršiaus, įvyksta veidrodinis atspindys. Kai šviesa audinio viduje yra atspindima nuo paviršiaus atgal į audinį, įvyksta vidinis atspindys. Šviesą audinyje sugeria įvairūs ląstelių ir tarpląstelinės terpės komponentai.

Tai gali būti audiniuose esantys (endogeniniai) arba tikslingai į audinį įterpti (egzogeniniai) chromoforai, kurie sugertą šviesą gali išspinduliuoti fluorescencijos pavidalu.

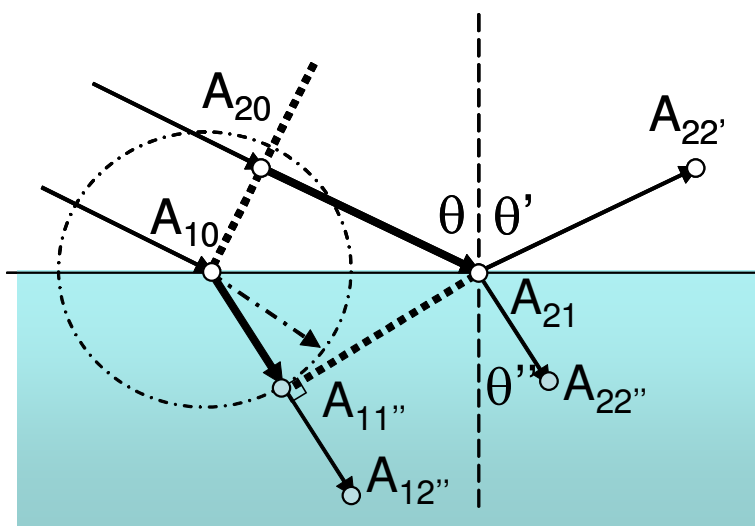
### 3.1. Šviesos atspindys ir lūžis

Šviesos atspindys suprantamas kaip elektromagnetinės spinduliuotės atspindėjimas nuo paviršiaus, į kurį spinduliuotė krinta. Paprastai atspindintis paviršius yra skirtingus lūžio rodiklius turinčių dviejų medžiagų riba (pavyzdžiui, biologinis audinys ir oras). Pagal paprastą atspindžio dėsnį, krintantis ir atspindžio spinduliai bei statmuo atspindinčiam paviršiui yra vienoje plokštumoje, o atspindžio kampas  $\theta'$  yra lygus kritimo kampui  $\theta$  (3.2 pav.):

$$\theta = \theta'. \quad (3.1.1)$$

Kai paviršius, į kurį krinta šviesa, yra glotnus, o jo nelygumai yra maži, lyginant su krintančios šviesos bangų ilgiais, vyksta veidrodinis atspindys.

Jei paviršiaus nelygumai yra palyginamo dydžio arba didesni nei krintančios šviesos bangos ilgis, vyksta difuzinis atspindys. Tada ne visi atspindimi spinduliai yra vienoje plokštumoje, ir (3.1.1) lygybė nebegalioja. Difuzinis atspindys yra būdingas visiems biologiniams audiniams, nes jokie audiniai neturi tokio glotnaus paviršiaus, koks būdingas optiniams veidrodžiams.



3.2 pav. Šviesos veidrodinio atspindžio ir lūžio geometrija.  $A_{10}A_{20}$  ir  $A_{11''}A_{21}$  žymi kritusios ir lūžusios plokščios šviesos bangos frontą.

Šviesos lūžis vyksta tada, kai elektromagnetinė spinduliuotė kerta dviejų terpių, kurių lūžio rodikliai yra skirtingi, ribą. Lūžis vyksta dėl to, kad įvairiose terpėse šviesos bangos sklaidimo greitis yra skirtingas (pvz., per tą patį laiką vienas spindulys nusklinda nuotolį

$A_{20}A_{21}$ , o kitas –  $A_{10}A_{11}$ ). Šviesos bangos, kirsdamos ribą tarp skirtingų terpių, nukrypsta nuo pradinės sklidimo krypties, kiekvieną tašką pasiekdamos trumpiausiu optiniu keliu. Matematiškai šį reiškinį aprašo Snelio (Snell) dėsnis:

$$\frac{\sin \theta}{\sin \theta''} = \frac{v}{v'}; \quad (3.1.2)$$

čia  $\theta''$  yra lūžio kampas,  $v$  ir  $v'$  – šviesos greitis atitinkamai terpėse iki atspindinčio paviršiaus ir už jo. Kadangi terpės lūžio rodiklis nusako monochromatinės šviesos greičio sumažėjimą joje:

$$n = \frac{c}{v}, \quad (3.1.3)$$

kur  $c$  yra šviesos greitis vakuume, tai (3.1.2) formulė gali būti perrašyta taip:

$$n \sin \theta = n' \sin \theta''. \quad (3.1.4)$$

Kai  $\sin \theta > n'/n$ , (3.1.4) lygybė negalioja, t. y. šviesos lūžis nevyksta. Toks reiškinys vadinamas visišku atspindžiu. Jis pritaikomas kuriant lanksčias šviesos perdavimo sistemas – šviesolaidžius.

Paviršiaus atspindžio geba yra atspindėtos spinduliuotės matas. Ji išreiškiama atspindėto ir krintančio elektrinio lauko amplitudžių santykiu. Atspindžio koeficientas yra atitinkamų intensyvumų santykis ir yra lygus atspindžio gebos kvadratui.

Atspindžio geba ir atspindžio koeficientas priklauso nuo šviesos kritimo kampo, šviesos poliarizacijos ir terpių lūžio rodiklių. Atspindžio gebos ir lūžio sąryšius nusako Frenelio dėsniai:

$$\frac{E_s'}{E_s} = -\frac{\sin(\theta - \theta'')}{\sin(\theta + \theta'')}, \quad (3.1.5)$$

$$\frac{E_p'}{E_p} = \frac{\tan(\theta - \theta'')}{\tan(\theta + \theta'')}, \quad (3.1.6)$$

$$\frac{E_s''}{E_s} = \frac{2 \sin \theta'' \cos \theta}{\sin(\theta + \theta'')}, \quad (3.1.7)$$

$$\frac{E_p''}{E_p} = \frac{2 \sin \theta'' \cos \theta}{\sin(\theta + \theta'') \cos(\theta - \theta'')}, \quad (3.1.8)$$

čia  $E$ ,  $E'$  ir  $E''$  yra atitinkamai krintančios, atspindėtos ir lūžusios šviesos elektrinio lauko vektorių amplitudės. Indeksai  $s$  ir  $p$  žymi dvi osciliacijos plokštumas:  $s$  – statmeną šviesos kritimo plokštumai (iš vokiško žodžio “senkrecht”) ir  $p$  – lygiagrečią (paralelią) šviesos kritimo plokštumai.

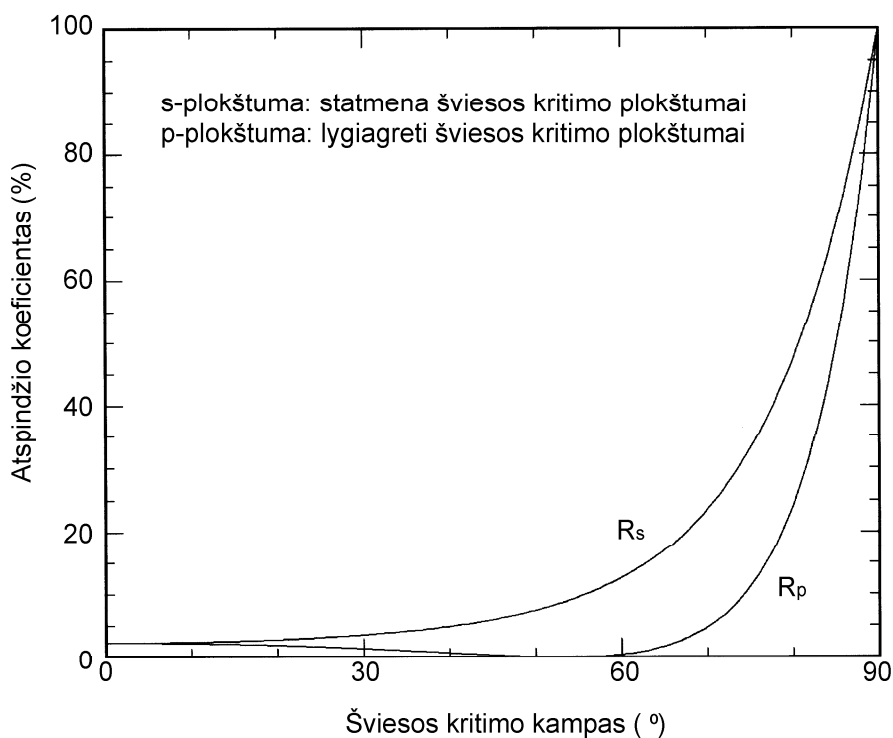
Tolesnė krintančios šviesos sąveika su medžiaga susijusi tik su lūžusio spindulio sklidimu. Būtų galima tikėtis, kad lūžusio ir atspindėto spindulių intensyvumų suma turėtų būti lygi krintančios šviesos intensyvumui. Tačiau taip nėra, nes intensyvumas yra galia, tenkanti ploto vienetui, o lūžusio spindulio skerspjūvis yra kitoks negu krintančio ir atspindėto spindulių. Tik šių spindulių bendra energija išlieka nepakitusi. Kiekvienos plokštumos atspindžio koeficientai yra:

$$R_s = \left( \frac{E_s'}{E_s} \right)^2, \quad (3.1.9)$$

$$R_p = \left( \frac{E_p'}{E_p} \right)^2. \quad (3.1.10)$$

Veidrodinį atspindį nuo drėgno paviršiaus vaizduojančios kreivės pateikiamos 3.3 paveiksle. Čia parodyta atspindžio koeficientų  $R_s$  ir  $R_p$  priklausomybė nuo šviesos kritimo kampo. Laikoma, kad lūžis vyksta ties dviejų terpių – oro ir vandens – riba. Oro lūžio rodiklis  $n = 1$ , o vandens –  $n' = 1,33$ .

Šviesos kritimo kampas, kai  $R_p = 0$ , yra vadinamas Briusterio (Brewster) kampu. Vandens atveju jis lygus  $53^\circ$ . Esant statmenam šviesos kritimui, kai kritimo kampas  $\theta = 0$ , abiejų plokštumų atspindžio koeficientai apytikriai yra apie 2%. Ši vertė nėra tiesiogiai



3.3 pav. Vandens ( $n = 1,33$ ) atspindžio koeficientai skirtingos poliarizacijos šviesai.

gaunama iš (3.1.5) ir (3.1.6) formulių, kadangi įstačius  $\theta = \theta'' = 0$ , gaunamas neapibrėžtas rezultatas. Tačiau rezultatą galima gauti atlikus tam tikrus pakeitimus. Kadangi artėjant prie statmeno šviesos kritimo, kampai  $\theta$  ir  $\theta'$  tampa labai maži, formulėje (3.1.6) tangentes galima pakeisti sinusais ir tada gaunama:

$$R_p \approx R_s = \frac{\sin^2(\theta - \theta'')}{\sin^2(\theta + \theta'')} = \left( \frac{\sin \theta \cos \theta'' - \cos \theta \sin \theta''}{\sin \theta \cos \theta'' + \cos \theta \sin \theta''} \right)^2. \quad (3.1.11)$$

Padalijus (3.1.11) formulės skaitiklį ir vardiklį iš  $\sin \theta''$ , pakeitus  $\sin \theta / \sin \theta''$  į  $n'$  ir laikant, kad oro lūžio rodiklis  $n = 1$ , gaunama:

$$R_p \approx R_s = \left( \frac{n' \cos \theta'' - \cos \theta}{n' \cos \theta'' + \cos \theta} \right)^2 \cong \left( \frac{n' - 1}{n' + 1} \right)^2 \quad (3.1.12)$$

Apytikrė lygtis tampa tiksli statmeno šviesos kritimo atveju. Įstačius vandens lūžio rodiklį  $n' = 1,33$ , gaunama:

$$R_p \approx R_s \approx 2\%.$$

Kartais ir tokios, atrodytų, nedidelės atspindėtos šviesos dalies nereiktų ignoruoti. Ypač svarbu nuo atspindėtos šviesos saugoti akis dirbant su lazeriais.

Šviesos lūžio rodiklis terpėje priklauso nuo jos bangos ilgio. Vandens lūžio rodikliai ir atspindžio koeficientai ties įvairiais bangų ilgiais pateikiami 3.1 lentelėje. Vandens sugerties spektre yra dvi intensyvios juostos ties 2,9  $\mu\text{m}$  ir 6,0  $\mu\text{m}$ .

**3.1 lentelė.** Vandens lūžio rodikliai ir atspindžio koeficientai (pagal Hale ir Query, 1973)

| Bangos ilgis, $\lambda$ ( $\mu\text{m}$ ) | Lūžio rodiklis, $n$ | Atspindžio koeficientas |
|---|---------------------|-------------------------|
| 0,2                                       | 1,396               | 0,027                   |
| 0,3                                       | 1,349               | 0,022                   |
| 0,4                                       | 1,339               | 0,021                   |
| 0,5                                       | 1,335               | 0,021                   |
| 0,6                                       | 1,332               | 0,020                   |
| 0,7                                       | 1,331               | 0,020                   |
| 0,8                                       | 1,329               | 0,020                   |
| 0,9                                       | 1,328               | 0,020                   |
| 1,0                                       | 1,327               | 0,020                   |
| 1,6                                       | 1,317               | 0,019                   |

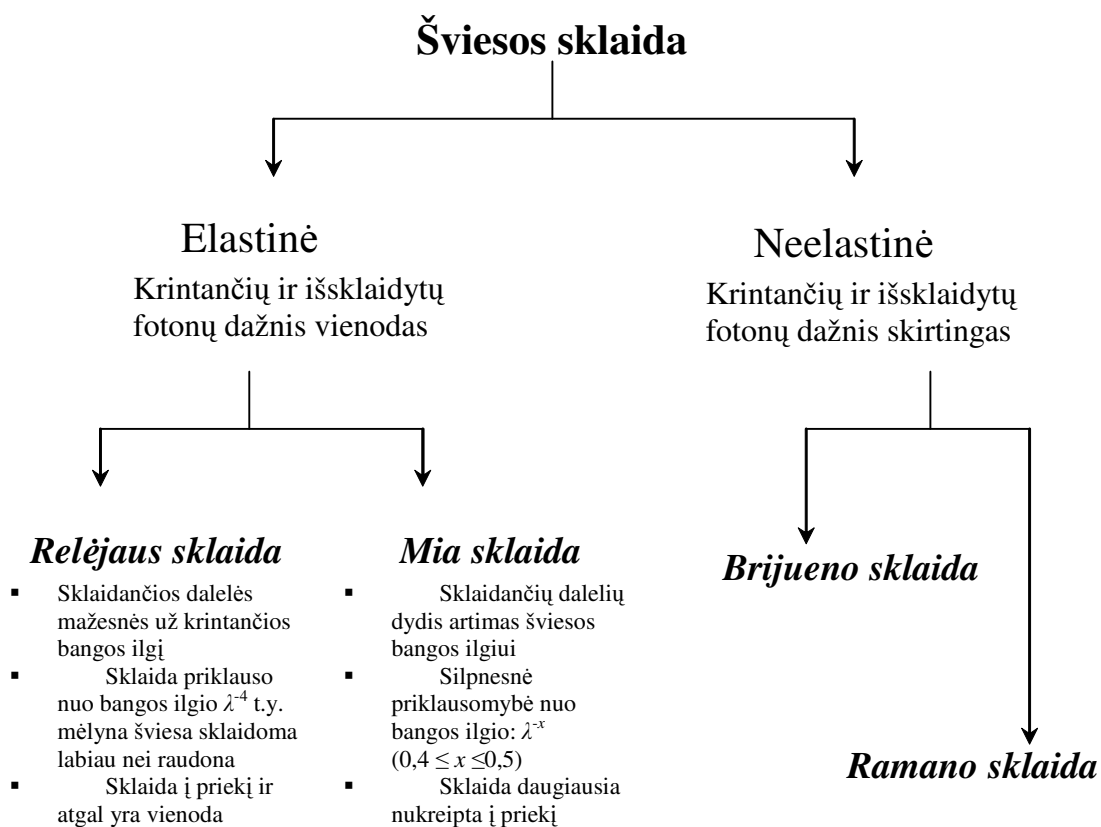
|      |       |       |
|------|-------|-------|
| 2,0  | 1,306 | 0,018 |
| 2,6  | 1,242 | 0,012 |
| 2,7  | 1,188 | 0,007 |
| 2,8  | 1,142 | 0,004 |
| 2,9  | 1,201 | 0,008 |
| 3,0  | 1,371 | 0,024 |
| 3,1  | 1,467 | 0,036 |
| 3,2  | 1,478 | 0,037 |
| 3,3  | 1,450 | 0,034 |
| 3,4  | 1,420 | 0,030 |
| 3,5  | 1,400 | 0,028 |
| 4,0  | 1,351 | 0,022 |
| 5,0  | 1,325 | 0,020 |
| 6,0  | 1,265 | 0,014 |
| 7,0  | 1,317 | 0,019 |
| 8,0  | 1,291 | 0,016 |
| 9,0  | 1,262 | 0,013 |
| 10,0 | 1,218 | 0,010 |

Nors regimosios šviesos ruože keičiantis bangos ilgiui lūžio rodiklis kinta menkai, jį reikia turėti galvoje siekiant nuspėjamų rezultatų. Dėl šviesos sugerties ir sklaidos įvairių rūšių audinių lūžio rodiklių indeksus išmatuoti yra labai sudėtinga, o atspindį nuo audinių galima įvertinti tik empiriškai.

### **3.2. Šviesos sklaida**

Kai elektromagnetinė banga susiduria su kliūtimi (dalele), gali vykti sugertis arba sklaida. Sugerties atveju dalelė įgauna perteklinės energijos, kurią gali atiduoti šilumos pavidalu arba išspinduliuoti elektromagnetinę bangą, kurios dažnis bus mažesnis nei sugertos bangos (vyksta fluorescencija). Sklaidos atveju elektromagnetinė banga indukuoja dipolio momentą, kuris osciliuoja tokiu pat dažniu kaip ir banga. Tokio indukuoto dipolio virpesiai ir sukelia išsklaidytą bangą. Sklaidos vyksmai audiniuose yra sudėtingi ir įvairūs. Neelastinė sklaida biologiniuose audiniuose yra labai silpna ir čia nebus nagrinėjama.

Skaidos priežastis – optiškai nevienalytė šviesos kelio aplinka. Tokia aplinka susidaro, kai terpėje yra daug dalelių, kuriuose šviesos lūžio rodiklis yra kitoks, nei terpės. Šviesos banga, susidūrusi su tokia dalele, difraguoja ir keičia sklaidimo kryptį. Kai dalelės dydis apytikriai lygus  $0,1-0,2 \lambda$ , difragavusi šviesa maždaug tolygiai sklinda visomis kryptimis. Jeigu dalelės didesnės, šviesos difrakcija aprašoma sudėtingiau. Tada difragavusios šviesos sklaidimas įvairiomis kryptimis priklauso nuo dalelių dydžio, formos ir lūžio rodiklio. Šviesos sklaidos vyksmai apibendrinti 3.4 paveiksle.



3.4 pav. Sklaidos vyksmai audiniuose.

Vykstant elastinei sklaidai elektromagnetinės bangos sukelti virpesiai yra tokio pat dažnio kaip ir juos sukėlusios bangos, t. y. krintančių ir išsklaidytų fotonų energija yra vienoda. Atskira elastinės sklaidos rūšis yra Relėjaus sklaida, vykstanti tada, kai sklaidanti dalelė yra mažesnė už krintančios šviesos bangos ilgį. Plokščia elektromagnetinė banga krinta į sklaidančios terpės sluoksnelį, kurio storis  $L$ . Tam tikru laiko momentu krintančios bangos elektrinis laukas gali būti išreikštas kaip:

$$E(z) = E_0 \exp(ikz), \quad (3.2.1)$$

čia  $E_0$  yra krintančios šviesos elektrinio lauko amplitudė,  $k$  – banginis vektorius,  $z$  nurodo optinę ašį. Pirmu priartėjimu tariame, kad tam tikrą optinės ašies tašką P pasiekusi banga bus sudaryta iš pradinės bangos ir nedidelio sklaidos įnašo. Dėl sklaidos sumažėjęs intensyvumas gali būti išreiškiamas lygtimi:

$$I(z) = I_0 \exp(-\alpha_s z) \quad (3.2.2)$$

čia  $\alpha_s$  yra sklaidos koeficientas. Intensyvumo pokytį sklindant bangai skaidria aplinka  $z$  kryptimi galima apskaičiuoti diferencijuojant (3.2.2) lygtį:

$$dI = -\alpha_s I dz. \quad (3.2.3)$$

Taigi, plono sluoksnio išsklaidytas šviesos intensyvumas yra proporcingas sklaidos koeficientui  $\alpha_s$  ir sluoksnio storiui  $L$ :

$$I_s \sim \alpha_s L. \quad (3.2.4)$$

Tarkime, kad viename sklaidančios terpės vienetė yra  $N \cdot L$  sklaidančių dalelių, tada dydis  $N$  nurodys sklaidančių dalelių tankį. Vienos dalelės išsklaidytos šviesos intensyvumas gali būti išreikštas santykiu:

$$I_l \sim \frac{\alpha_s L}{NL} = \frac{\alpha_s}{N}. \quad (3.2.5)$$

Kadangi elektromagnetinės bangos intensyvumas yra proporcingas jos elektrinės dedamosios amplitudės kvadratui, tai vienos dalelės išsklaidytos bangos elektrinio lauko amplitudė yra:

$$E_l \sim \sqrt{\frac{\alpha_s}{N}}. \quad (3.2.6)$$

Bendra išsklaidytų bangų elektrinio vektoriaus amplitudė išreiškiamą taip:

$$E_s \sim N \cdot L \sqrt{\frac{\alpha_s}{N}} = L \sqrt{\alpha_s N}. \quad (3.2.7)$$

Sklindant plokščiai elektromagnetinei bangai sklaidančia aplinka, jos amplitudė taške  $z$  ant optinės ašies gaunama prie krintančios plokščiosios bangos amplitudės pridėdam visų išsklaidytų sferinių bangų amplitudes:

$$E(z) = E_0 \left( e^{ikz} + L \sqrt{\alpha_s N} \int_0^\infty \frac{e^{ikR}}{R} 2\pi r dr \right). \quad (3.2.8)$$

Ryšys tarp vektorių  $r$  ir  $z$  pagal Pitagoro teoremą išreiškiamas taip:

$$R^2 = z^2 + r^2.$$

Tuomet, atsižvelgiant, kad  $r dr = R dR$ , tada (3.2.8) lygtis supaprastėja:



$$E(z) = E_0 \left( e^{ikz} + L\sqrt{\alpha_s N} \cdot 2\pi \int_z^\infty e^{ikR} dR \right). \quad (3.2.9)$$

Kadangi bangų seka yra baigtinio ilgio, sklaidą, kai  $R \rightarrow \infty$  galima atmesti. Tada matematiškai pertvarkyta (3.2.9) formulė tampa

$$E(z) = E_0 \left( e^{ikz} - L\sqrt{\alpha_s N} \frac{2\pi}{ik} e^{ikz} \right),$$

o įstačius bangos ilgio išraišką  $\lambda = 2\pi/k$ ,

$$E(z) = E_0 e^{ikz} \left( 1 + i\lambda L\sqrt{\alpha_s N} \right). \quad (3.2.10)$$

Pagal priimtą prielaidą sklaidos įnašas ploname sluoksnyje, t. y. antrasis narys skliaustuose, yra gana mažas palyginti su pirmuoju. Tad jie gali būti pirmais dviem eksponentės eilutės išplėtimo nariais:

$$E(z) = E_0 \exp \left[ i \left( kz + \lambda L\sqrt{\alpha_s N} \right) \right]. \quad (3.2.11)$$

Taigi, krintančios bangos fazė dėl sklaidos pakinta dydžiu  $\lambda L\sqrt{\alpha_s N}$ . Ši vertė turi būti lygi gerai žinomai fazės vėlinimo, įvykstančio, kai šviesa patenka į terpę, kurios lūžio rodiklis  $n$ , išraiškai:

$$\Delta\phi = \frac{2\pi}{\lambda} (n-1)L.$$

Taigi

$$\lambda L\sqrt{\alpha_s N} = \frac{2\pi}{\lambda} (n-1)L, \quad (3.2.12)$$

$$n-1 = \frac{\lambda^2}{2\pi} \sqrt{\alpha_s N}.$$

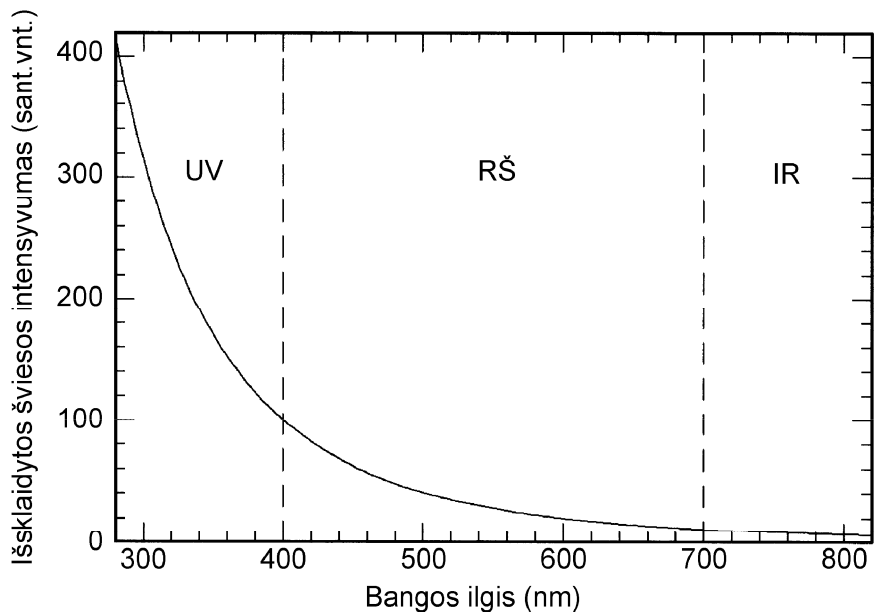
Iš (3.2.4) ir (3.2.12), laikant, kad lūžio rodiklis nepriklauso nuo bangos ilgio, gaunama Reilėjaus dėsnio išraiška – išsklaidytos šviesos intensyvumas atvirkščiai proporcingas bangos ilgiui ketvirtuoju laipsniu:

$$I_s \sim \frac{1}{\lambda^4}. \quad (3.2.13)$$

Pasitelkiant sklaidos kampą  $\theta$ , gaunama:

$$I_s(\theta) \sim \frac{1 + \cos^2(\theta)}{\lambda^4} \quad (3.2.14)$$

Reilėjaus sklaidos dėsnį iliustruoja 3.5 paveikslas. Regimosios šviesos ruože trumpesnės bangos (mėlynos) sklaidomos labiau nei ilgosios (raudonos).



3.5 pav. Įvairių bangos ilgių šviesos sklaida (Relėjaus dėsnio iliustracija).

Kai sklaidanti dalelė yra didesnė, nei krintančios bangos matmenys, vyksta Mia sklaida. Mia sklaida nuo Relėjaus skiriasi dviem pagrindiniais aspektais: silpnesne priklausomybe nuo bangos ilgio ( $\sim \lambda^{-x}$ , kai  $0,4 \leq x \leq 0,5$ ), be to Mia sklaidos atveju dalelės dažniausiai yra sklaidomos nedideliais kampais, t. y. nedaug nukrypsta nuo pradinės krypties. Pagal Relėjaus dėsnį, išsklaidytos šviesos intensyvumas proporcingas  $1 + \cos^2 \theta$ , taigi spinduliuotės, išsklaidytos į priekį ir atgal, intensyvumai yra vienodi. Dalelių sklaida Relėjaus ir Mia atvejais pavaizduota 3.6 paveiksle.

Biologiniuose audiniuose sklaida vyksta dviejų skirtingo optinio tankio terpių sandūroje – skirtingų ląstelių sluoksnių, citozolio ir ląstelės membranos, citoplazmos ir ląstelės organėlių. Sklaidą audinyje apibūdinti yra gana sudėtinga, nes ji priklauso ir nuo audinio morfologijos, ir nuo ląstelių formos, ir nuo jose esančių organėlių. Pastebėta, kad daugelyje



3.6 pav. Išsklaidytų dalelių kryptys Relėjaus bei Mia sklaidos atvejais.

biologinių audinių šviesa sklaidoma nedideliais kampais, taigi atrodytų, kad audiniuose vyrauja Mia sklaida, tačiau nustatyta sklaidos kampo priklausomybė nuo bangos ilgio yra kur kas artimesnė Reilėjaus sklaidai. Dažniausiai į audinį patekusi šviesa yra sklaidoma visų minėtų sklaidos elementų, kurių dydžiai labai įvairūs, todėl audiniuose vyksta tiek Reilėjaus, tiek Mia sklaida.

Siekiant aprašyti sklaidą audiniuose, pasitelkiama fazinė funkcija  $p(\theta)$ , kuri nusako tikimybę fotonui būti išsklaidytam kampu  $\theta$ . Dažniausiai naudojama Henėjaus–Grynšteino fazinė funkcija:

$$p(\theta) = \frac{1 - g^2}{(1 + g^2 - 2g \cos \theta)^{3/2}}. \quad (3.2.15)$$

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 sklidimo kryptimi), kai  $g = -1$  sklaida vyksta atgal (kryptimi, priešinga spinduliuotės sklidimui), 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 sklaida dažniausiai vyksta  $8^\circ - 45^\circ$  kampais.

### 3.3. Šviesos sugertis biologiniame audinyje

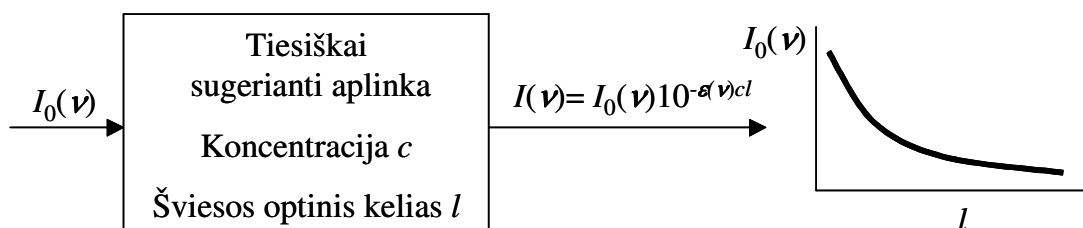
Audiniuose taip pat vyksta ir konkuruojantis procesas – sugertis, todėl reikia atsižvelgti ir į šį spinduliuotės silpimo procesą. Neskaidria terpe sklindančios elektromagnetinės bangos intensyvumas slopsta dėl to, kad dalį šviesos terpė sugeria. Šviesos sugertis apibrėžiama sugertos ir krintančios šviesos intensyvumų santykiu. Sugerties sąlygoti nuostoliai atsiranda dėl to, kad dalis terpe sklindančio šviesos pluošto energijos sunaudojama sugeriančioms molekulėms sužadinti, o vėliau virsta terpės molekulių vibracijomis, fluorescencijos spinduliuote ar sukelia terpėje fotocheminius virsmus. Terpės geba sugerti elektromagnetinę spinduliuotę priklauso nuo įvairių veiksnių – nuo terpę sudarančių atomų ir molekulių elektroninės struktūros, nuo spinduliuotės bangų ilgio, sugeriančio sluoksnio storio, nuo šviesą sugeriančių medžiagų (endogeninių chromoforų) koncentracijos. Visiškai skaidri terpė šviesos visai nesugeria, t. y. visa į terpę krintančios spinduliuotės energija lygi terpę paliekančios spinduliuotės energijai. Iš biologinių audinių tik akies ragena ir lęšis yra skaidrūs regimajai šviesai. Tiksliai aprašyti fotono kelią dėl sudėtingo sklaidančiųjų bei sugeriančiųjų elementų erdvinio išsidėstymo, taip pat ir vykstančios įvairių tipų sklaidos yra sudėtinga.

Sprendimui palengvinti pasitelkiamas dydis – optinis albedo  $a$ , kuris apibrėžiamas taip:

$$a = \frac{\alpha_{sk}}{\alpha_{sk} + \alpha_{sg}}; \quad (3.3.1)$$

čia  $\alpha_{sk}$  žymi sklaidos koeficientą, o  $\alpha_{sg}$  – sugerties koeficientą. Kai  $a = 0$ , šviesos silpimas vyksta tik dėl sugerties, o kai  $a = 1$  – dėl sklaidos.

Jei žadinimui naudojama šviesa, kurią gerai sugeria terpės endogeniniai chromoforai, šviesos intensyvumo  $I$  eksponentinį silpnėjimą nusako Lamberto-Bero dėsnis (žr. 1.5.8 išraišką), t. y. sugertos elektromagnetinės spinduliuotės intensyvumas eksponentiškai priklauso nuo sugeriančių dalelių koncentracijos ir nuo šviesą sugeriančio sluoksnio storio (3.7 pav.).



3.7 pav. Šviesos sugertis optiškai vienalytėje terpėje.

Biologiniuose audiniuose šviesą sugeria vanduo ir makromolekulės, daugiausia baltymai ir įvairūs pigmentai. Vandens molekulės sugeria IR ruožo šviesą, o baltymai ir pigmentai – UV ir regimąją šviesą. Baltymų sugerties spektro smailė yra maždaug ties 280 nm (Boulnois, 1986). Odos pigmento melanino sugertis didėja mažėjant bangos ilgiui (3.8 pav.)

Šviesai sklindant audiniu intensyvumas eksponentiškai silpnėja ne tik dėl sugerties, bet ir dėl sklaidos. Todėl bendras šviesos intensyvumo sumažėjimas išreiškiamas taip:

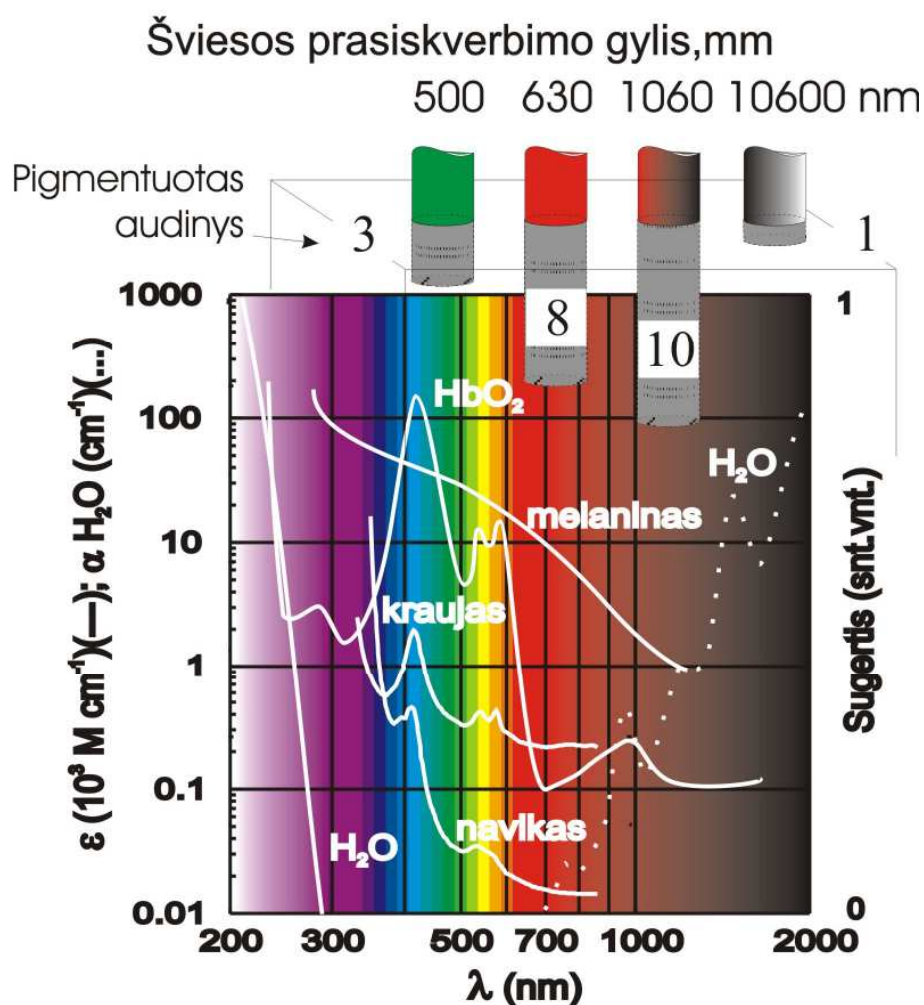
$$I(z) = I_0 \cdot e^{-(\alpha_{sk} + \alpha_{sg})z} \quad (3.3.2)$$

Čia  $I(z)$  yra šviesos intensyvumas audinio gylyje  $z$ ;  $I_0$  yra į audinį krintančios šviesos stipris;  $\alpha_{sg}$  ir  $\alpha_{sk}$  yra atitinkamai sugerties ir sklaidos koeficientai. Taigi dydis  $\alpha_{sg} + \alpha_{sk}$  leidžia įvertinti šviesos intensyvumo nuostolius audinyje. Kitas dydis, naudojamas audinio optiniam pralaidumui apibūdinti, yra optinės skvarbos gylis  $\delta$ , nusakantis, kaip giliai šviesa gali įsiskverbti į audinį. Dydis  $\delta$  nurodo tokį gylį (atstumą  $z$ ) audinyje, kuriame šviesos intensyvumas yra  $e$  kartų mažesnis negu krintančios šviesos intensyvumas. Pradinis šviesos intensyvumas  $I_0$  sumažėja maždaug 90% šviesai įsiskverbus į audinį  $2\delta$  gyliu. Kuo didesnė audinio vaskuliarizacija (daugiau kraujo audinyje), tuo  $\delta$  mažesnis, nes kraujo komponentas hemoglobinas gerai sugeria šviesą. Taip pat  $\delta$  priklauso nuo šviesos bangos ilgio ir yra daug

mažesnis mėlynai šviesai (trumpesnių bangų) negu raudonai. Kadangi hemoglobino sugertis smarkiai susilpnėja, kai bangos ilgis didesnis nei 550 nm (3.8 pav.), šviesos prasiskverbimo į audinius gylis padvigubėja, didėjant bangos ilgiui nuo 550 nm iki 630 nm. Ilgesnės šviesos bangos (iki 700 nm) įsiskverbia į audinius dar dukart giliau. Silpniausiai audinių komponentų sugerama šviesos sritis yra nuo 650 nm iki 1300 nm, ji vadinama “audinių optinio skaidrumo langu” arba “terapiniu langu” (3.8 pav.).

### 3.4. Biologinius audinius charakterizuojantys optiniai parametrai

Krentanti į audinio paviršių, kaip ir į dviejų dielektrikų ribą, elektromagnetinė spinduliuotė sąveikauja su audiniu – vyksta spinduliuotės atspindys, lūžimas, sugertis ir sklaida. Kuris iš šių efektų dominuoja, lemia medžiagos tipas ir elektromagnetinio spinduliavimo bangos ilgis. Vanduo yra pagrindinė gyvų organizmų ląstelių sudedamoji dalis. Jo fizikinės savybės stipriai sąlygoja audinių fizikines savybes. Todėl dažnai, kai nėra



3.8 pav. Vandens, hemoglobino (HbO<sub>2</sub>), kraujo, melanino ir navikinio audinio sugerties, sklaidos ir atspindžio spektrai. Viršuje schemiškai pavaizduotas įvairaus bangos ilgio spinduliuotės įsiskverbimo į pigmentinį audinį gylis.

žinomi audinių optiniai parametrai, apytikriam skaičiavimui naudojami vandens atitinkami optiniai parametrai. Atsižvelgiant į dualizmo teoriją (šviesa yra ir elektromagnetinės bangos, ir dalelių srautas) 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 skaitis. Jis nurodo galios srauto tankį erdviniam kampe tam tikra kryptimi. Spinduliuotei sklindant audinyje skaitį galima išskirti į koherentinį ir difuzinį. Koherentinis skaitis 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 sklaidos (angl. *first – order scattering*) Kubelkos – Munko (Kubelka – Munk) teorija, difuzinis artinys, Monte Karlo modeliavimas arba atvirkštinio pridėjimo – dvigubavimo (inverse adding - doubling) metodai. Dažniausiai naudojamas metodas yra Monte Karlo modeliavimas, kadangi Kubelkos – Munko teorija tinka tik difuzinio skaisčio skaičiavimams, ir tik tuomet, kai sklaida viršija sugertį, difuzinio artinio taikymas taip pat apsiriboja skaičiavimais, kai dominuojantis procesas yra sklaida.

Audinių optines savybes apsprendžia jų struktūra bei būklė: fiziologinė būseną, hidratacijos lygis, homogeniškumas, pokyčiai *in vivo – in vitro*. Audinius galima aprašyti makroskopiškai ir mikroskopiškai. Mikroskopiniai parametrai gerai aprašo ląstelių monosluoksnius bei taikomi izoliuotiems biologiniams objektams. Tuo tarpu makroskopinės audinių savybės nustatomos eksperimentiškai. Makroskopiniai parametrai dažnai yra vadinami „optiniais koeficientais“.

Šviesos sklidimas audiniuose charakterizuojama optinės skvarbos gyliu  $\delta$ . 3.2 lentelėje pateiktas optinis įsiskverbimo gylis aortoje skirtingiems lazerių bangos ilgiams.

**3.2 lentelė.** Optinis įsiskverbimo gylis aortoje skirtingiems lazerių bangos ilgiams (adaptuota pagal [Welch *et al.*])

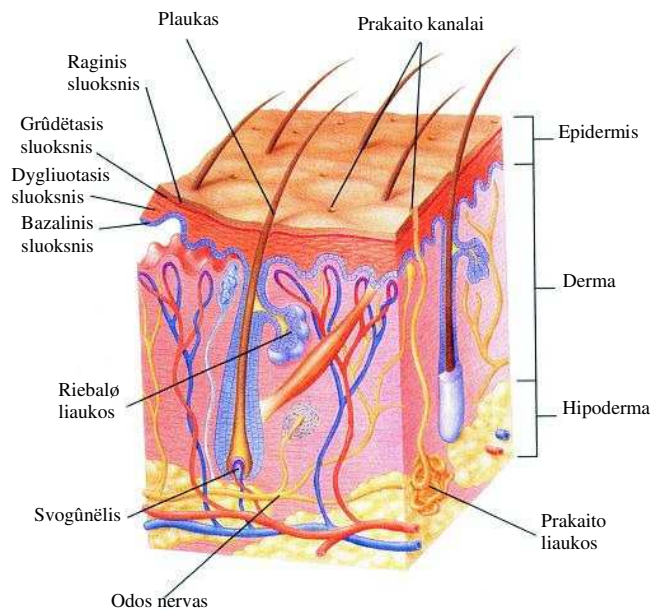
| Lazerio tipas   | Bangos ilgis( $\mu\text{m}$ ) | $\delta$              |
|-----------------|-------------------------------|-----------------------|
| ArF             | 0.193                         | <1 $\mu\text{m}$      |
| KrF             | 0.248                         | 15-20 $\mu\text{m}$   |
| XeCl            | 0.301                         | 30-50 $\mu\text{m}$   |
| Argono          | 0.515                         | 330 $\mu\text{m}$     |
| Nd:YAG          | 1.064                         | 3mm                   |
| Ho:YAG          | 2.10                          | 300-400 $\mu\text{m}$ |
| Er:YAG          | 2.94                          | <1 $\mu\text{m}$      |
| CO <sub>2</sub> | 10.6                          | 15-20 $\mu\text{m}$   |

### 3.4.1. Oda ir jos optinės savybės

Oda susideda iš trijų sluoksnių: paviršinio, vadinamo epidermiu, giliojo – tikrosios odos (dermos) bei poodžio (hipodermos) (3.9 pav.). Odos paviršiaus plotas vidutiniškai 1,5 – 2,2 m<sup>2</sup>, storis – 0,5 – 4 mm. Epidermio paviršinės epitelinės ląstelės negyvos, jos nuolat nusilupa ir atsinaujina dauginantis ląstelėms epidermio pamatiniame sluoksnyje. Būtent šiose ląstelėse pradeda vystytis didelė dalis navikų. Epidermyje taip pat yra keratinocitų bei pigmentinių ląstelių – melanocitų, kurios nulemia odos spalvą.

Sekantis odos sluoksnis – derma, kuris sudarytas iš dviejų sluoksnių. Paviršinis (spenelinis) sluoksnis susideda iš puriojo jungiamojo audinio, kuriame daug plonų skaidulų, nervų galūnių, kraujagyslių ir limfagyslių, maitinančių epidermį. Paviršinį dermos sluoksnį nuo epidermio skiria bazinė membrana. Po paviršiniu sluoksniu yra tinklinis (storas ir stiprus) odos sluoksnis. Jame daug įvairiomis kryptimis išsidėsčiusių kolageninių bei elastinių skaidulų. Dermoje yra riebalų ir prakaito liaukos. Elastinės skaidulos palaiko odos elastingumą.

Giliau esantis poodis susideda iš puriai išsidėsčiusių kolageninių skaidulų pluoštų ir riebalinio audinio skiltelių. Per jį eina kraujagyslės, limfagyslės, nervai, įsiterpia prakaito liaukos. Šis audinys yra organizmo audinių atsarga, atlieka termoreguliacijos funkciją. Per odą organizmas gauna deguonies, pašalina dalį anglies dvideginio bei medžiagų apykaitos atliekų. Odoje yra labai daug receptorių - kai kuriose paviršiaus vietose viename cm<sup>2</sup> yra apie



3.9 pav. Odos sandara

tris šimtus jutimo taškų.

Optinės odos savybės atspindi odos struktūrinę ir cheminę sudėtį. Šviesai sąveikaujant su oda, fotonai sugeriami arba išsklaidomi. Spinduliutei pasiekus odą, dalis jos yra iš karto atspindima, o dalis patenka į odą, kur yra sugerama arba daug kartų atspindėta išeina pro odos paviršių (3.10 pav.). Kuo stipresnė odos sugertis, tuo mažiau šviesos bus atspindėta arba išsklaidyta.

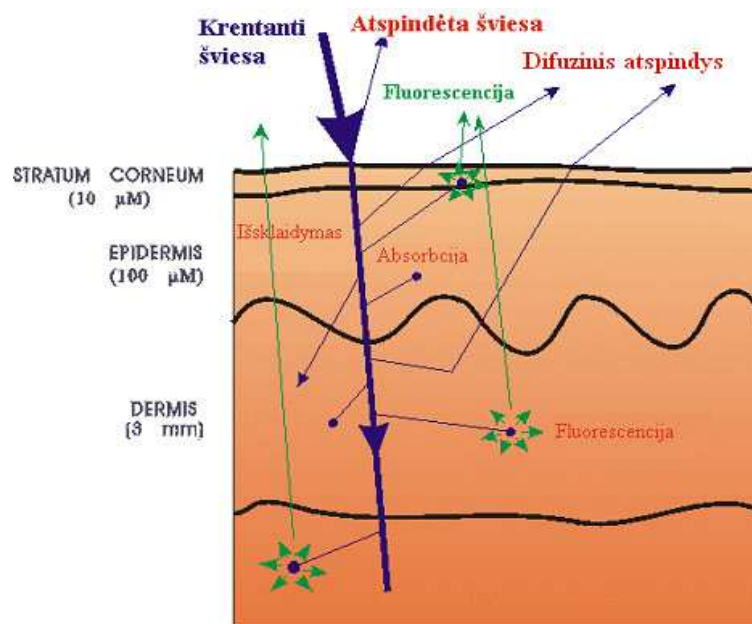
Odoje yra fluoroforų, kurie fluorescuoja sužadinus juos UV bei regimosios spektro srities spinduliuote. Žadinant fluorescenciją 300 nm – 460 nm bangos ilgių spektrinėje srityje yra stebima triptofano, NADH, kolageno bei elastino fluorescencija.

Kiekvienas sluoksnis odoje turi charakteringas optines savybes. Pvz. *stratum corneum* labai silpnai sklaidantis sluoksnis, kuris atspindi 5-8% kritusios spinduliuotės, pralaidumo koeficientas padidėja nuo 1% žadinant 230 nm iki 20% žadinant 250nm spinduliuote, ir sumažėja 15% prie 280 nm, dėka stiprios baltymų sugerties.

Epidermis yra stipriai sklaidantis sluoksnis, kuriame melanino koncentracija priklauso nuo odos tipo. Epidermio atspindžio koeficientas padidėja srityje nuo 400 iki 700 nm, nes



šiam spektrometrisiniame intervale sumažėja melanino sugertis. Atspindys nuo tamsios odos yra žymiai mažesnis nei nuo baltos, nes tamsi oda labiau sugeria šviesą, dėka didesnės melanino koncentracijos joje. Odos optiniai parametrai *in vitro* sąlygomis labai stipriai kinta, priklausomai nuo audinio paruošimo, pavyzdžio geometrijos. Spinduliuotės prasiskverbimas odoje priklauso nuo bangos ilgio. Pvz. UV-B, UV-A ir mėlyna šviesa dažniausiai sugeriama epidermyje, tuo tarpu IR –A pasiekia dermą.



3.10 pav. Spinduliuotės sąveika su audiniu

### 3.5. Bugerio-Bero dėsnio galiojimo ribos

Tenka pastebėti, kad nukrypimai nuo šio dėsnio, viena vertus, nusako naujus tiriamos medžiagos parametrus, suteikdami papildomą informaciją apie medžiagą, o kita vertus, sąlygoja papildomus sunkumus atliekant kokybinius ir kiekybinius medžiagų vertinimus.

Pagrindinės nukrypimų nuo šio dėsnio priežastys:

1. Dėsnis remiasi aksioma, kad šviesą sugeriančios molekulės bandinyje (pvz., tirpale) išsidėsčiusios homogeniškai. Tačiau, jeigu chromoforai išsidėstę nehomogeniškai, stebimas taip vadinamas rėčio efektas. Tokiu atveju dalis šviesos srauto praeina per tirpalą nekliudydama šviesą sugeriančių molekulių (3.11 pav.), todėl išmatuotas bandinio sugerties koeficientas gali būti mažesnis negu tos pačios sugeriančios medžiagos homogeninio tirpalo. Tai ypač svarbu matuojant chromoforų koncentraciją biologiniuose objektuose, kadangi daugeliu atveju chromoforai yra susikoncentravę pigmentiniuose baltyminiuose

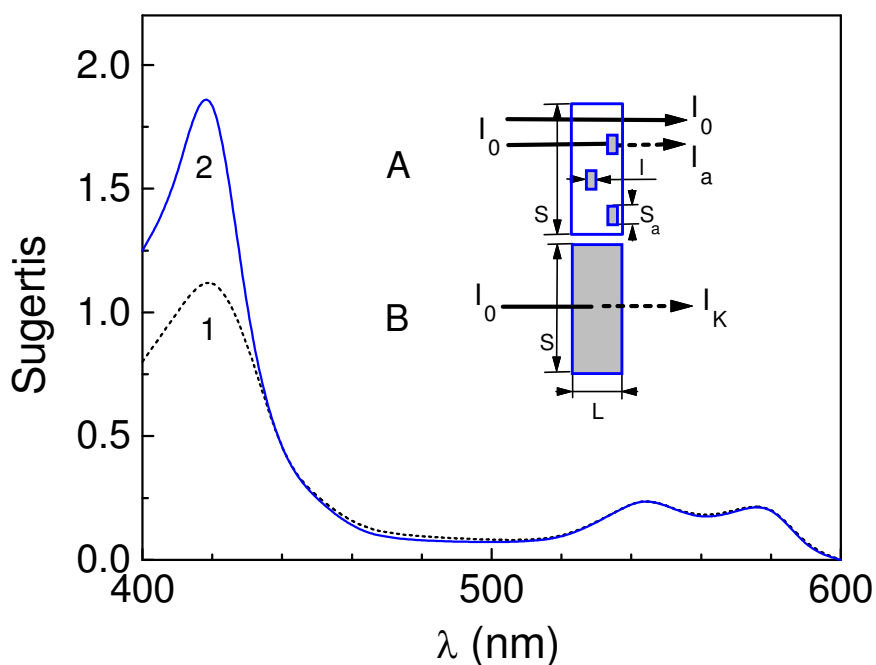
kompleksuose ir nehomogeniškai pasiskirstę bioobjekte. Pavyzdžiu galėtų būti hemoglobino pasiskirstymas kraujyje arba chlorofilo pasiskirstymas augalo lape.

2. Formuluoiant dėsnį taip pat daroma prielaida, kad medžiagos ekstinkcijos koeficientas  $\epsilon$  yra pastovus ir nepriklauso nuo koncentracijos. Tačiau didinant koncentraciją, mažėjant atstumui tarp molekulių, galima sąveika tarp jų (pvz., vyksta molekulių agregacija), to pasekoje keičiasi molekulių fotofizikiniai parametrai, tame tarpe ir  $\epsilon$ . Tuomet Bugerio-Bero dėsnis išreiškiamas sudėtingiau:

$$I = I_0 e^{-A} ; I = I_0 e^{-\epsilon(f(c)) \cdot c \cdot l} \quad (3.5.1)$$

3. Vienas iš ypatingai ryškių nukrypimų biologinių objektų spektroskopijoje yra sąlygojamas fotocheminių virsmų bandinyje. Biologijoje daugelis fotoprocėsų vyksta su labai aukštu našumo koeficientu. Tad vos ne kiekvienas pakankamos energijos šviesos kvantas ( $h\nu$ ) gali inicijuoti fotocheminę reakciją, arba tiesiogiai, arba energijos pernašos pasekoje. Todėl kartais net matavimo prietaiso spindulys gali pakeisti nestabilus tiriamo bandinio optines savybes.

4. Biologiniai objektai dažnai pasižymi didele sklaida. Sklaida padidina bandinio matuojamą optinį tankį lyginant su skaidraus bandinio optiniu tankiu, sąlygotu tik sugerties.



3.11 pav. Rėčio efekto schema. Eritrocitų suspensijos sugerties spektras -1. To paties pavyzdžio spektras po hemolizės -2. Šviesos sklidimas eritrocitų suspensijoje -A, ir po hemolizės -B.

Ši sklaidos įtaka gali būti sumažinta keliais būdais. Vienspinduliniuose spektrofotometruose tam naudojama integruojanti sfera. Dvispinduliniuose spektrofotometruose palyginamojo spindulio kelyje pastatomas modelinis tirpalas, sukompensuojantis sklaidos įtaką. Šviesos sugertį ir sklaidą galima tarti esant nepriklausomais procesais, tad prietaisu matuojamas sugerties koeficientas  $A$  gali būti išreiškiamas dėl sklaidos prarastos šviesos optiniu tankiu  $A_{sk}$  ir optiniu tankiu dėl tikrosios šviesos sugerties  $A_{su}$ :

$$A = A_{sk} + A_{su} \quad (3.5.2)$$

Norint apskaičiuoti tikrąją pavyzdžio sugertį  $A_{su} = f(\lambda)$  naudojantis lygtimi (3.5.2), būtina žinoti sklaidos priklausomybę nuo bangos ilgio.

5. Kadangi medžiaga skirtingai sugeria įvairaus bangos ilgio šviesą, stebimi nukrypimai nuo Bugerio-Bero dėsnio, matavimo prietaisuose naudojant nemonochromatinius šviesos šaltinius.

6. Medžiagos sugerties matavimams gali turėti įtakos liuminescencijos reiškinys. Stipriai liuminescuojančių medžiagų spektrų matavimai ties sugerties kraštu gali būti iškreipti, kadangi molekulių liuminescencijos spektrai dažnai persikloja su labiausiai ilgabange sugerties juosta.

7. Jei bandinys apšviečiamas itin didelio intensyvumo šviesa, tyrimo metu gali žymiai pakisti santykinė nesužadintų molekulių koncentracija.