

VILNIAUS UNIVERSITETAS

DALIA KAŠKELYTĖ

FLUORIMETRINIŲ METODŲ TAIKYMAI
BIOLOGINIŲ AUDINIŲ PATOLOGINIŲ PAKITIMŲ
DIAGNOSTIKOJE

Daktaro disertacija
Fiziniai mokslai, fizika (02 P)

VILNIUS, 2012 metai

Disertacija rengta 2002 – 2006 m. Vilniaus universiteto Fiziko fakulteto
Kvantinės elektronikos katedroje.

Mokslinis vadovas :

prof. dr. Roaldas Gadonas (Vilniaus universitetas, fiziniai mokslai, fizika -
02P)

Turinys

IVADAS	5
Darbo tikslas	8
Darbo uždaviniai.....	9
Publikacijos darbo tema.....	10
Autorės indėlis.....	12
Ginamieji teiginiai.....	14
Padėka.....	15
1 Literatūros apžvalga	16
1.1. Fluorescencinių metodų biomedicininiai taikymai (trumpa raidos apžvalga).....	16
1.2. Fizikinis fluorescencijos principas: molekulių sužadimas ir deaktyvacija.....	20
1.3. Biologinio audinio optiniai savitumai.....	30
1.4. Savosios fluorescencijos taikymas navikų diagnostikoje.....	36
1.5. Sensibilizuotos fluorescencijos taikymas navikų diagnostikoje.....	42
1.6. Fluorescencijos detekcijos sistemų konstravimo principai	45
1.7. Literatūros apžvalgos apibendrinimas	48
1.8. Literatūra.....	49
2 Eksperimentinių galvos smegenų glijos navikų fluorescencijos tyrimas	56
2.1. Įvadas.....	56
2.2. Medžiagos ir metodai.....	61
2.2.1. Eksperimentinė spektrofluorimetrinė sistema.....	61
2.2.2. Fluorescencijos vaizdinimo sistema.....	63
2.2.3. Eksperimentinių galvos smegenų navikų ląstelių linijos.....	66
2.2.4. Eksperimentinis glijos navikų modelis.....	67
2.2.5. Eksperimentiniai gyvūnai.....	68
2.2.6. Sensibilizatorius.....	68
2.2.7. Fluorescencijos spektrų ir vaizdų apdorojimo procedūra...	68
2.2.8. Eksperimentinio spektrofluorimetrinio metodo diagnostinių rodiklių apskaičiavimas.....	68
2.3. Pagrindiniai rezultatai.....	71
2.3.1. Savosios fluorescencijos tyrimo rezultatai.....	71
2.3.1.1. 101.8 gliomos savosios fluorescencijos tyrimo in vivo rezultatai.....	71
2.3.1.2. Eksperimentinių gyvūnų skirtingų audinių savosios fluorescencijos tyrimo ex vivo rezultatai.....	76
2.3.1.3. C6 gliomos savosios fluorescencijos tyrimo ex	

vivo rezultatai.....	78
2.3.2. Eksperimentinio spektrofluorimetrinio metodo diagnostinių rodiklių skaičiavimo rezultatai.....	81
2.3.3. C6 gliomos fluorescencijos vaizdinimo in vivo tyrimo rezultatai.....	92
2.4. Aptarimas.....	103
2.5. Apibendrinimas – 5-ALA indukuoto PpIX fluorescencijos taikymas klinikoje.....	116
2.6. Literatūra.....	121
3 Hipodinaminio streso paveiktų kraujagyslių sienelės fluorescencijos tyrimas	125
3.1. Įvadas.....	125
3.2. Medžiagos ir metodai.....	127
3.2.1. Eksperimentinė spektrofluorimetrinė sistema.....	127
3.2.2. Eksperimentinis ankstyvųjų kraujagyslių sienelės struktūrinių pakitimų modelis.....	129
3.3. Pagrindiniai rezultatai.....	130
3.4. Aptarimas.....	136
3.5. Literatūra.....	141
PAGRINDINIAI REZULTATAI IR IŠVADOS	144

Įvadas

Fluorescencinė spektroskopija – vienas iš labai išvystytų ir plačiai taikomų spektroskopijos metodų įvairių medžiagų analizei. Ją taikant galima aptikti labai mažus fluorescuojančių junginių kiekius, identifikuoti juos remiantis fluorescencijos spektrinėmis ar laikinėmis charakteristikomis, nustatyti neorganinių ir organinių medžiagų cheminę sudėtį, aptikti struktūrinius ir funkcinius biologinių objektų savitumus. Todėl neatsitiktinai fluorescencinės spektroskopijos metodai vaidina svarbų vaidmenį sudėtingų biomolekulinių sistemų, kaip, pavyzdžiui, biologiniai audiniai, sandaros ir juose vykstančių procesų tyrimų sampratoje. Nors fluorescencijos reiškinys yra žinomas nuo 1852 m. (pirmą kartą aptiktas stebint geltoną fluorito emisiją žadinant UV spinduliuote, kuri tęsiasi tol, kol nenutraukiamas žadinimas), tačiau ilgą laiką šis reiškinys nekėlė ypatingo susidomėjimo biomedicinos srityje ir tik dvidešimto amžiaus pabaigoje pradėtas sėkmingai naudoti daugelyje medicinos sferų, ypač navikinių ir ikinavikinių darinių diagnostikai.

Įvairių lokalizacijų navikinių darinių išplitimo ribų lokalizacija *in situ*, pirminių struktūrinių ir biocheminių pokyčių samprata dar pradinių ligos formavimosi stadijų metu yra vienos svarbiausių šiuolaikinės praktinės diagnostikos sprendžiamų biomedicinos problemų, į kurias atsakymų ieškoma pasitelkiant optinės spektroskopijos vaizdinimo metodus. Patikimos metodikos sukūrimas neįmanomas be fundamentinių fizikinių, cheminių ir biologinių

procesų, sukeliančių ir kontroliuojančių ligos procesą, supratimo, nes būtent visi fiziniai sutrikimai gali būti susiję su biocheminiais, fiziologiniais ir morfologiniais pokyčiais ląstelių ar audinių lygmenyje, kurie savo ruožtu nulemia šviesos ir audinio sąveikos savitumus. Žinios apie pagrindines audinio optines savybes (sugertis, sklaida, fluorescencija) yra svarbios ne tik naujų diagnostikos metodų kūrimui bei tobulinimui, bet ir siekiant gauti svarbių taikomųjų rezultatų klinikinėms reikmėms.

Atsižvelgiant į sudėtingą biologinio objekto prigimtį, sukaupia nemaža patirtis konstruojant įvairias eksperimentines diagnostikos sistemas ir analizuojant įvairių biologinių objektų ląstelių ar audinių lygmenyje, įvairių lokalizacijų piktybinių navikų ar eksperimentinių navikų modelių, fluorescencijos spektrinę bei vaizdinę informaciją [1-3]. Nemaža šių tiriamųjų darbų dalis yra susijusi su ankstyvąja ikinavikinių ir navikinių darinių fluorescencine diagnostika in vivo siekiant nustatyti specifinius biologinio objekto sugerties, sandaros ar fiziologinės būsenos skirtumus, atspindinčius ankstyvasias ligos formavimosi stadijas [4-7]. Fluorescencinės spektroskopijos metodika dar vadinama ankstyvąja "optine biopsija" ir yra pagrįsta fluorescencijos jautrumu ir selektyvumu audinio būsenai [8-9]. Iš fluorescencijos spektro formos ir intensyvumo specifinių skirtumų galima atpažinti audinio pokyčius ankstyvųjų navikinio darinio formavimosi stadijų metu. Fluorescencinio vaizdinimo metodais galima įvertinti naviko išplitimo ribas greta esančiuose sveikuose audiniuose. Tos pačios audinio sritys fluorescenciniais metodais gali būti tiriamos daug kartų, o tai itin patogiu vaizdinant in situ audinių pažaidos išplitimo ribas bei nustatant optimalias vietas audinio mėginiams paimti vėlesniems histopatologiniams tyrimams. Prognozuojama, jog fluorescencinės spektroskopijos metodai greitai metu įgalins pagerinti navikinio darinio išplitimo lokalizaciją bei audinio ankstyvųjų pakitimų zonos atpažinimą ne tik onkologijoje, bet ir daugelyje kitų praktinės medicinos sričių.

Didėjantį susidomėjimą fluorimetrinių metodų pritaikymu biomedicinos sferoje rodo nuolatos augantis įvairių lokalizacijų navikinių darinių atpažinimo aplinkinių sveikų audinių fone tyrimų skaičius, ypačingai tais atvejais, kai kiti diagnostikos metodai nėra patikimi arba jei jų taikymas ribotas [10]. Viena

aktualesnių praktinės diagnostikos problemų yra galvos smegenų glijos navikų išplitimo ribų nustatymas operacijų metu. Tikslus navikinio darinio išplitimo ribų nustatymas pagerintų jo masės pašalinimą makroskopiškai matomose ribose, atitolintų galimą naviko ataugimą bei užtikrintų sėkmingą tolesnį gydymą. Operacijos metu naviko išplitimo riboms nustatyti daugeliu atvejų vadovaujamosi išankstiniais duomenimis apie naviko lokalizaciją (neuronavigacija pvz. kompiuterinė tomografija, branduolių magnetinis rezonansas ar ultragarsas) bei chirurginiu mikroskopu matomais išoriniais audinio požymiais, tokiais kaip spalva, tūšumas, kraujotakos pokyčiai. Šiuo atveju chirurgo patyrimas turi didelę įtaką navikinio darinio šalinimo radikalumui, kartu ir paciento gyvenimo trukmei. Fluorimetrinės sistemos sukonstravimas glijos navikų diagnostikai bei jos panaudojimo galimybių įvertinimas sensibilizuotų eksperimentinių galvos smegenų navikų lokalizacijai in vivo yra vienas iš šiame darbe iškeltų ir įgyvendintų uždavinių. Valstybinės mokslo programos „Šviesa biomedicinoje: diagnostika ir terapija“ vykdymo metu bendradarbiaujant su Vilniaus Onkologijos instituto bei Kauno medicinos universiteto Biomedicininių tyrimų instituto kolegomis buvo sukurta eksperimentinė fluorimetrinė sistema, realizuotos sąlygos atlikti intrachirurginės eksperimentinių glijos navikų fluorescencinės diagnostikos eksperimentus bei įvertintas tokio metodo jautrumas ir specifiškumas. Šio darbo rezultate sukonstruota mobili fluorescencijos taškinio registravimo sistema, kuri sėkmingai panaudota klinikoje – piktybinio glijos naviko atpažinimui operacijos metu.

Darbe taip pat atliktas organizmo fizinio aktyvumo suvaržymo sąlygotų kraujagyslės sienelės struktūrinių pakitimų, atitinkančių biocheminių komponentų disbalansą, savosios fluorescencijos tyrimas. Organizmo fiziologinių sąlygų pokyčiai įtakoja fluorescencijos skirtumus, kurie galėtų būti informatyvūs vertinant audinio morfologinę būklę. Šie tyrimai turi praktinės reikšmės vertinant pradinius biocheminius pokyčius bei nustatant ankstyvuosius ligos formavimosi pakitimus, kuomet galimas prevencinis medikamentinis gydymas. Papildomos spektroskopinės informacijos gavimas leistų sudaryti pirminių struktūrinių pažeidimų paveikslą ir atitinkamai identifikuoti pagrindinius biocheminius

komponentus. Šio darbo pradžia tyrimų susijusių su fizinio aktyvumo, kaip vieno iš aterosklerozės riziką sukeliančių veiksnių, sąlygojamų kraujagyslės sienelės struktūrinių pažeidimų, panaudojant fluorimetrinius metodus, mokslinėje literatūroje nebuvo skelbta.

DARBO TIKSLAS

Ekspimentinių tyrimų, kurie apibendrinti šiame darbe, tikslas buvo ištirti skirtingų biologinių audinių biocheminių/metabolinių procesų sąlygojamas fluorescencijos spektrines savybes, siekiant įvertinti fluorescencinių metodų – spektrofluorimetrinio ir fluorescencinio vaizdinimo - pritaikymo piktybinių galvos smegenų navikų ir kraujagyslių sienelės struktūrinių pažeidimų diagnostikoje galimybes.

DARBO UŽDAVINIAI

- 1. Įvertinti fluorimetrinių metodų pritaikomumą eksperimentinių galvos smegenų glijos navikų lokalizacijai *in vivo*:**
 - ✓ Sukonstruoti eksperimentinių galvos smegenų navikų fluorescencinės diagnostikos sistemą glijos navikų atpažinimui intraoperaciniu būdu;
 - ✓ iširti 5-aminolevulininės rūgšties sukeltą selektyvų protoporfirino IX (PpIX) kaupimąsi eksperimentinėse gliomose (101.8 ir C6);
 - ✓ iširti piktybinių galvos smegenų navikų (101.8 ir C6 gliomos) savosios fluorescencijos spektrines savybes; nustatyti specifinius spektrų skirtumus audinių diferenciacijai;
 - ✓ įvertinti ribines fluorescencijos intensyvumo vertes optimaliam sensibilizuotų glijos navikų atpažinimui;
 - ✓ palyginamųjų tyrimų metu, nustatyti spektrofluorimetrinio metodo patikimumo rodiklius eksperimentinių glijos navikų lokalizacijai intraoperaciniu būdu;
 - ✓ įvertinti fluorescencinio vaizdinimo galimybes eksperimentinių galvos smegenų navikų išplitimo ribų nustatymui.
- 2. Įvertinti galimybę atpažinti fizinio aktyvumo suvaržymo sąlygotus kraujagyslės sienelės struktūrinius pakitimus spektrofluorimetriniu būdu:**
 - ✓ iširti eksperimentinių gyvūnų širdies aortos bei periferinių arterijų bandinių savąją fluorescenciją taikant atrankų žadinimą;
 - ✓ nustatyti optimalius sveikų ir hipodinaminio streso paveiktų kraujagyslių fluorescencijos žadinimo/emisijos bangos ilgus struktūrinių pažeidimų identifikavimui.

PUBLIKACIJOS DISERTACIJOS TEMA

- [S1] A.Čiburys, D.Gadonas, R.Gadonas, J.Didžiapetrienė, I.Gudinavičienė, G.Graželienė, D.Kaškelytė, A.Piskarskas, K.Skauminas, V.Smilgevičius, A.Sukackaitė, 5-Aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX fluorescence for detection of brain tumor cells *in vivo*, *Experimental Oncology* 25, 51-54 (2003).
- [S2] K.Skauminas, L.Klumbys, V.Šaferis, J.Didžiapetrienė, G.Graželienė, I.Gudinavičienė, D.Kaškelytė, R.Gadonas, V.Smilgevičius, Spektrofluorimetrija piktybinių gliomų intraoperacinėje diagnostikoje. Jautrumo ir specifiškumo įvertinimas eksperimente, *Neurologijos seminarai* 1(17), 66-73 (2003).
- [S3] D.Kaškelytė, R.Gadonas, M.Kušleikaitė, S.Stonkus, Study of fluorescence spectra of peripheral arteries: intrinsic fluorophores emission expressivity in intima under the hypodynamic stress, *Biologija* 18(1), 75-80 (2007).
- [S4] M.Kušleikaitė, R.Gadonas, D.Kaškelytė, S.Stonkus, R.Benetis, S.Kušleika, V.Karabanovas, Recognition by laser-induced fluorescence spectroscopy *ex vivo* of structural changes in thoracic aorta intima of rabbits subjected to hypodynamic stress, *Biologija* 53(4), 67-73 (2007).
- [K1] K.Skauminas, D.Kaškelytė, E.Keleras, P.Čikotas, A.Radžiūnas, J.Šidiškis, V.P.Deltuva, A.Tamašauskas, Centrinės nervų sistemos navikų vaizdinimas, *Vitae Litera*, Kaunas, 2008, ISBN 978-9955-920-48-9.
- (Mokomoji knyga parengta ES struktūrinių fondų ir LR lėšomis, įgyvendinant projektą „Medicinos fizikos ir nanofotonikos aukštųjų studijų realizacija“ (paramos sutartis Nr.ESF/2004/2.5.0-03-385/BPD-210/ES2006-01))

Pranešimai pateikti konferencijose ir seminaruose

- [P1] D.Kaškelytė, R.Gadonas, M.Kušleikaitė, S.Stonkus. Periferinių kraujagyslių sienelių struktūros pažeidimų, sukeltų hipodinaminio streso, atpažinimas fluorescencinės spektroskopijos metodu. 36-oji Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija: programa ir pranešimų tezės, 2005 m. birželio 16-18, Vilnius, p.87.
- [P2] D.Kaškelytė, R.Gadonas, V.Smilgevičius, K.Skauminas, I.Gudinavičienė, J.Didžiapetrienė, G.Gražlienė, A.Sukackaitė. Fluorescence guided intraoperative detection of malignant gliomas. Acta Bio-optica et Informatika Medica 10 (1-2): International Symposium on New Trends in Photodynamic Therapy and Diagnosis, 21-22 June, Wroclaw, Poland, p.32 (2004).
- [P3] D.Kaškelytė, R.Gadonas, V.Smilgevičius, K.Skauminas, I.Gudinavičienė, J.Didžiapetrienė, G.Gražlienė, A.Sukackaitė. Fluorescence-guided detection of in vivo experimental brain tumours, XVI Lithuanian-Belarusian seminar „Lasers and optical nonlinearity“, 27-29 October 2004, Vilnius, Lithuania.
- [P4] R.Gadonas, M.Kušleikaitė, D.Kaškelytė, V.Smilgevičius, V.Karabanovas, S.Stonkus, S.Kušleika. Autofluorescence study of hypodynamic stress affected aorta intima, XVI Lithuanian-Belarusian seminar „Lasers and optical nonlinearity“, 27-29 October 2004, Vilnius, Lithuania.
- [P5] L.Bružaitė, R.Gadonas, D.Kaškelytė, G.Gražlienė, A.Sukackaitė. Biologinių audinių autofluorescencijos tyrimas taikant atrankų žadinimą, Biomedicininė inžinerija: tarptautinės konferencijos pranešimų medžiaga, 2004 m. spalio 28-29 d., Kaunas, p.216-220.
- [P6] A.Čiburys, D.Gadonas, R.Gadonas, J.Didžiapetrienė, I.Gudinavičienė, G.Gražlienė, D.Kaškelytė, K.Skauminas, V.Smilgevičius, A.Sukackaitė. Eksperimentinių galvos smegenų gliomų fluorescencinės diagnostikos metodo kiekybinių parametrų įvertinimas, 35-oji jubiliejinė Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija: programa ir pranešimų tezės, 2003 m. birželio 12-14 d., Vilnius, p.257.

- [P7] R.Gadonas, M.Kušleikaitė, R.Smilgevičiūtė, D.Kaškelytė, V.Smilgevičius, S.Stonkus, V.Karabanovas, L.Slavinskaitė. Kraujagyslių sienelės fluorescencijos tyrimas taikant atrankų žadinimą derinamo bangos ilgio spinduliuote. 35-oji jubiliejinė Lietuvos nacionalinė fizikos konferencija: programa ir pranešimų tezės, Vilnius, 2003 m. birželio 12-14 d., Vilnius, p. 258.
- [P8] K.Skauminas, J.Šidiškis, J.Didžiapetrienė, R.Gadonas, G.Gražlienė, D.Kaškelytė, V.Smilgevičius. Experimental assessment of sensitivity and specificity of the spectrofluorimetric method for intraoperative diagnosing of malinant gliomas, Proceedings of the Latvian academy of sciences: 1 st Scandinavian and Baltic congress on neurosurgery. ISSN 1407-009X. 2003, vol. 57, N ½, p. A6, N abstr. SC5.

Autorės indėlis

Šioje disertacijos aprašyti eksperimentiniai tyrimai atlikti Vilniaus universiteto Kvantinės elektronikos katedros laboratorijoje vadovaujant prof. R.Gadonui. Prof. R.Gadonas suformulavo eksperimentinių tyrimų kryptis, konsultavo metodiniais klausimais, bei jų metu gautų eksperimentinių rezultatų interpretacijos klausimais.

Tarpdisciplininiai moksliniai tyrimai atlikti glaudžiai bendradarbiaujant su Vilniaus Onkologijos instituto, Kauno medicinos universiteto Biomedicininų tyrimų instituto bei Kardiologijos instituto darbuotojais.

Pagrindiniai mokslinių publikacijų bendra autoriai yra prof. R.Gadonas, dr. K.Skauminas, I.Gudinavičienė, dr. G.Gražlienė, A.Sukackaitė, dr. M.Kušleikaitė.

Dr.K.Skauminas atliko chirurgines eksperimentinės gliomos operacijas, dalyvavo aptariant rezultatus bei jų interpretacijos klausimais, atliko statistinę metodo patikimumo vertinimo analizę bei parengė S2 straipsnį spaudai.

I.Gudinavičienė atliko eksperimentinių glijos navikų morfologinius tyrimus, konsultavo rezultatų interpretacijos klausimais.

Dr.G.Gražalienė ir A.Sukackaitė atliko naviko skiepijimo procedūras eksperimentiniams gyvūnams bei gyvūnų priežiūrą eksperimentinių operacijų metu, taip pat dalyvavo aptariant eksperimentinius rezultatus.

Dr.M.Kušleikaitė dalyvavo aptariant kraujagyslių sienelės fluorescencijos eksperimentų rezultatus, bei atliko mėginių ultrastruktūros ir spektroskopinių matavimų interpretaciją.

Autorė dalyvavo surenkant eksperimentines sistemas, atliekant eksperimentinių galvos smegenų fluorescencinę diagnostiką, atliko kraujagyslės bandinių eksperimentinius tyrimus taikant atrankų žadinimą, taip pat kartu su bendraautoriais atliko gautų eksperimentinių rezultatų analizę ir interpretaciją.

GINAMIEJI TEIGINIAI

1. Sukonstruota eksperimentinė taškinio matavimo spektrofluorimetrinė sistema įgalina selektyviai sužadinti endogeninių porfirino tipo pigmentų fluorescenciją galvos smegenų audiniuose, bei tiksliau identifikuoti galvos smegenų glijos naviką *in vivo* vertinant integrinio intensyvumo santykį $I_{620-660}(\text{sv. aud.})/I_{620-660}(\text{nav.})$ apibrėžiantį endogeninio protoporfirino IX santykinio kiekio pokytį glijos naviko atveju.
2. 5-ALA indukuotas PpIX selektyviai kaupiasi eksperimentiniuose 101.8 glijos navikuose, sąlygodamas optinį kontrastą tarp sveikų smegenų audinių ir naviko nuo 1:1,4 iki 1:8,7. Spektrofluorimetrinio metodo dėka, piktybinės 101.8 gliomos identifikuojamos su 83 % jautrumu, 84 % specifiškumu ir 87 % tikslumu. Tai įgalina panaudoti taškinę fluorescencijos spektrų registravimo sistemą kaip papildomą priemonę baltos šviesos chirurginiam mikroskopui, kontroliuoti naviko šalinimą operacijos metu. Pasiūlyta mobili šviesolaidinio zondo sistema yra tinkama klinikiams taikymams neurochirurgijoje.
3. Sukonstruota fluorescencijos vaizdinimo sistema, panaudojant mėlynus puslaidininkinius šviesos diodus (405 nm) ir raudonoje spektro srityje jautrią skaitmeninę kamerą, yra optimizuota selektyviam endogeninių porfirinų sužadinimui ir smegenų audinių fluorescencijos vaizdinei detekcijai. Ši priemonė yra tinkama eksperimentinių C6 gliomos fluorescencijos savitumų vaizdinimui *in situ* operacijos metu.
4. Savosios fluorescencijos spektro formos savitumų analizė įgalina detektuoti fizinio aktyvumo suvaržymo sąlygotus kraujagyslės sienelės struktūrinius pakitimus eksperimentiniuose širdies aortos bei periferinių arterijų bandiniuose.

PADĖKA

Pirmiausiai norėčiau padėkoti savo mokslinio darbo vadovui prof. Roaldui Gadonui - už žinias ir pagalbą viso darbo metu, vertingas pastabas, rūpestį ir kantrybę.

Katedros kolegoms ir draugams. Nuoširdų ačiū tariau Arūnui Čiburiui - už pagalbą, idėjas, patarimus ir pastabas atliekant eksperimentus bei konstruojant matavimo schemas.

Dėkoju straipsnių bendraautoriams: dr. K.Skauminui, dr. G.Graželienei, A.Sukackaitei, prof. J.Didžiapetrienei, prof. V.Smilgevičiui, I.Gudinavičienei, dr. M.Kušleikaitei - už ypatingą profesionalumą bei turiningą bendradarbiavimą.

Dėkoju Vilniaus greitosios pagalbos universitetinės ligoninės neurochirurgui A.Šitkauskui ir jo komandai už iniciatyvą plėtojant gliomos problematiką ir už suteiktą galimybę atlikti pirmuosius spektroskopinius tyrimus operacinėje.

Esu be galo dėkinga Kvantinės elektronikos katedros kolektyvui už palaikymą ir rūpestį.

Ypatingai norėčiau padėkoti prof. A.Piskarskui už ilgametę paramą ir mokslinių tyrimų vystymą lazerių taikymo biomedicinoje tema.

Tariau nuoširdų ačiū savo artimiesiems ir draugams už jų paramą, supratingumą.

1

Literatūros apžvalga

1.1. Fluorescencinių metodų biomedicininiai taikymai (trumpa raidos apžvalga)

Dar senovės egiptiečių raštuose galima rasti duomenų apie šviesos gydomąjį poveikį. Tačiau prireikė šimtmečių, kol šviesa visuotinai tapo pripažinta ne tik kaip gydymo, bet ir veiksminga ligų diagnostikos priemonė. Jau tuomet, atlikdami paprastą pacientų apžiūrą, gydytojai, remdamiesi biologinio objekto spalva, vertino ir galimos ligos diagnozę. Pavyzdžiui, odos geltonumas buvo siejamas su kepenų ligomis, o melsvų lūpų spalva signalizavo apie galimas širdies ar plaučių ligas. Tačiau kryptingi dirbtinės šviesos panaudojimo ligų diagnostikai tyrinėjimai prasidėjo maždaug 20 amžiaus pradžioje. Nauji laimėjimai medžiagų cheminės analizės srityje, remiantis elementų spektriniais savitumais, pasitelkiant optinius metodus įgalino naujų metodų sukūrimą kaip spektrofotometrija, o naujų laboratorinių prietaisų atsiradimas atvėrė naujas galimybes tiesioginei objektų optinei analizei atlikti [11]. Taigi, į biologinio objekto optines savybes, sugerties ir emisijos spektrines (ar laikines) charakteristikas buvo pažvelgta kaip į specifinį tam tikro audinio sandaros ar funkcinį procesų skiriamąjį požymį, pagal kurį galima jį identifikuoti, apibrėžti sandaros savitumus ar vykstančių procesų dėsningumus. Fluorescencijos, kaip priemonės skirtingų audinių klasifikacijai, o vėliau ir ankstyvai navikų diagnostikai, taikymo idėja suintrigavo daugelį mokslininkų dar 19 amžiaus viduryje. Dvidešimtame amžiuje šis metodas tapo svarbiausia

priemone kiekybinei bioobjektų analizei, vaizdinimui ir diagnostikai [12]. Vieni pirmųjų tyrinėjimų atskleidė ne tik augaluose esančių natūralių fluoroforų savąją fluorescenciją (pvz., meksikietiško medžio *Lignum nephriticum* ekstraktas, chininas, chlorofilas, kurkuminas), bet ir žmogaus audinių savitą fluorescenciją. 1855 m. H. von Helmholtz vienas pirmųjų stebėjo ex vivo akies tinklainės žalsvai-baltą fluorescenciją žadinant UV spinduliuote. 1877 m. M. von Bezold ir G. Englehardt patvirtino tinklainės fluorescencijos buvimą in vivo, bei nustatė, kad akies lęšiukui ir ragenai taip pat būdinga savita fluorescencija. 1862 m. Victor Pierre vienas pirmųjų savo straipsniuose išdėstė idėją fluorescenciją panaudoti organinių junginių detekcijai. Tirdamas pavienių fluorescuojančių junginių ar skirtingų junginių mišinių tirpalus tyrėjas nustatė, kad remiantis fluorescencijos spektro forma galima identifikuoti atskirus junginius žadinant to paties bangos ilgio šviesa. Jis pabrėžė, kad skirtinguose tirpikliuose arba reaguodami į terpės rūgštingumą ar šarmingumą fluorescuojančių junginių spektrai gali skirtis. 1911 m. Stübel stebėjo eksperimentinių gyvūnų skirtingų audinių savitą fluorescenciją žadinant UV spinduliuote [13]. Šių tyrimų metu fluorescencija buvo stebima akimi ir klasifikuojama kaip melsvai balta kauliniam audiniui (dantis), tamsiai ruda – širdies raumens audiniui ir geltona - riebaliniam audiniui. Prancūzų mokslininkas Polikard 1924 m. [14] pirmasis stebėjo endogeninių porfirinų fluorescenciją eksperimentiniame žiurkių sarkomos modelyje, žadinant kvarco lempos UV spinduliuote. Endogeninių porfirinų savybės selektyviai kauptis navikinėse ląstelėse aptikimas yra vienas pirmųjų itin reikšmingų pasiekimų, paskatinusių tolimesnį fluorescencinės diagnostikos metodų tobulinimą bei panaudojimą daugelyje praktinės biomedicinos sričių. Pirmieji darbai taip pat atskleidė porfirinų, kaip galimų patologinių židinių žymenų, svarbą. 1933 m. Sutro ir Burman [15] atliko pirmuosius fluorescencinės diagnostikos tyrimus. Autoriai pastebėjo, kad chirurginiu būdu pašalinti krūties audiniai apšvietus kvarco ultravioletine spinduliuote emituoja arba raudoną šviesą (navikas), arba žalią (sveikas audinys) ir tai galėtų būti panaudota nustatant šalinamo audinio (rezekcijos) ribas. Raudona fluorescencija taip pat buvo užregistruota odos ir burnos ertmės pataloginiuose audiniuose [16]. Autoriai pažymi, kad raudona

fluorescencija buvo charakteringa tik pažengusioms naviko stadijoms. Vėlesnių eksperimentinių tyrimų metu buvo įvardinti ir kiti endogeniniai audinio fluoroforai, kurie atsakingi už savąją audinio fluorescenciją, t.y. struktūriniai baltymai (elastinas ir kolagenas), aminorūgštys (triptofanas), redukuotas nikotinamidadeninukleitidas (NADH), ir flavinai [17-20]. Audinių savosios fluorescencijos intensyvumo sumažėjimas (ypatingai žaliajo spektro srityje) charakteringas patologijos sričiai [4-5,21], o taip pat sveikų ir navikinių audinių fluorescencijos spektrų formos skirtumai [21-23] yra pagrindiniai parametrai fluorescencijos spektrinei analizei. Endogeninių audinio fluoroforų koncentracijos bei pasiskirstymo audinyje skirtumai, audiniui transformuojantis į pataloginį, atspindi audinio savosios fluorescencijos spektre ir apibrėžia diagnostikai svarbią informaciją – morfologinės ir biocheminės būsenos pokyčius [24]. Skirtinga tarpląstelinės medžiagos sandara bei medžiagų apykaita sudarė prielaidas audinių klasifikacijai, naudojant fluorescenciją [5-6,21-22,25-26]. Dėl biocheminių ir biofizikinių audinių savybių fluorescenciją galima buvo naudoti onkologijoje ne tik navikų ankstyvoms stadijoms diagnozuoti, bet ir įvairių audinio metabolinių vyksmų studijoms [27-29] bei širdies ir kraujagyslių ligų diagnostikai [11,30-31]. Sukurtos pirmosios fluorescencijos vaizdinimo sistemos navikinių pokyčių diagnostikai savosios fluorescencijos pagrindu [5-6,9,32,33-35].

Egzogeninių fluoroforų panaudojimo fluorescencinei diagnostikai galimybių tyrimo pradžia yra susijusi su šių junginių (sensibilizatorių) paieška fotodinaminei navikų terapijai (FNT) [36]. Porfirinai - vieni plačiausiai taikomų egzogeninių junginių fotodinaminėje navikų terapijoje. Šių junginių selektyvaus kaupimosi navikiniuose audiniuose savybe imta intensyviai domėtis iš karto po karo. Pirmuosiuose tyrimuose buvo pademonstruotas hematoporfirino (Hp) selektyvus kaupimasis įvairiuose eksperimentiniuose navikuose ir žmogaus audiniuose bei galimybė panaudoti šį junginį diagnostikos ir terapijos tikslais [37-39]. Pastebėta, kad po įvedimo į organizmą hematoporfirinas selektyviai kaupiasi pirminiuose ir metastaziniuose navikuose bei limfiniuose mazguose. Figge ir bendraautorai [32] parodė, kad daugelis porfirinų pasižymi selektyviu kaupimusi ne tik navikiniuose audiniuose, bet taip pat selektyviai kaupiasi graužikų

embrionuose ir regeneruojančiuose audiniuose. 1951 m. Manganiello ir Figge [40] nustatė, kad mažos hematoporfirino dozės nepakanka fluorescencinei galvos ir kaklo navikų diagnostikai. 1955 m. Rassmussan-Taxdal ir bendraautorai panaudojo intraveniškai įvestą hematoporfirino hidrochloridą audinių sensibilizacijai prieš navikinių ir ikinavikinių audinių chirurginį pašalinimą in vivo [41]. Beveik visuose navikiniuose ir ikinavikiniuose audiniuose buvo stebima charakteringa raudona fluorescencija, kurios intensyvumas didėjo didinant įvedamo sensibilizatoriaus dozę. Daug geresnis naviko selektyvumas pasiektas naudojant HpD, kuris yra sudėtingas įvairių porfirinų mišinys. HpD pasirodė itin patraukliu ir potencialiu sensibilizatoriumi skirtingų navikų vaizdinimui įvairiuose audiniuose ir organuose [42-43]. Moore ir kolegos vieni pirmųjų panaudojo fluoresceiną smegenų navikams identifikuoti in vivo [44]. Eksperimentinių ir klinikinių tyrimų metu nustatyta, kad egzogeninių fluoroforų koncentracija (fluorescencijos intensyvumas), kaupimosi kinetikos, eksperimentinės sąlygos yra svarbūs parametrai navikinių darinių diagnostikai ir vaizdinimui, kartu ir gydymui [2,45]. Dvidešimto a. aštunto dešimtmečio pabaigoje pasirodė pirmieji darbai, kuriuose buvo panaudotas organizmo endogeninis sensibilizatorius, t.y. iš hemo sintezės pirmtako - 5-aminolevulininės rūgšties (5-ALA) sintetamos porfirininės prigimties molekulės [46-49], kurios daug selektyviau lokalizuojasi navikiniuose dariniuose ir kartu užtikrina didesnę optinę kontrastą tarp naviko ir aplinkinių sveikų audinių. 5-ALA indukuotų porfirinų kaupimasis navikiniuose audiniuose yra susijęs su hemo sintezės fermentų aktyvumu: daugeliui navikų yra būdingas porfobilinogeno deaminazės aktyvumo padidėjimas ir ferochelatazės aktyvumo bei geležies koncentracijos sumažėjimas [50]. Kadangi 5-ALA bei indukuojamas protoporfirinas IX (PpIX) yra natūralios organizmo hemo biosintezės ciklo medžiagos, jų, kaip sensibilizatorių, panaudojimas klinikinėje praktikoje patrauklesnis nei dirbtiniu būdu sintetinamų sensibilizatorių dėl jų privalumų, vertinant sąlygojamo toksiškumo ir saugumo praktinėms klinikinėms tyrimų reikmėms požiūriu [51].

1.2. Fizikinis fluorescencijos principas: molekulių sužadinimas ir deaktyvacija

Visi fotovyksmai organinėse molekulėse vyksta pirmiausiai sukuriant sužadintą elektroninę molekulės būseną, o tuomet seka įvairūs procesai, apibrėžiantys tolesnę sužadintos būsenos deaktyvaciją – perteklinės energijos praradimo mechanizmai - fotofizikinio ar fotocheminio pobūdžio [52-53].

Sugertas šviesos fotonas inicijuoja visą eilę fotofizikinių ar fotocheminių vyksmų sąlygojančių energinius, dinامينius arba struktūrinius pokyčius molekulėje. Galimų vyksmų analizė leidžia suprasti tiriamos sistemos (molekulės) sužadintų būsenų formavimosi, o tuo pačiu ir pačios molekulės, jos struktūros bei vidinės sandaros (elektronų, branduolių bei elektrono sukinių konfigūracijos) savybes bei galimus dinامينius procesus, apspręstus energijos relaksacijos mechanizmų.

Molekulė – daugelio atomų dalelė, turinti sudėtingą energijos lygmenų struktūrą, kuri yra sąlygota vidinės sandaros (atomų, branduolių, elektronų, elektronų sukinių) savybių. Pagrindiniai organinės molekulės struktūriniai elementai – lėtai judantys branduoliai ir aplink juos skriejantys elektronai, kurie sudaro tam tikras orbitales. Pagal Pauli principą, kiekvienoje orbitalėje gali būti ne daugiau kaip du elektronai su priešingais sukiniiais. Kambario temperatūroje beveik visos molekulės yra pagrindinės (nesužadintos) būsenos S_0 . Molekulei sugėrus šviesos fotoną ($M + h\nu \rightarrow {}^*M$), šviesos energija transformuojama į elektroninio sužadinimo energiją - elektronas iš pagrindinės būsenos pereina į laisvą sužadintos būsenos energijos lygmenį ($S_n, n \geq 1$). Dėl fotono sugerties pakinta molekulės elektroninė konfigūracija, o tuo pačiu ir elektronų pasiskirstymas apie branduolį. Sugerta energija gali būti panaudojama elektronų konfigūracijos pertvarkymo, branduolių virpesiniams judesiams, ar elektrono sukinių inversijos vyksmams atlikti.

Fotono energija, kurios reikia sukurti elektroniškai sužadintą molekulės būseną ($M + h\nu \rightarrow {}^*M$), turi atitikti energijų skirtumą tarp šios molekulės dviejų elektroninių lygmenų:

$$\Delta E = E_n(*M) - E_0(M) = h\nu = h\left(\frac{c}{\lambda}\right) \quad [1]$$

čia $h = 6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ – Planko konstanta, ν - dažnis, λ - bangos ilgis, $c = 3 \cdot 10^8 \text{ m/s}$ - šviesos greitis, o E_0 ir E_n (kur $n \geq 1$) - molekulės pagrindinės (M) ir elektroniškai sužadintos ($*M$) būsenų energijos. Šis sąryšis sieja energijų tarp dviejų molekulės būsenų skirtumą ΔE su eksperimentiškai išmatuojamais dydžiais: sugeriamo fotono dažniu ν ar bangos ilgiu λ .

Organinių molekulių žadinimui dažniausiai panaudojama ultravioletinės (UV) arba regimosios spektro srities (VIS) spinduliuotė. Pavyzdžiui, alifatinės struktūros organinių molekulių sužadinimui iš pagrindinės būsenos, S_0 , į elektroniškai sužadintą aukštesnę būseną, S_n , reikia didesnės nei 3,5 eV fotono energijos (t.y. sugerti mažesnio nei 300 nm bangos ilgio spinduliuotę), tuo tarpu aromatinių junginių organinėms molekulėms sužadinti iš $S_0 \rightarrow S_1$ - fotono energija turi siekti nuo 1,5 iki 3,5 eV (t.y. sugerti 300 – 800 nm bangos ilgio spinduliuotę).

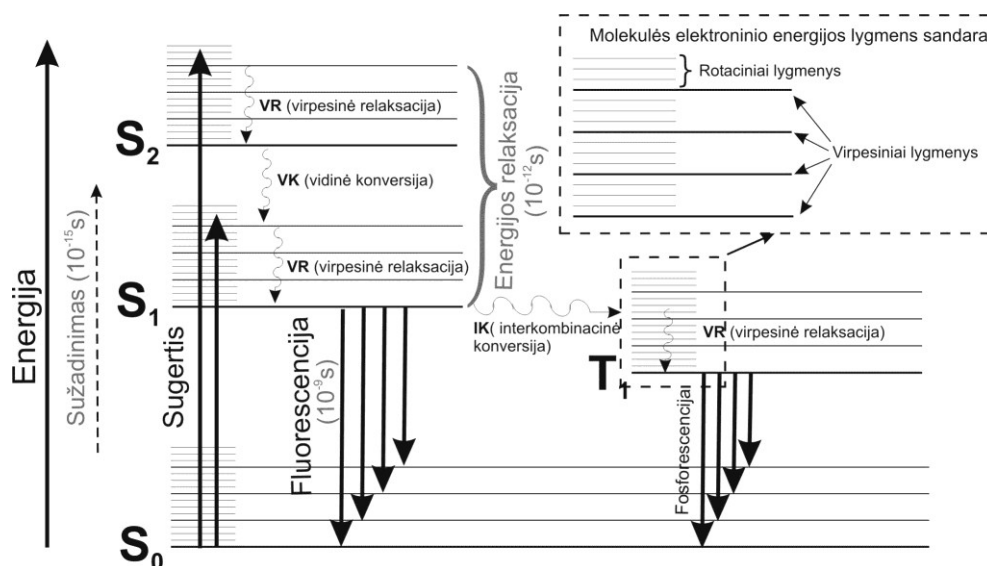
Organinių molekulių, kaip sudėtingos daugelio atomų sistemos, energijos lygmenų diagramoje kiekvienas elektroninis energijos lygmuo turi savo virpesinių – rotacinių energijos lygmenų struktūrą. Tačiau tirpaluose ir kondensuotose medžiagose dėl didelės tarpmolekulinių susidūrimų tikimybės vyksta itin sparti virpesinė ir rotacinė relaksacija. Kondensuotoje fazėje molekulės sukimasis yra beveik neįmanomas, todėl esmine laikoma virpesinės energijos relaksacija, o energijos relaksacija tarp rotacinių lygmenų ignoruojama.

Įvairūs energijos deaktyvacijos keliai konkuruoja tarpusavyje ir šių energijos relaksacijos vyksmų greičio konstantos (vyksmo tikimybė) priklauso nuo vidinių molekulės sandaros savybių bei išorinių veiksnių – eksperimento sąlygų (aplinka, temperatūra, slėgis, ir t.t.).

Daugiaatomės molekulės sužadinimo, suformuotų sužadintų būsenų deaktyvacijos bei energijos relaksacijos vyksmų mechanizmą paaiškina Perrin - Jablonskio diagrama (1.1. pav.) [11,54-55]. Pagal elektronų konfigūraciją gali būti dvi skirtingos sužadintos elektroninės būsenos. Bendru atveju laikoma, kad branduolių konfigūracija, visų diagramoje atvaizduotų energijos būsenų, nedaug

skiriasi nuo pusiausvyrosios branduolių konfigūracijos, atitinkančios molekulės pagrindinę būseną S_0 . Tokiu būdu, S_0, S_1 ir T_1 būsenos yra viena kitos izomerai, t.y. skiriasi tik elektronų (ar sukinių) konfigūracija šiose būsenose. S_n ir T_n tarpusavyje susijusios tik kaip elektrono - sukinių izomerai, t.y. singuletinio lygmens elektronų sukinių konfigūracija ($\uparrow\downarrow$), o tripletinio lygmens elektronų sukinių konfigūracija – ($\uparrow\uparrow$). Beveik visos biologiškai svarbios molekulės yra singuletinės būsenos pagrindinėje būsenoje, išskyrus deguonį, kuris pagrindinėje būsenoje yra tripletinės būsenos.

Molekulė sugėrusi šviesos fotoną yra sužadinama iš pagrindinės elektroninės būsenos (S_0) žemiausio virpesinio polygmenio į vieną iš sužadintosios elektroninės būsenos (S_2, \dots, S_n) bet kuri virpesinį polygmenį. Sužadintame būvyje molekulė egzistuoja tik tam tikrą laiką, po kurio vyksta perteklinės energijos deaktyvacija. Dėka sparčios vidinės konversijos, praktiškai visi į aukštesnius singuletinius lygmenis sužadinti organiniai chromoforai per pikosekundes ar dešimtis pikosekundžių pereina į S_1 lygmenį. Taigi, molekulei sugėrus šviesos fotoną, tikimybė užpildyti patį žemiausią S_1 ar T_1 būsenų virpesinį polygmenį yra pakankamai didelė ir tai yra sąlygota sparčios vidinės konversijos (Kaša taisyklė).



1.1. pav. Organinės molekulės energijos lygmenų Perrin - Jablonskio diagrama. VR – virpesinė relaksacija, VK – vidinė konversija, IK – interkombininė konversija. S_0 ir S_n ($n \geq 1$) – molekulės pagrindinė singuletinė ir aukštesnės sužadintos singuletinės būsenos, T – sužadinta tripletinė būsena

Molekulė iš aukštesnio sužadintos būsenos S_n virpesinio polygmenio sparčiai ($\sim 10^{-13} s$) relaksuoja į žemiausią virpesinį polygmenį (virpesinė relaksacija - VR). Vėliau vidinės konversijos (VK) būdu relaksuoja į pirmąją sužadintą elektroninę būseną S_1 , ir galiausiai vidinės relaksacijos būdu pereina į žemiausią S_1 būsenos virpesinį polygmenį. Virpesinės relaksacijos ir vidinės konversijos metu perteklinė energija virsta šiluma ir yra išsklaidoma aplinkoje (tirpalas, biologinis audinys, kt.).

Spindulinių vyksmų analizei pakanka apsiriboti tik žemiausiu sužadintu singuletinu lygmeniu S_1 ir žemiausiu tripletiniu lygmeniu T_1 . Aukštesni lygmenys nedalyvauja emisijos vyksme dėl itin sparčios nespindulinės relaksacijos $S_n \rightarrow S_1$ ir $T_n \rightarrow T_1$. Taigi, nagrinėjant spindulinius vyksmus, svarbios tik S_1 ir T_1 būsenos.

Galimi spinduliniai vyksmai iš ir į S_1 ir T_1 būsenas yra žadinančios spinduliuotės fotono sugertis ir emisija (fluorescencija arba fosforescencija):

1. $S_0 + h\nu \rightarrow S_1$ - singuletinės – singuletinės būsenos sugertis, eksperimentiškai nusakoma moliniu sugerties koeficientu $\varepsilon(S_0 \rightarrow S_1)$;
2. $S_0 + h\nu \rightarrow T_1$ - singuletinės – tripletinės būsenos sugertis, eksperimentiškai nusakoma moliniu sugerties koeficientu $\varepsilon(S_0 \rightarrow T_1)$ („pagal sukinį draudžiamas šuolis“);
3. $S_1 \rightarrow S_0 + h\nu$ - singuletinės – singuletinės būsenos spindulinis vyksmas, fluorescencija, apibrėžiama vyksmo spartos konstanta $k_{ff}^{S_1 \rightarrow S_0}$;
4. $T_1 \rightarrow S_0 + h\nu$ - tripletinės – singuletinės būsenos spindulinis vyksmas, fosforescencija, apibrėžiama vyksmo spartos konstanta $k_{ff}^{T_1 \rightarrow S_0}$, („pagal sukinį draudžiamas šuolis“);

Galimi nespinduliniai vyksmai iš S_1 ir T_1 būsenų – vidinė konversija ir interkombinacinė konversija:

5. $S_1 \rightarrow S_0 + \text{šiluma}$ - vidinė konversija tarp singuletinių būsenų, nusakoma vyksmo spartos konstanta, $k_{VK}^{S \rightarrow S}$;

6. $S_1 \rightarrow T_1 + \text{šiluma}$ - interkombinacinė konversija iš singuletinės į tripletinę būseną, charakterizuojama vyksmo spartos konstanta, $k_{IK}^{S \rightarrow T}$, („pagal sukinį draudžiamas šuolis“);
7. $T_1 \rightarrow S_0 + \text{šiluma}$ - interkombinacinė konversija iš tripletinės į pagrindinę - singuletinę būseną, („pagal sukinį draudžiamas šuolis“), charakterizuojama vyksmo spartos konstanta, $k_{IK}^{T \rightarrow S}$;
8. Iš elektroniškai sužadintų S_1 ir T_1 būsenų taip pat galimos įvairios pirminės fotocheminės reakcijos (laisvų radikalų susidarymas, fotoizomerizacija ir kt.).

Iš elektroniškai sužadintos S_1 būsenos žemiausio virpesinio polygmenio galimi trys energijos relaksacijos vyksmai: pirmas - išspinduliuojant fotoną – fluorescencija ($S_1 \rightarrow S_0$). Šio spindulinio vyksmo tikimybė proporcinga energijos tarpui tarp S_1 ir S_0 būsenų (kuo didesnis ΔE , tuo didesnė fluorescencijos vyksmo tikimybė ir mažesnė nespindulinio vyksmo tikimybė, ir atvirkščiai); antras – grįžimas į pagrindinę būseną nespinduliniu būdu (vidinė konversija), šis vyksmas gana lėtas ir sėkmingai konkuruoja su fluorescencija; ir trečiasis – šuolis į tripletinę būseną interkombinacinės konversijos būdu, $S_1 \rightarrow T_1$, (nospindulinis vyksmas). Šis vyksmas yra draudžiamas pagal elektrono sukinį, tačiau dėl stiprios sukinio - orbitos sąveikos pasikeičia sukinio orientacijos kryptis ir molekulė pereina į žemiausią tripletinę būseną. Elektrono sukinys vaidina svarbų vaidmenį daugelyje fotocheminių (ar fotobiologinių) reakcijų apsprendžiant perteklinės energijos deaktyvaciją per ilgiau gyvuojančią tripletinę būseną. Lyginant su vidinės konversijos vyksmo sparta, sukinio inversijos sąlygojamas vyksmas yra $10^2 - 10^6$ kartų lėtesnis.

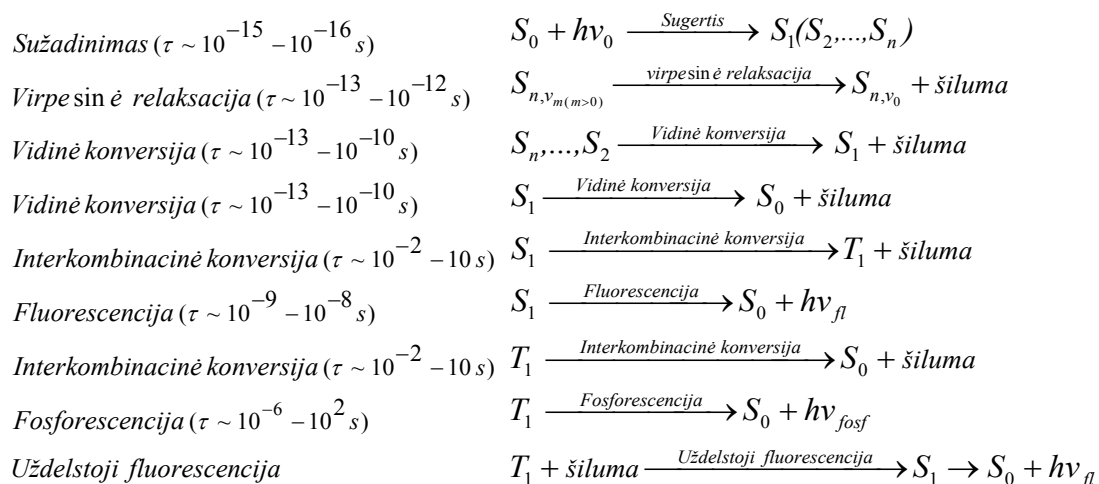
Interkombinacinės konversijos tikimybė padidėja jei žemiausias virpesinis sužadintos singuletinės būsenos lygmuo persikloja su vienu iš aukštesniuųjų tripletinės būsenos virpesiniu lygmeniu. Persiorientavus sukiniams, molekulė virpesinės relaksacijos būdu (dėl susidūrimų su terpės molekulėmis) iš aukštesnio virpesinio polygmenio pereina į žemiausią tripletinės būsenos virpesinį polygmenį. Šios būsenos deaktyvacija gali vykti dviem būdais: a) interkombinacinės

konversijos būdu molekulė gali grįžti į pagrindinės būsenos S_0 aukštesnį virpesinį polygmenį ir galiausiai virpesinės relaksacijos būdu grįžta į žemiausią S_0 būsenos virpesinį polygmenį; b) perteklinė energija gali būti atpalaiduota išspinduliuojant fotoną. Toks spindulinis vyksmas vadinamas fosforescencija. Kadangi $T_1 \rightarrow S_1$ vyksmui reikalinga atlikti elektrono sukinių inversija, todėl fosforescencijos vyksmas lėtas ir tikimybė yra daug mažesnė lyginant su fluorescencija. Žemiausias tripletinės būsenos virpesinis lygmuo yra žemesnės energijos nei analogiškas virpesinis lygmuo žemiausios sužadintos singuletinės būsenos, todėl fosforescencijos fotono dažnis yra mažesnis nei fluorescencijos.

Jeigu energijų skirtumas tarp T_1 ir S_1 būsenų yra nedidelis, tuomet organinių molekulių tripletinės būsenos deaktyvacija gali vykti ir kitu būdu – uždelstoji fluorescencija. Paprastai šiam vyksmui yra būtina termiškai sužadinti T_1 būseną iki aukštesnių virpesinių polygmenų, sutampančių su būsenos S_1 virpesinių polygmenų energija. Interkombinacinės konversijos šuolio metu elektrono sukiny yra invertuojamas, todėl vyksmas yra lėtas. Uždelstosios fluorescencijos spektrinis pasiskirstymas sutampa su paprastos fluorescencijos, tačiau gyvavimo trukmė atitinka tripletinės būsenos gyvavimo trukmę.

Kadangi organinių molekulių tripletinės būsenos gyvavimo trukmė yra pakankamai ilga (gali siekti dešimtis sekundžių), todėl nespinduliniai šuoliai gana sėkmingai konkuruoja su fosforescencija. Be to, ši būseną ypač jautri gesinantiems susidūrimams su atsitiktinėmis priemonėmis, pavyzdžiui deguonies molekulėmis.

Apibendrinant išvardintų vyksmų laikinę seką, galime sudaryti sekančią perteklinės energijos deaktyvacijos vyksmų schemą:



Organinių medžiagų fluorescencija ar fosforescencija nepriklauso nuo žadinančio fotono energijos (Vavilovo dėsnis). Svarbu tik tai, kad būtų sužadinta kuri nors aukštesnė ($S_n, T_n, n \geq 1$) elektroninė būseną. Dėl sparčios nespindulinės relaksacijos molekulė grįš į sužadintos būsenos S_1 (arba T_1) žemiausią virpesinį polygmenį, iš kurio ir vyksta fluorescencija (arba fosforescencija). Taigi išspinduliuoti fotonai yra mažesnės energijos nei molekulės sugerti. Iš čia seka Stokso Lomelio dėsnis: fluorescencijos spektro maksimumas visada pasislinkęs į ilgesnių bangų pusę sugerties spektro maksimumo atžvilgiu:

$$h\nu_{sug}^{\max} > h\nu_{fl}^{\max} \quad [2]$$

Šis poslinkis (Stokso poslinkis) atsiranda dėl to, kad molekulės konfigūracija sužadintoje ir pagrindinėje būsenose beveik sutampa, o poslinkio dydis priklauso nuo molekulės prigimties ir ją supančios aplinkos. Dažnu atveju, molekulės sugerties ir fluorescencijos spektrai dalinai persikloja t.y. dalis išspinduliuotų fotonų yra trumpesnio bangos ilgio nei molekulės sugerti kas, iš pirmo žvilgsnio, prieštarauja energijos tvermės principui. Tačiau šis prieštaravimas yra kompensuojamas atsižvelgiant į tai, kad kambario temperatūroje nedidelė dalis molekulių yra aukštesnėje virpesinėje būsenoje nei žemiausias ν_0 virpesinis polygmenis tiek molekulės pagrindinėje, tiek ir sužadintoje būsenose. Žemose temperatūrose šis prieštaravimas išnyksta.

Elektroniškai sužadintų molekulės būsenų $^*M(S_1)$ ir $^*M(T_1)$ deaktyvacijos vyksmų spartos konstantos nusako stebimo vyksmo efektyvumą – būsenos kvantinį našumą:

$$\Phi = \frac{\text{spindulinių (ar nespindulinių) aktų sk.}}{\text{sugertų fotonų sk.}} \quad [3]$$

Liuminescencijos kvantinis našumas (Φ) nusako tikimybę iš žemiausios sužadintos singuletinės būsenos ar žemiausios tripletinės būsenos spinduliniu būdu grįžti į pagrindinę nesužadintą būseną ir yra išreiškiamas per spindulinio ir nespindulinių vyksmų spartos konstantas:

$$\Phi_{\text{liuminescencijos}} = ^*\Phi \frac{k_{sp}}{k_{sp} + \sum k_j} = ^*\Phi k_{sp} \tau \quad [4]$$

kur $^*\Phi$ - molekulės sužadintos būsenos suformavimo efektyvumas (kvantinis našumas), iš kurios galimas spindulinis vyksmas (S_1 arba T_1); k_{sp} - sužadintos būsenos spindulinio vyksmo spartos konstanta (fluorescencija ar fosforescencija); $\sum k_j$ - suma visų kitų galimų vyksmų spartos konstantų deaktyvuojančių šią būseną (vidinės konversijos ir interkombinacinės konversijos vyksmų konstantos); $\tau = (k_{sp} + \sum k_j)^{-1}$.

Kai $k_{sp} \gg \sum k_j$ - t.y. spindulinių vyksmų spartos konstanta didesnė nei nespindulinių vyksmų iš tos pačios būsenos, - molekulės sužadinimo energija yra prarandama spinduliniu būdu – fluorescuojant (ar fosforescuojant), o jei $\sum k_j \gg k_{sp}$ - energija bus prarandama nespinduliniu būdu (vidinės konversijos ar interkombinacinės konversijos būdu).

Paprastai organinių molekulių liuminescencijos kvantinis našumas $(\Phi_{fl} + \Phi_{ff}) < 1$, tai reiškia, kad vyksta stipri konkurencija tarp spindulinių ir nespindulinių energijos deaktyvacijos kelių, dalis perteklinės energijos yra prarandama vidinės konversijos ar interkombinacinės konversijos būdu, o tam įtakos turi molekulės vidinės sandaros ypatumai bei išoriniai aplinkos veiksniai (slėgis, temperatūra ir kt.).

Kvantinį našumą kiekvienam iš galimų energijos deaktyvacijos vyksmų iš S_1 ir T_1 būsenų galime išreikšti sekančiai:

$$\begin{aligned}
 \Phi_{\text{fluorescencija}} &= \frac{k_{fl}}{k_{fl} + k_{nosp}^{S_1 \rightarrow T_1} + k_{nosp}^{S_1 \rightarrow S_0}} \\
 \Phi_{\text{vidinė konversija}} &= \frac{k_{nosp}^{S_1 \rightarrow S_0}}{k_{fl} + k_{nosp}^{S_1 \rightarrow T_1} + k_{nosp}^{S_1 \rightarrow S_0}} \\
 \Phi_{\text{interkombinacinė konversija}}^{S_1 \rightarrow T_1} &= \frac{k_{nosp}^{S_1 \rightarrow T_1}}{k_{fl} + k_{nosp}^{S_1 \rightarrow T_1} + k_{nosp}^{S_1 \rightarrow S_0}} \\
 \Phi_{\text{fosforescencija}} &= \frac{\Phi_{\text{interkomb. konversija}} k_{ff}}{k_{ff} + k_{nosp}^{T_1 \rightarrow S_0}} \\
 \Phi_{\text{interkombinacinė konversija}}^{T_1 \rightarrow S_0} &= \frac{\Phi_{\text{interkombinacinė konversija}}^{S_1 \rightarrow T_1} k_{nosp}^{T_1 \rightarrow S_0}}{k_{ff} + k_{nosp}^{T_1 \rightarrow S_0}}
 \end{aligned} \tag{5}$$

Sužadintų būsenų S_1 ir T_1 gyvavimo trukmės atvirkščiai proporcingos visų galimų deaktivacijos vyksmų sumai iš atitinkamos būsenos:

$$\tau_S = \frac{1}{(k_{ff} + k_{IK}^{S_1 \rightarrow T_1} + k_{VK}^{S_1 \rightarrow S_0})} \text{ ir } \tau_T = \frac{1}{(k_{ff} + k_{IK}^{T_1 \rightarrow S_0})} \quad [6]$$

Skirtingų sužadintų molekulių galimų fotofizikinių vyksmų tikimybė yra skirtinga ir stipriai priklauso nuo aplinkos (biologinio audinio, tirpiklio, kt.). Sugertos šviesos dalis priklauso nuo terpės (biologinis audinys, tirpalas) savybių bei bandinio (terpės) storio. Šviesos sugertis homogeninėje terpėje yra nusakoma pagal Bugerio - Lamberto – Bero dėsnį:

$$I = I_0 \exp(-\alpha l) = I_0 \exp(-knl) \quad [7]$$

kur l - optinis kelias (bandinio storis), I ir I_0 - bandinį praėjusios ir į bandinį kritusios šviesos intensyvumas, α - sugerties koeficientas ($\alpha(\lambda)$) [cm^{-1}], n - sugeriančių molekulių tankis [cm^{-3}], k - molekulinis sugerties koeficientas. Paprastai dažniau naudojamas molinis sugerties koeficientas - ekstinkcijos koeficientas ε , [$M^{-1}cm^{-1}$]. Tuomet 7-ą išraišką galime perrašyti sekančiai:

$$I = I_0 \cdot 10^{-\varepsilon cl} \quad [8]$$

čia c - molinė sugeriančių molekulių koncentracija ($M = mol \cdot l^{-1}$), $\varepsilon cl = D \equiv A$, kur D - bandinio optinis tankis ($A = \lg(I_0/I)$). Priklausomai nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio įvairių audinių sugerties koeficientas paprastai kinta ribose nuo 0,2 iki 25 cm^{-1} [56-57].

Esant nuolatiniam žadinimui, fluorescencijos intensyvumas gali būti apibrėžiamas sekančiai [52]:

$$I_{fl} = I_0 \varepsilon \Phi_{fl} cl$$

ε - organinių molekulių (chromoforo) ekstinkcijos koeficientas; l - optinis kelias; Φ_{fl} - fluorescencijos kvantinis našumas; c - molekulių koncentracija. Bendru atveju, fluorescencijos intensyvumas priklauso nuo chromoforo aplinkos (terpės savybės), kuri turi įtakos chromoforo ekstinkcijos koeficientui bei fluorescencijos kvantiniam našumui, o taip pat ir paties chromoforo koncentracijos. Tuo atveju, kai medžiagos optinis tankis yra mažas, fluorescencijos intensyvumas bus tiesiog proporcingas fluorescuojančio chromoforo koncentracijai.

Fluorescencijos spektras ($I = f(\lambda_{fl})$) bendru atveju nepriklauso nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio - vyksta sparti nespindulinė relaksacija į žemiausią sužadintos būsenos S_1 virpesinį polygmenį, nepriklausomai nuo to, į kokį aukštesnės elektroninės būsenos virpesinį polygmenį buvo sužadinta. Tuo atveju, kai terpė yra nevienalytė (pvz., biologinis audinys), t.y. egzistuoja daug skirtingų molekulių, atitinkančių skirtingas elektronines būsenas (kiekvienas komponentas turi savo charakteringą sugerties ir fluorescencijos spektrą), fluorescencijos spektras priklausys nuo žadinančio bangos ilgio. Eksperimentiškai registruosime suminį daugelio audinio chromoforų fluorescencijos spektrą, kurio forma ir intensyvumas priklausys nuo pasirinkto žadinančios spinduliuotės bangos ilgio. Tinkamo žadinimo bangos ilgio parinkimas įvairių patologijų atveju yra vienas iš pagrindinių fluorescencinės spektroskopijos uždavinių. Tai tiesiogiai susiję su galimybe identifikuoti specifines fluorescuojančias molekules įvairių pažeidimų charakterizavimui ir klasifikacijai. Naudojant atrankų žadinimą (keleto žadinimo bangos ilgių sistema) galima selektyviai sužadinti tik tam tikras fluorescuojančias molekules audinyje ir pagal registruojamus spektrinius savitumus jas identifikuoti bei surinkti daugiau diagnostikai vertingos informacijos, susijusios su bioobjekto struktūros, metabolinių ar funkcinių procesų pokyčių įtaka registruojamų fluorescencijos charakteristikų specifiškumui. Tokių eksperimentiškai užregistruotų fluorescencijos žadinimo ir emisijos duomenų masyvų (FŽE matricos) analizė leidžia rasti tinkamą žadinimo bangos ilgį pažeistos specifiniams spektriniais požymiams išryškinti bei identifikuoti pažeidimą in vivo realiu laiku, net ir tais atvejais, kai spektriniai skirtumai yra nežymūs. Tai itin svarbu spektrofluorimetriniams tykimams įvairių pažeidimų (pvz., infekcijos pažeistas audinys, uždegiminis ar navikinis darinys) atpažinimui.

1.3. Biologinio audinio optiniai savitumai

Optiniai spektroskopijos metodai itin patrauklūs neinvazinei biologinių objektų struktūros ir funkcijų savitumų analizei ląstelių ar audinių lygmenyje. Parametrai, apibrėžiantys biologinio audinio optines savybes, yra svarbūs ne tik optinei diagnostikai ir vaizdinimui, įvairių pažeidimų specifinius optinių savybių skirtumus vertinant kaip diagnostinį (vaizdinį) audinio būsenos žymenį, bet ir lazerinei terapijai, kur biologinio objekto optinės savybės sąlygoja žadinančiosios spinduliuotės pasiskirstymą audinyje, o kartu nustato fotocheminio, terminio ar fotomechaninio poveikio zoną [58-59].

Biologinis audinys yra optiškai nevienalytė terpė, sudaryta iš daugelio sudėtingų ląstelinių sistemų, turinčių savitas biochemines, fizikines ir spektroskopines savybes [60]. Dėl šviesos ir biologinio audinio sąveikos vienu metu gali vykti keletas vyksmų: į audinio paviršių krintanti spinduliuotė gali atsispindėti arba lūžti dviejų skirtingų lūžio rodiklio aplinkų riboje; būti sugerama tam tikrų molekulių bei sąlygoti fotocheminius vyksmus, arba sugertą perteklinę energiją atpalaiduoti kaip fluorescenciją; būti išsklaidyta dėl biologinės terpės nevienalytiškumo. Audinio savybės bei žadinančios spinduliuotės bangos ilgis nulems, kuris iš šių vyksmų dominuos.

Vertinant biologinio objekto atspindžio savybes, yra registruojamas kritusios ir atsispindėjusios šviesos intensyvumų santykis. Šviesos lūžimas yra svarbus, nagrinėjant skaidrius audinius (pvz., akies stiklakūnis). Dviejų aplinkų stiklakūnis - oras lūžio rodiklio vertės pakankamai skirtingos, todėl įmanoma įvertinti šviesos lūžio kampą. Tuo tarpu lūžimą neskaidrioje biologinėse aplinkose dėl stiprios sklaidos ir sugerties yra labai sudėtinga išmatuoti.

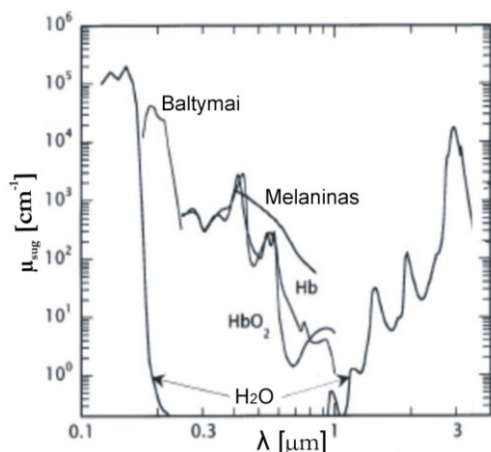
Sugertis ir sklaida – du pagrindiniai fizikiniai reiškiniai įtakoiantys spinduliuotės slopinimą audinyje bei ribojantys spinduliuotės prasiskverbimo gylį. Pagrindiniai veiksniai, lemiantys audinio sklaidos savybes, yra: audinio nevienalytiškumas – audinio ar ląstelės struktūrinių elementų (sklaidos centrų) dydis, forma, tankis bei atskirų komponentų lūžio rodiklis. Ląstelės branduoliai, membranos, kiti ląstelės organoidai, liposomos, Goldžio aparatas, lipidų pūslelės riebaliniuose audiniuose yra pagrindiniai sklaidos centrai biologinėse struktūrose.

Kiekvienas šių centrų turi savo būdingą dydį, formą bei lūžio rodiklį. Pavyzdžiui, žinduolių ląstelės dydis gali kisti nuo 10 iki 30 μm , o viduląstelinių komponentų dydis pakankamai įvairus: mitochondrijos skersmuo apie 1 μm , Goldžio aparatas – apie 1 μm ilgio, branduolio skersmuo – 7 μm , plazminės membranos storis - 0.005 μm ; lizosomos skersmuo – 0,4 μm ; tuo tarpu baltymų skersmuo - mažiau nei 7 nm. Lūžio rodiklio vertės taip pat gana skirtingos: mažesnis lūžio rodiklis būdingas tarpląstelinei terpei – apie 1,35 (priklauso nuo elektrolitų koncentracijos, gliukozės, fruktozės kiekio ir kt.), citoplazmos – 1,37 -1,38; tuo tarpu didžiausią lūžio rodiklio vertę turi lipidai – 1,46 ir baltymai – 1,51. Bendru atveju, lūžio rodiklis yra didesnis nei oro, ir laikoma, kad audinio vidutinė lūžio rodiklio vertė siekia apytikriai 1,4.

Skaidos centrų erdvinis pasiskirstymas, konfigūracija ląstelės ar audinių lygmenyje, įvairios makromolekulės, ląstelių ir organoidų terpės mikroaplinkos savybės turi didelę įtaką biologinio audinio sklaidos savybėms [61-64]. Sklaidančiai aplinkai apibūdinti yra naudojamas sklaidos koeficientas $\mu_s [\text{cm}^{-1}]$, kurio atvirkščias dydis nusako laisvą fotono kelią iki išsklaidymo. Įvairių audinių sklaidos koeficientas priklauso nuo bangos ilgio ir mažėja didėjant bangos ilgiui. Kadangi fotonai išsklaidomi įvairiomis kryptimis (vyksta anizotropinė sklaida), dažniausiai naudojamas sumažintas sklaidos koeficientas μ'_s :

$$\mu'_s = \mu_s (1 - g) \quad [7]$$

čia: $g = \langle \cos(\Theta) \rangle$ - anizotropiškumo veiksnys, nusakantis, kokiomis kryptimis bus išsklaidomi fotonai, ir skaitine verte yra lygus vidutinio sklaidos kampo kosinusui. Kai $g = 0$ – vyksta izotropinė sklaida (fotonai išsklaidomi į visas puses vienodai), kai $g = 1$ - vyksta anizotropinė sklaida (fotonai daugiausia išsklaidomi



1.2. pav. Pagrindinių audinio chromoforų sugerties spektrai [65]

viena kryptimi). Daugelio minkštų audinių anizotropijos koeficientų vertės yra tarp 0.7 – 0.98, o sklaidos koeficiento μ_s vertės, išmatuotos daugeliui skirtingų

bangos ilgių, paprastai yra $10 - 1000 \text{ nm}^{-1}$ [56,66]. Sugertį sąlygoja audinyje esantys įvairūs chromoforai, kurių skirtinga vidinė molekulinė sandara (elektronų ir branduolių konfigūracijos), todėl sugertis priklauso nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio. Biologiniame audinyje yra mišinys įvairių biomolekulių, kurių kiekis ir pasiskirstymas erdvėje yra labai skirtingas. Tokia daugelio chromoforų sistema sugeria įvairią spektro srities spinduliuotę, todėl bendras audinio sugerties spektras yra gana platus, be aiškios struktūros. Audinio pokyčiai dažnai susiję su tam tikrų chromoforų kiekio ar pasiskirstymo ląstelėje ar audinio sluoksniuose skirtumais, kurie kinta laike ir atspindi audinio fiziologinę būseną. Pagrindiniai chromoforai atsakingi už audinio optinės sugerties savybes, yra baltymai, dezoksiribonukleininė rūgštis (DNR), melaninas, hemoglobinas ir vanduo. Tačiau jų daroma įtaka skirtingiems bangos ilgiams yra nevienoda (1.2. pav.).

UV srityje (180 – 400 nm) dominuoja baltymų, DNR ir melanino sugertis.

Būdingas optinis sugerties gylio ($\frac{1}{\mu_{\text{sug}}} [\text{cm}]$), kuris nusako vidutinį laisvą fotono kelią iki sugerties akto, kinta nuo $\leq 0,5 \mu\text{m}$ ($\lambda = 190 \text{ nm}$) iki $200 - 400 \mu\text{m}$ ($\lambda = 400 \text{ nm}$). Trumpiausių bangos ilgių srityje dominuoja peptidinės jungties ($O = \overset{\cdot}{C} - \overset{\cdot}{N} - H$), kuri yra visų baltymų pagrindas, sąlygota sugertis (sugerties maksimumas ties 190 nm). Žmogaus audiniuose baltymai yra vieni gausiausių sudėtinių elementų po vandens. Einant į ilgesnių bangos ilgių spektro sritį, sugerties koeficientas stipriai sumažėja. Taigi, peptidinės jungties sugertis audiniui išlieka svarbi (dominuojanti) iki 240 nm. Ilgesnių UV bangos ilgių srityje deoksiribonukleininė rūgštis (DNR), aromatinių aminorūgščių liekanos ir melaninas tampa dominuojančiais chromoforais. Tiek purino, tiek ir pirimidino bazės yra atsakingos už DNR sugerties smailę ties 260 nm. Aromatinės aminorūgštys - triptofanas, tirozinas ir fenilalaninas, - taip pat pasižymi plačiomis sugerties juostomis su smailėmis ties 250 – 280 nm [67-68]. Melanino sugertis yra svarbi, kai nagrinėjame pigmentinius audinius (pvz.: oda, akies rainelė, tinklainės pigmentinis epitelis). Šio chromoforo sugertis ima dominuoti nuo 300 nm. Pradedant nuo sugerties maksimumo ties 335 nm, melanino sugertis mažėja einant nuo UV artimosios IR srities link.

Audinio sugerties savybes regimojoje spektro srityje (400 – 780 nm) lemia melanino ir hemoglobino sugertis. Hemoglobinas (Hb) - baltymas turintis spalvinę prostetinę grupę – hema (geležies turintį porfiriną), kuris dalyvauja deguonies pernašoje organizme. Deguoniui jungiantis prie hemoglobino, vyksta jo molekulės konformaciniai pokyčiai, todėl pakinta hemoglobino spalva bei sugertis. Taigi, oksiduoto (HbO₂) ir redukuoto (Hb) hemoglobino sugerties spektrai turi skirtingus spektrinius braižus. Nors Hb ir HbO₂ sugeria ir UV srityje, tačiau ima dominuoti regimojo spektro srityje lyginant su kitais audinio chromoforais. Hb ir HbO₂ pagrindinės sugerties smailės yra atitinkamai ties 433 ir 414 nm. Sugertis stipriai sumažėja mėlynoje srityje, o vėliau vėl padidėja žalioje spektro srityje, kurioje HbO₂ sugerties smailės išsidėsčiusios ties 542 ir 577 nm, o Hb – ties 556 nm ir nežymi smailė ties 750 nm bangos ilgiu. Hemoglobino koncentracija minkštuosiuose audiniuose siekia kelis procentus audinio tūrio vieneto, todėl jo įtaka aktualesnė kraujagysliniuose audiniuose. Skirtumai oksiduotos ir redukuotos hemoglobino formų sugerties spektruose gali būti laikomi hemoglobino įsotinimo deguonimi pokyčio rodikliu [69]. Paprastai tarp oksiduoto ir redukuoto hemoglobino koncentracijų yra pusiausvyra, tačiau ji gali pakisti dėl pasikeitusių sąlygų (terpės pH, temperatūros, kt.). Skirtumai sugerties spektruose gali suteikti svarbios informacijos apie biologinio objekto fiziologinę būseną. Pavyzdžiui, nervinio audinio aktyvumo būklė gali būti identifikuojama pagal oksiduoto ir redukuoto hemoglobino koncentracijos pokytį [70].

Pigmentiniuose audiniuose (oda, plaukai ar akies audiniai) melaninas turi didžiausią įtaką bioobjekto sugerties savybėms. Melaninas kaupiasi pigmentinėse granulėse – melanosomose (~ iki 1 μm skersmens) išsidėsčiusiose melanocituose (ląstelėse atsakingose už melanino sintezę), kuriam charakteringas didelis sklaidos koeficientas, kuris regimojoje spektro srityje net iki 100 kartų gali viršyti paties audinio sugerties koeficiento vertę [65,71].

Vanduo yra vienas svarbesnių chromoforų IR srityje ir jo įtaka labai padidėja spektrinėje srityje nuo 900 nm. Vandens sugerties spektrui būdingos kelios sugerties smailės: ties 0,96, 1,44, 1,95, 2,94, 4,68 ir 6,1 μm. Artimojoje

infraraudonoje srityje sugertis yra nežymi, tačiau sparčiai didėja einant link tolimosios IR srities.

Minkštųjų audinių sugerties koeficiento vertės kinta nuo 0.1 iki 10000 cm⁻¹ einant nuo IR srities link UV srities, atitinkamai optinis prasiskverbimo gylis siekia nuo 10 cm iki 0,1 mm [72]. Spektrinė sritis nuo 600 nm iki 1200 nm yra audinių skaidrumo sritis (dar vadinama "terapiniu langu"), į kurią patenkanti spinduliuotė, sklisdama biologiniu audiniu, patiria mažiausius nuostolius, sąlygojamus sugerties ar sklaidos, ir kartu užtikrina didžiausią spinduliuotės prasiskverbimo gylį

$$\delta = \frac{1}{(\mu_{sug} + \mu_s)}$$
 [73]. Ši sritis itin patraukli giluminei audinių fluorescencinei

diagnostikai arba fotosensibilizuotai terapijai, kai naudojami sensibilizatoriai, sugeriantys šios spektro srities spinduliuotę.

Optinių metodų panaudojimas diagnostikos reikmėms yra ribojamas žadinančios spinduliuotės prasiskverbimo gylio [74]. Naudojant UV spektro srities spinduliuotę, galima sužadinti bei stebėti tik paviršiniuose audinio sluoksniuose esančių biomolekulių fluorescenciją. Žadinančios spinduliuotės sugertis bei sklaida, o kartu ir fluorescencijos sugertis ir sklaida audinyje nulems įvairius registruojamų spektrų iškreipimus. Pavyzdžiui, tyrimų metu pastebėta, kad displazijos progresijos metu dėl branduolių atipiškumo stipriai padidėja sklaida nuo ląstelių [61]. O angiogenezė, kuri yra svarbus ikinavikinių ir navikinių darinių formavimosi rodiklis, sąlygoja hemoglobino koncentracijos padidėjimą stromoje, ir kartu padidina audinio sugertį [62]. Taigi, visuma spinduliuotės patiriamų optinių aktų (sklaida, sugertis) audinyje yra tiesiogiai susijusi su įvairiais biocheminiais ar struktūriniais pokyčiais, kurie neatsiejami nuo ligos vystimosi eigos ir gali tarnauti kaip diagnostiniai žymenys praktiniams optinių metodų taikymams biomedicinoje.

Reikia pabrėžti, kad optinės audinio savybės *in vitro* sistemų (ląstelių ar audinių lygmenyje) ženkliai skiriasi nuo registruojamų *in vivo* [75-76]. Gyvybingų audinių morfologinė struktūra skiriasi nuo paimtų audinio bandinių (biopsijų), o tai gali nulemti sklaidos padidėjimą. Bandinių ruošimo metu gali atsirasti įvairūs pokyčiai ir deformacijos juos džiovinant, šaldant ar tiesiog mirkant fiziologiniame tirpale (pažeidžiamas audinio gyvybingumas, temperatūra, sutrikdoma kraujotaka

ir t.t.). Biocheminės, struktūrinės ir metabolinės audinio būsenos sutrikdymai nulems skirtumus spinduliuotės sugerties, sklaidos ir emisijos vyksmuose in vivo ir ex vivo [77]. Todėl tik in vivo atlikti matavimai tiesiogiai atspindi tikrąsias audinio optines savybes.

1.4. Savosios fluorescencijos taikymas navikų diagnostikoje

Tam tikros biomolekulės dalyvaujančios ląstelės funkcinuose ir metaboliniuose procesuose (aromatinės aminorūgštys (svarbiausia jų yra triptofanas), kofermentai (nikotinamido adenino dinukleotidas (NADH) ir jo fosfatas (NADPH)), flavinai (flavinadenindinukleotidas (FAD)), lipopigmentai (lipofuscinas ir ceroidai), porfirinai), bei biomolekulės susijusios su tarpląstelinės medžiagos sandara (struktūriniai baltymai – kolagenas ir elastinas) atlieka endogeninių fluoroforų vaidmenį biologiniame audinyje [78]. Audinio biocheminių ir metabolinių procesų pokyčiai gali būti susiję su organizmo senėjimu ir įvairiais patologiniais organizmo pakitimais, dėl ko pakinta tam tikrų endogeninių fluoroforų pasiskirstymas, santykinis kiekis bei juos supanti mikroaplinka (pvz., terpės pH). Visi šie pokyčiai įvardijami kaip tam tikri nukrypimai nuo normalios sveikos audinio (ląstelės) būklės ir gali būti identifikuoti remiantis audinio endogeninių fluoroforų fluorescencijos savitumais – fluorescencijos intensyvumo bei spektro formos skirtumais.

Biologinis audinys – daugelio įvairių šviesą sugeriančių ir fluorescuojančių biomolekulių mišinys, kurių tiek sugerties, tiek ir fluorescencijos spektrai yra platūs ir vienas kitą dengiantys [53]. Audinio endogeniniai fluoroforai daugiausia sugeria ultravioletinės ir mėlynos spektro srities šviesą, o fluorescuoja daugiausia ultravioletinėje ir regimoje spektro srityje. Jų skleidžiama fluorescencija vadinama savąja fluorescencija, o metodas, pagrįstas endogeninių fluoroforų optiniu sužadiniu bei fluorescencijos stebėjimu, vadinamas savosios fluorescencijos metodu. Metodo esmė: aptikti specifinius audinio fluorescencijos skirtumus, būdingus navikui ir skiriančius jį nuo sveiko audinio, remiantis fluorescencijos spektriniais savitumais [79-80].

Biologinio audinio fluorescencijos savitumai leidžia charakterizuoti biologinės sistemos fiziologinę būklę, aptikti pirminius morfologinius ar citologinius nukrypimus nuo normalios (sveikos būklės), detektuoti mikroskopinius piktybinius audinių pokyčius, nepakenkiant aplinkiniams audiniams, neinvaziniu būdu tirti įvairių biomolekulių sąveikos mechanizmus jų natūralioje aplinkoje. Paprastai už tiriamo audinio fluorescenciją atsakingi keli

endogeniniai fluoroforai, kurių fluorescencijos (ir sugerties) spektrai persikloja tarpusavyje. Be to, šios biomolekulės audinyje pasiskirsto nevienodai (ypač gilesniuose sluoksniuose), o taip pat skiriasi jų koncentracijos atskirose audinių grupėse [81-82]. Žinant pagrindinių audinių sudarančių endogeninių fluoroforų spektrus, galime atlikti užregistruotų spektrų analizę bei identifikuoti fluoroforus, atsakingus už tiriamojo bioobjekto savosios fluorescencijos spektrą.

Kadangi atskiri audinio fluoroforai turi savo charakteringus žadinimo ir emisijos spektrus, skirtingi žadinančios spinduliuotės bangos ilgiai sužadins skirtingus audinio endogeninius fluoroforus. Todėl tinkamai parinktas žadinančios spinduliuotės bangos ilgis (ar bangos ilgių derinys) yra ypatingai reikšmingas fluorescencijos registravimo rezultatų interpretacijai diagnostiniais tikslais. Pavyzdžiui, už baltymų fluorescenciją atsakingos trys fluorescuojančios aromatinės aminorūgštys – triptofanas, tirozinas ir fenilalaninas, kurių fluorescencijos savitumai (fluorescencijos intensyvumas, kvantinis našumas) priklauso nuo baltymo konfigūracijos (konformacinės būsenos). Triptofanas ir tirozinas turi sugerties juostos smailes ties 280 nm ir 275 nm bangos ilgiu atitinkamai, o fenilalaninas – ties 260 nm. Taigi žadinant 280 - 295 nm bangos ilgio spinduliuote paprastai dominuoja triptofano fluorescencija su nežymia tirozino ir fenilalanino emisija. Triptofanui būdinga stipriausia bei didžiausią kvantinį našumą turinti fluorescencija lyginant su kitomis aromatinėmis aminorūgštimis (silpniausia jų yra fenilalanino). Žinoma, kad triptofano fluorescencija (intensyvumas, fluorescencijos smailės bangos ilgis, fluorescencijos kvantinis našumas) yra jautri terpės poliškumui ir gali būti gesinama protonuotomis rūgšties grupėmis [53]. Paprastai triptofano fluorescencijos intensyvumo pokytis tarnauja kaip baltymo būsenos konformacinio pasikeitimo žymuo, o fluorescencijos smailės bangos ilgio padėtis – kaip fluoroforo terpės rodiklis. Tirozinas fluorescuoja silpniau, tačiau jo indėlis į registruojamą fluorescencijos spektrą irgi yra reikšmingas, kadangi paprastai jo santykinis kiekis organizme yra didžiausias. Tirozinas yra veiksmingai gesinamas triptofano dėl energijos pernašos. Fenilalanino fluorescencija registruojama tik nesant triptofano ar tirozino, kadangi jo jautrumas - fluorescencijos kvantinis našumas ir molinis

sugerties koeficientas, yra žemas. Pažymėtina, kad fluorescencijos savybės priklauso nuo fenilalanino struktūros. Pavyzdžiui, papildomos hidroksilo grupės (kaip tirozine) gali keliasdešimt kartų padidinti fluorescencijos intensyvumą, tuo tarpu jei yra prikabinamas indolo žiedas (kaip triptofane) – fluorescencijos intensyvumas išauga kelis šimtus kartų lyginant su įprastos struktūros fenilalaninu.

Kolageno ir elastino fluorescencija ima dominuoti žadinant 337 nm bangos ilgio spinduliuote (fluorescencijos smailės yra ties 395 nm ir 410 nm, atitinkamai). Kolageno fluorescencija siejama su skersiniais ryšiais – fermentų reguliuojamas skersinių ryšių (hidroksilizilpiridinolinas ir lizilpiridinolino) susidarymas [83-84], arba skersiniai ryšiai susidarę kaip glikacijos proceso galutiniai produktai dėl organizmo senėjimo procesų [85]. Be to, tam tikros chroninės ligos: diabetas, aterosklerozė ar reumatoidinis artritas yra siejamos su pakitimais suformuojant glikacijos proceso galutinius produktus, dalis kurių pasižymi savita fluorescencija [86-88]. Skirtingų tipų audiniams būdingas savitas kolageno kiekis, kuris organizmui senstant ar dėl kitų įvairių išorinių ir vidinių organizmo procesų mažėja, bei savitas kolagenų tipas. Identifikuotos kelios dešimtys skirtingų kolageno tipų, kurių dominavimas skirtingo tipo audiniuose yra skirtingas. Pavyzdžiui, odoje vyrauja I tipo fibrilinis kolagenas (sudaro iki 80 proc. kolageno dermoje). Apie 15 proc. fibrilinio kolageno dermoje yra III tipo kolagenas. Organizmui senstant I tipo kolageno kiekis mažėja ir ima dominuoti III tipo kolagenas. Šie kolageno tipai tarpusavyje skiriasi tik aminorūgščių seka [89]. Audinio tipas, įvairūs patologiniai procesai įtakoja skersinių ryšių susidarymą, o tai atsispindi fluorescencijos smailės padėties kitimu. Tokiu būdu kolageno ir elastino fluorescencija, kuri yra mažiau suprasta, tačiau panaši į kolageno [90], gali būti panaudojama audinio tipui identifikuoti arba įvairių epitelinio ar jungiamojo audinio pakitimų diagnostikai [91-93].

Ląstelės medžiagų apykaitoje dalyvaujantys piridininiai ir flavininiai nukleotidai (redukuotas nikotinamido adenindinukleotidas (NADH arba jo fosfatas NADPH), flavinadenindinukleotidas (FAD) ir flavino mononukleotidas (FMN)) yra savieji, viduląsteliniai ląstelės metabolinio aktyvumo bei mitochondrijos anomalijų, koreliuojančių su įvairiais patologiniais pakitimais,

organizmo senėjimo procesais bei kitomis ligomis, biomolekuliniai žymenys fluorescencinei diagnostikai [94-96]. NADH yra elektronų akceptorius ląstelės kvėpavimo grandinėje ir pagrinde lokalizuojasi ląstelės mitochondrijoje bei citoplazmoje. Šis piridino nukleotidas yra svarbus ląstelės metabolinių, redukcinių, antioksidacinių, organizmo senėjimo, ląstelės signalizavimo ir programuotos ląstelės žūties (apoptozės) procesų vyksmuose [53]. Šio kofermento fluorescencijos intensyvumas bei fluorescencijos gyvavimo trukmė stipriai priklauso nuo terpės savybių (poliškumo, klampumo). Pavyzdžiui, NADH susijungus su baltymu jo fluorescencijos gyvavimo trukmė ir fluorescencijos kvantinė išėiga išauga. NADPH (redukuotas nikotinamido dinukleotido fosfatas) taip pat dalyvauja ląstelės redukciniuose procesuose, ir jo fluorescencijos savyboms tapatūs NADH, t.y. žadinant 340 nm bangos ilgio spinduliuote fluorescencijos smailė stebima ties 460 nm. Flavininiams nukleotidams (FAD ir FMN) charakteringa dviejų smailių sugerties spektrų forma: FMN smailių padėtys ties 373 nm ir 445 nm, o FAD – ties 375 nm ir 450 nm. Tuo tarpu abiejų šių nukleotidų fluorescencijos spektre dominuoja viena smailė ties 525 nm bangos ilgiu. Susijungus su baltymu, flavinų fluorescencija yra veiksmingai gesinama. Be to, FMN fluorescencijos kvantinis našumas yra didesnis nei FAD dėl pastarojo fluorescencijos gesinimo adenino grupės. Pažymėtina, kad nikotinamidadenin dinukleotido (NAD) fluorescuoja tik jo redukuota forma - NADH, tuo tarpu flavinai fluorescuoja tik oksiduotos formos (FAD ne fluorescuojanti redukuota forma yra FADH₂). Kadangi tiek NADH, tiek ir FAD fluorescencijos smailės gerai atsiskiria spektre, šių biomolekulių fluorescencijos dėka galime sekti audinio metabolinės būklės pakitimus, susijusius su įvairiais biologiniais procesais (pvz., ląstelės oksidacinis stresas, uždegiminis procesas), pasitelkiant keičiamo žadinimo bangos ilgio savosios fluorescencijos registravimo sistemą ir nesutrikdant natūralios šių ląstelės kofermentų bioaplinkos [97]. Eksperimentiškai nustatyta, kad daugelio navikinių ir ikinavikinių darinių savoji fluorescencija mėlynoje spektro srityje yra silpnesnė nei sveiko audinio ir siejama su FAD ir NADH kiekių pokyčiu [98]. Nors ląstelės savųjų piridino nukleotidų fluorescencijos pokytis yra puikus viduląstelinis žymuo sekti ląstelės

metabolinių procesų eiga, tačiau NADH nėra idealus fluoroforas – per mažas sugerties skerspjūvis ir mažas kvantinis našumas, kas dažnu atveju komplikuoja NADH fluorescencijos signalo atskyrimą nuo foninio signalo.

Dar viena svarbi endogeninių fluoroforų grupė yra porfirinai (ypatingai protoporfirinas IX), kuriems charakteringa fluorescencija raudonoje spektro srityje [99]. Jau senai žinoma, kad nekrozinių navikinių darinių fluorescencija sąlygota porfirininės kilmės biomolekulių ir yra daugelio klinikinių fluorescencinės diagnostikos ar fotodinaminės terapijos sistemų pagrindas [92]. Įvairūs porfirinai, kaip pavyzdžiui, protoporfirinas, hematoporfirinas, koproporfirinas ar uroporfirinas yra tarpiniai hemoglobino, mioglobino ar citochromo biosintezės ciklo produktai [100]. Hemo biosintezės ciklo reguliacinių mechanizmų sutrikdymai, dėl tam tikrų fermentų, atsakingų už ciklo reguliavimą, veikos sutrikimų, gali ženkliai padidinti porfirinų kiekį audiniuose. Kai kurios ligos, kaip porfirija, tam tikros kraujo ligos, anemija, alkoholizmas ar tam tikros toksinės medžiagos (pvz., švinas) gali sąlygoti padidintą įvairių porfirinų kaupimąsi organizme [101]. Taip pat nustatyta, kad kai kurios bakterijos (pvz., *Propionibacterium acnes*, *Porphyromonas gingivalis* ir kt.) gali sintetinti didelius kiekius protoporfirino, todėl savosios fluorescencijos taikymas yra daug žadantis odos spuogų (aknės), burnos ar net dantų ligų diagnostikai [102-104].

Kadangi audinio savoji fluorescencija griežtai priklauso nuo biocheminių ir fizikocheminių audinio savybių, todėl skirtingų morfologinių ir citologinių savybių audiniai gali būti klasifikuojami remiantis savosios fluorescencijos spektrais. Įvairūs patologiniai procesai (uždegimai, pažaidos, displazijos ir kt.) sąlygoja metabolinius pokyčius, kurie veikia tam tikrų fluoroforų koncentraciją, o tai pakeičia savąją audinio fluorescenciją [105]. Nors biologinio objekto fluorescencijos braižo savitumams identifikuoti turime pakankamą įvairovę jo sandaros ir gyvybiniuose procesuose dalyvaujančių biomolekulių, tačiau dėl šių biomolekulių žadinimo ir emisijos spektrinių panašumų ir mažo kvantinio našumo universalios, praktiniams taikymams tinkamos sistemos sukonstravimas yra nelengvas uždavinys. Paprastai savosios fluorescencijos spektriniam ar vaizdiniam jautrumui padidinti, t.y. pakankamam optiniam kontrastui tarp sveiko ir navikinio

audinio užtikrinti, yra naudojamas selektyvus sužadinimas, parenkant optimalų vieną ar kelis sužadinimo bangos ilgius, tiriamojo objekto specifinių savitumų paieškai [106].

Pirmieji darbai, panaudojant savosios fluorescencijos metodą *in vivo* ir *ex vivo*, atlikti tiriant virškinamojo trakto nepiktybinius (hiperplastinis polipas), ikivėžinius (adenoma) ir vėžinius (karcinoma) gleivinės pokyčius [5,25,105-108]. Šie tyrimai pažymi, kad, priklausomai nuo spektrinio intervalo, kuriame stebime fluorescenciją, ir nuo žadinimui pasirinkto spinduliuotės bangos ilgio, intensyviausia fluorescencija gali būti normalaus audinio arba adenomos; tuo tarpu hiperplastinio polipo ir karcinomos fluorescencijos intensyvumas yra tarpe tarp jų. Andersson-Engels ir bendraautoriai [8] teigia, kad, žadinant ties 400 nm, sveiko audinio fluorescencija yra intensyvesnė 450-550 nm spektrinėje srityje, bet silpnesnė 600-700 nm srityje.

Savosios fluorescencijos metodus įprasta naudoti ankstyvai diagnostikai, kaip papildomą priemonę, greta su kitais medicininėje praktikoje taikomais diagnostikos būdais. Atlikti moksliniai tyrimai parodė, kad savosios fluorescencijos metodas yra perspektyvus diagnostikos būdas, kurį naudojant, galima tiksliai identifikuoti patologinius židinius ir sveikus audinius. Nors šis metodas suteikia daugiau diagnostikai svarbios informacijos, remiantis tiriamojo audinio spektrinių savitumų analize, nei įprastiniai metodai diagnozuojant ankstyvos stadijos vėžinius susirgimus, tačiau dažnai neužtikrina pakankamo fluorescencijos kontrasto tarp naviko ir sveiko audinio savosios fluorescencijos vaizdinimo tyrimuose. Pavyzdžiui, dėl optinio kontrasto stokos, savosios fluorescencijos metodas nėra patikimas diagnozuojant mažas gaubtinės žarnos adenomos pažaidas [109].

Sveiki ir pažeisti audiniai tiksliau identifikuojami, naudojant įvairius sensibilizatorius, kuriems būdingas selektyvus kaupimasis įvairių lokalizacijų navikiniuose dariniuose. Kadangi sensibilizatoriaus fluorescencijos intensyvumas yra objektyvus jo susikaupimo audiniuose rodiklis, registruojant fluorescencijos spektrus ar fluorescencijos vaizdus galima objektyviau lokalizuoti besiformuojančio navikinio darinio išplitimo ribas sveikų audinių aplinkoje.

1.5. Sensibilizuotos fluorescencijos taikymas navikų diagnostikoje

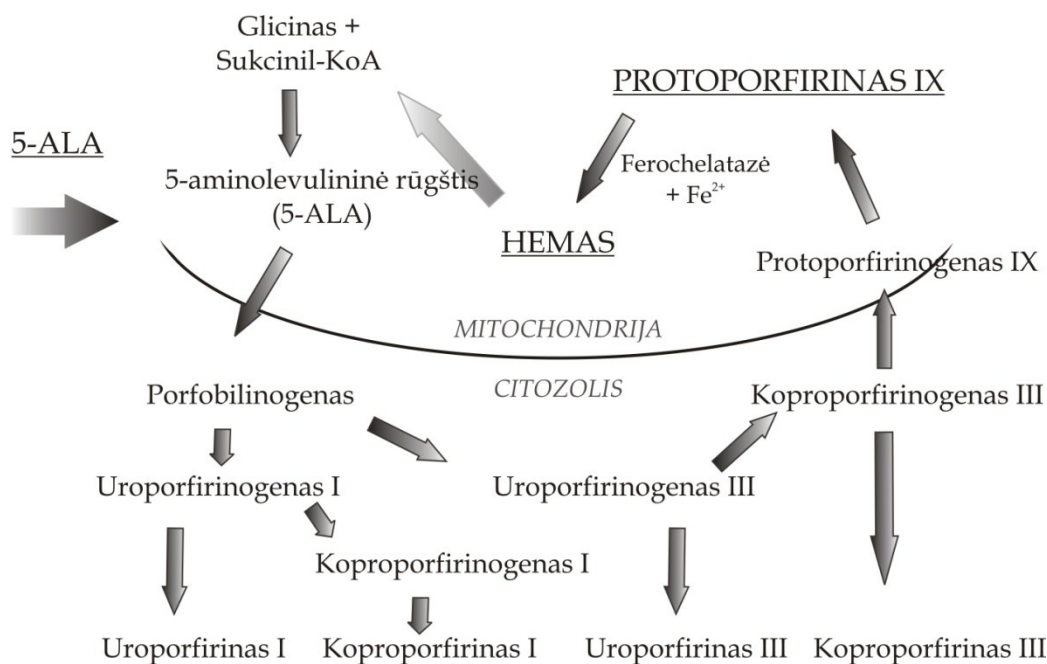
Metodas, kurio metu navikų fluorescencija sensibilizuojama (jautrinama) panaudojant selektyviai juose besikaupiančius egzogeninius fluoroforus, vadinamas sensibilizuotos fluorescencijos metodu. Tai vienas labiausiai tobulėjančių navikų diagnostikos ir gydymo metodų, pagrįstų biologinių audinių sensibilizacija specialiais organiniais junginiais. Sensibilizuotus audinius apšviečiant tam tikro bangos ilgio šviesa, galima sukelti jų nekrozę arba diagnostikos tikslais sužadinti naudojamo sensibilizatoriaus fluorescenciją, kurio signalas navikinio darinio srityje bus stipresnis nei greta esančio sveiko audinio dėl skirtingų sensibilizatoriaus kaupimosi savybių [110]. Sensibilizuotos fluorescencijos metodai įgalina stebėti sensibilizatoriaus kaupimąsi organizme po injekcijos [111-112], lokalizuoti navikinio darinio išplitimo ribas [113-114].

Daugybė įvairių dirbtiniu būdu susintetintų sensibilizatorių buvo testuojami tiek *in vivo*, tiek *in vitro* bei fotodinaminės navikų terapijos (FNT) eksperimentiniuose tyrimuose [115]. Daugeliui sensibilizatorių būdingas padidėjęs odos fotojautrumas, trunkantis nuo 4 iki 6 savaičių, ir silpna sugertis “terapinio lango” spektrinėje srityje (600-1200 nm). Sensibilizuota fluorescencija (kaip ir FNT) taip pat susijusi su galimais šalutiniais poveikiais, kuriuos gali sukelti paties vaisto, jo fotolizės arba audinio nekrozės produktų toksinis poveikis [51]. Siekdami sumažinti neigiamus veiksnius, mokslininkai ir medikai susitelkė ties natūraliai organizmuose aptinkamais porfirinais, imtos tyrinėti jų panaudojimo galimybės tiek fluorescencinės diagnostikos, tiek ir fotosensibilizuotos navikų terapijos reikmėms [116].

Atskira metodų grupė remiasi endogeninės kilmės vaisto – 5-aminolevulininės rūgšties (5-ALA) – injekcija ir jos pertekliaus sąlygote endogeninio sensibilizatoriaus – protoporfirino IX (PpIX) panaudojimu. 5-ALA ir PpIX yra natūralūs organizmo kraujo hemo biosintezės tarpiniai produktai, todėl navikai jautrinami nenaudojant egzogeninių preparatų, kurie dažnai sukelia šalutinį poveikį organizmui, bet sutrikdant natūralų hemo biosintezės ciklo reguliacijos mechanizmą.

Porfirinų sintezė ir metabolizmas vyksta kiekvienoje ląstelėje. Didžioji PpIX dalis yra susintetinama ląstelių mitochondrijose. Endogeniniai porfirinai svarbūs ląstelių, o taip pat ir organizmo gyvybinei veiklai palaikyti. Protoporfirino IX ir geležies (II) kompleksas (hemas), besijungdamas prie įvairių baltymų, sudaro tokias svarbias medžiagų apytakoje dalyvaujančias makromolekules kaip hemoglobinas, mioglobinas, citochromai, katalazė, peroksidazė.

Protoporfirinas IX yra tarpinis hemo biosintezės produktas [117-118]. 1.3 paveiksle pateiktas kraujo hemo biosintezės kelias bei jo eigoje susidarantys tarpiniai produktai. Pradiniame hemo biosintezės etape iš glicino ir sukcinil - kofermento - A sintetinama 5 - aminolevulininė rūgštis (5-ALA). Šią sintezę reguliuoja ląstelėse esantis hemo kiekis. Būtent 5-ALA atsakinga už tolesnes šio ciklo pakopas. Pradedant 5-ALA, toliau sintetinamas porfobilinogenas, uroporfirinogenas, koproporfirinogenas, protoporfirinogenas IX, protoporfirinas IX, hemas. Taigi, protoporfirinas IX yra paskutinysis tarpinis hemo biosintezės ciklo produktas.



1.3. pav. Kraujo hemo biosintezės ciklo schema

Ląstelėse esantis fermentas ferochelatazė paverčia PpIX molekulę į hemo molekulę, įterpdamas geležies atomą į porfirino žiedą. Kol kas geriausiai yra iširtas hemo biosintezės ciklas kepenyse, tačiau manoma, kad kiekviena

metaboliškai aktyvi organizmo ląstelė geba sintetinti PpIX. Sveikuose audiniuose šis ciklas yra griežtai kontroliuojamas, tad niekada neturime pakankamo PpIX kiekio audinių sensibilizacijai. Tuo tarpu navikinėms ląstelėms būdingas padidėjęs porfobilinogeno deaminazės kiekis, sumažėjęs geležies kiekis ir ferochelatazės aktyvumas - tai pagrindiniai veiksniai, sąlygojantys selektyvų 5-ALA-PpIX kaupimąsi šiose ląstelėse [47,117].

Hemo biosintezės ciklas gali būti sutrikdytas, pvz., organizmą paveikus pertekliniu 5-ALA kiekiu. Toks būdas naudojamas siekiant sukaupti navikiniuose audiniuose pakankamą klinikiniams tyrimams PpIX koncentraciją. Paveikus pertekliniu 5-ALA kiekiu, ne visas pasigaminęs PpIX paverčiamas hemu ir ląstelėse ima kauptis papildomas PpIX kiekis. Navikinis audinys sukaupia daugiau 5-ALA indukuojamo PpIX lyginant su greta esančiu sveiku audiniu. Remiantis koncentracijos skirtumu, galima atskirti sveiką audinį nuo navikinio. Eksperimentiniai tyrimai parodė, kad sveikas audinys, dengiantis kūno paviršių ar vidinius organus (pvz., epidermis, kvėpavimo takų ar virškinamojo trakto gleivinė), pagamina daugiau PpIX nei mezoderminės kilmės audinys (pvz., dermis, raumuo, kraujas ir indai) [110]. Autoriai [119] teigia, kad padidėjęs porfobilinogeno deaminazės kiekis ir sumažėjęs ferochelatazės aktyvumas būdingas audiniams, galintiems sukaupti didesnius PpIX kiekius. Tačiau sąryšis tarp fermentų aktyvumo ir susintetintų porfirinų koncentracijos skirtinguose audiniuose pasireiškia nevienodai. Atlikti *in vivo* tyrimai, stebint 5-aminolevulino rūgšties indukuoto PpIX susikaupimą skirtinguose audiniuose, parodė, kad registruoti fluorescencijos spektrai naviko, smegenų, šlapimo pūslės, kepenų, plaučių, raumens, kasos, blužnies, ir trachėjos audiniuose skyrėsi fluorescencijos signalo intensyvumu. Nustatyta, kad PpIX kaupimosi kinetikos priklauso nuo organo, pavyzdžiui, gaubiamojoje žarnoje, kepenyse, inkstuose, kasoje ir blužnyje PpIX fluorescencijos intensyvumas pasiekia maksimumą per pirmąją valandą, odoje – praėjus trimis valandoms, o navike – praėjus šešioms valandoms po 5-ALA injekcijos [110].

1.6. Fluorescencijos detekcijos sistemų konstravimo principai

Atsižvelgiant į sudėtingą biologinio objekto prigimtį, sukaupta nemaža patirtis konstruojant įvairias eksperimentines diagnostikos sistemas ir analizuojant įvairių biologinių objektų, ląstelių ar audinių lygmenyje, įvairių lokalizacijų piktybinių navikų ar eksperimentinių navikų modelių, fluorescencijos spektrinę bei vaizdinę informaciją [1]. Visų fluorescencijos detekcijos sistemų pagrindas yra šviesos šaltinis, kurio spinduliuojamas bangos ilgis (ar spektrinė sritis) turi atitikti tiriamų biomolekulių sugerties spektrą, ir detektorius, kuris detektuoja išspinduliuotą fluorescenciją. Registruojant fluorescencijos spektrus, spektro formos ir intensyvumo specifiniai skirtumai leidžia atpažinti audinio pokyčius, būdingus ankstyvųjų stadijų navikams, o detektuojant audinio fluorescencinį vaizdą, galima vizualiai patikslinti naviko išplitimo ribas greta esančiuose sveikuose audiniuose. Tos pačios audinio sritys gali būti tiriamos daug kartų, o tai itin patogiu vaizdinant audinių pažaidos išplitimo ribas bei nustatant optimalias vietas audinio mėginiams paimti vėlesniems histopatologiniams tyrimams.

Fluorescencinei diagnostikai naudojamas sistemas, atsižvelgiant į registravimo būdą, galima suskirstyti į:

- taškinio matavimo fluorescencinę sistemą (fluorescencijos spektrai registruojami iš tam tikrų nedidelių biologinio objekto sričių, dažniausiai pasitelkiant šviesolaidines skaidulas);
- fluorescencijos vaizdinimo sistemą (didelių audinio sričių fluorescencijos vaizdų registravimas, itin aktualus naviko riboms patikslinti ar naujiems dariniams aptikti didelėje apžvalgos srityje).

Taškinė fluorescencijos spektrų registravimo sistema - viena pirmųjų ir dažniausiai naudojamų sistemų biomedicinoje [2,120-121]. Tokią sistemą sudaro trys pagrindiniai elementai: žadinančios spinduliuotės šaltinis (lempinis spinduolis su atitinkamų filtrų rinkiniu ar monochromatoriumi žadinimo bangos ilgio derinimui, arba lazeris), šviesolaidis (ar šviesolaidinė pynė – daugelio optinių skaidulų sistema) žadinimo spinduliuotei nuvesti iki tiriamojo audinio srities ir fluorescencijos signalui surinkti bei detektorius, kuris paprastai yra valdomas

kompiuteriu, fluorescencijos informacijai kaupti ir apdoroti. Tokiose sistemose detektorius dažniausiai yra spektrometras ir daugiakanalis analizatorius, kurio pagrindas yra CCD kamera su tam tikro dydžio šviesai jautrių elementų matrica. Taškinės fluorescencinės diagnostikos sistemos dažniausiai naudojamos savosios fluorescencijos tyrimams arba sensibilizatoriaus koncentracijai navikiniame darinyje įvertinti bei palyginti su greta esančiu sveiku audiniu. Naudojant tokią sistemą, galima neinvaziniu ar minimaliai invaziniu būdu atlikti daug matavimų realiu laiku įvairiose audinio srityse bei nustatyti optimalias vietas audinių mėginiams paimti. Tai itin patogu atsižvelgiant ir į tai, kad ne visuomet daugelio biopsijų paėmimas yra pageidaujamas ar galimas. Remiantis sukauptų fluorescencijos duomenų analize, galima identifikuoti patologinius, fiziologinius ar morfologinius skirtumus tarp patologinio ir sveiko audinio bei pateikti diagnostinę išvadą.

Fluorescencijos spektrai gali būti registruojami panaudojant tik vieną žadinimo bangos ilgį, arba panaudojant keletą žadinimo bangos ilgių [122-124]. Bandinyje, kuriame yra tik vienos rūšies fluoroforų, iš esmės visa spektroskopinė informacija gali būti gauta registruojant fluorescencijos spektrą vieninteliam žadinimo bangos ilgiui arba registruojant fluorescencijos žadinimo spektrą tik vienam emisijos bangos ilgiui. Tačiau, tiriant audinį, turintį daug įvairių šviesą sugeriančių bei fluorescuojančių biomolekulių, kurių sugerties ir fluorescencijos spektrai persidengia tarpusavyje, spektroskopinėms savybėms apibūdinti būtina sukaupti fluorescencijos intensyvumų duomenis esant keletui žadinimo ir emisijos bangos ilgių, t.y. optimizuoti žadinimo bangos ilgį [125-126,127-129].

Naudojant fluorescencijos vaizdinimo sistemą, gaunama mažiau svarbios spektroskopinės informacijos apie tiriamą audinį, tačiau galima atlikti daug didesnių biologinių objektų vaizdinimą iš karto. Taip galime identifikuoti naujus pavienius navikinio darinio židinius didelėje apžvalgos erdvėje ar patikslinti naviko išplitimo ribas operacijos metu [130-132]. Fluorescencijos vaizdinimo sistemose taip pat gali būti panaudojami vienas ar keletas skirtingų žadinimo bangos ilgių. Atitinkamai detekcijos kanale parenkami žadinimo atkirtimo filtrai (vienas ar keli),

kurie diagnostiniu požiūriu yra svarbūs. Pažymėtina, kad būtent taškine sistema leidžia identifikuoti tas svarbias spektrines sritis pažaidų identifikavimui.

Taškine sistema galime surinkti spektroskopinę informaciją apie mažą audinio paviršių (paprastai apspręstą naudojamą optinės skaidulos skersmens), kuri stipriai priklauso nuo pasirinktos vietos, t.y. turime pasirinkti keletą audinio sričių, norint įvertinti navikinio darinio ar pažaidos išplitimo ribą sveikų audinių fone. Tuo tarpu spektroskopiniu požiūriu mažiau naudingos informacijos teikiantis fluorescencijos vaizdinimas suteikia vizualinei apžiūrai ir pažaidos kontūro identifikavimui būtinos informacijos išsyk. Būtent šių dviejų sistemų kombinacija atitinka universalią diagnostinę sistemą praktinėms medicinos reikmėms [133-135].

Be paminėtos nuostovios fluorescencijos metodikos, galima naudoti ir laikinės skyros fluorescencijos metodą, ypač tinkantį endogeniniams fluoroforams identifikuoti [8,53]. Šiuo atveju, apibūdinant tiriamą audinį, informacijos suteikia ne tik fluorescencijos spektro formos pokyčiai, bet ir fluoroforo sužadintos būsenos gyvavimo trukmė. Eksperimentiškai nustatyta, kad, registruojant fluorescencijos intensyvumo gesimo kinetikas, audinio endogeninių fluoroforų fluorescencijos gyvavimo trukmės skiriasi - gyvavimo trukmės siekia nuo sub-pikosekundžių iki mikrosekundžių [136-138].

1.7. Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Fluorescenciniai diagnostikos metodai pasižymi dideliu jautrumu ir specifiškumu identifikuojant pagrindinius audinio savitumus, tokius kaip ląstelės (audinio) metabolinio aktyvumo sutrikimai, įvairūs morfologiniai pakitimai, kurie dažnu atveju koreliuoja su individualia klinicine problema. Nepaisant daugybės įvairių naudojamų techninių ir metodinių sprendimų gimsta naujos inovatyvios idėjos ir atitinkamai tobulinamos fluorescencinės diagnostinės sistemos [139-140]. Šiai dienai galime vaizdinti viduląstelinius vyksmus ar net vienoje ląstelėje vykstančių biocheminių procesų eigą [141-143].

Nors fluorescenciniai metodai labiau orientuoti į audinio paviršiaus savitumų paiešką, tačiau yra patrauklūs, nes lengvai adaptuojami įvairiems medicininiam prietaisams (endoskopams, chirurginiam mikroskopui). Dėka savo neinvazinio pobūdžio, leidžia padidinti diagnostikos (ar gydymo) potencialą bei sumažina komplikacijų riziką. Surinkta spektroskopinė informacija tarnauja kaip unikali pagalbinė priemonė nusakant audinio morfologinę ar fiziologinę būseną realiu laiku, įgalina patikslinti šalinamo darinio apimtį operacijos metu, ja vadovaujamosi audinio biopsijų parinkime (arba neretai eliminuoja būtinybę imti biopsiją), o taip pat gali būti sėkmingai panaudota stebėti audinio atsaką terapinio gydymo efektyvumo kontrolei.

Atliktų klinikinių tyrimų gausa vertinant metodo tinkamumą tiriant skirtingus audinius rodo, kad šis metodas yra labai plačiai taikomas, o naudojama diagnostinė priemonė yra įvairiapusė. Įvairiapusiškumas pasireiškia tiek žadinimo, tiek ir emisijos bangos ilgių parinkimu, zondo (optinės skaidulos) geometrinių sprendimų gausa, bei analizės būdų parinkimo spektrinei (vaizdinei) informacijai apdoroti [10]. Kadangi šis metodas leidžia identifikuoti navikinį darinį sveikų audinių fone neinvaziškai ir realiu laiku, jis sėkmingai yra panaudojamas naviko ribų patikslinimui operacijos metu, pvz., galvos smegenų navikų chirurgija, arba yra naudojamas įvairių ankstyvųjų audinio pakitimų diagnostikai, pvz., iki aterosklerotinių pakitimų kraujagyslės sienelėje spektrinių savitumų paiešką.

1.8. Literatūra

1. R.R.Richards-Kortum, E.Sevick-Muraca, Quantitative optical spectroscopy, *Annu Rev Phys Chem* 47:555-606 (1996)
2. G.A.Wagnieres, W.M.Star, B.C.Wilson, In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications, *Photochem Photobiol* 68:603-632 (1998)
3. I.J.Bigio, J.R.Mourant, Ultraviolet and visible spectroscopies for tissue diagnostics: fluorescence spectroscopy and elastic-scattering spectroscopy, *Phys Med Biol* 42:803-814 (1997)
4. G.Bottiroli, A.C.Croce, D.Locatelli, R.Marchesini, E.Pignoli, S.Tomatis, C.Cuzzoni, S. Di Palma, M.Dalfante, P.Spineli, Natural fluorescence of normal and neoplastic human colon:a comprehensive „Ex vivo“ study, *Lasers Surg Med* 16:48-60 (1995)
5. C.R.Kapadia, F.W.Cutruzzola, K.M.O'Brien, M.L.Stetz, R.Enriquez, L.I.Deckelbaum, Laser-induced fluorescence spectroscopy of human colonic mucosa. Detection of adenomatous transformation, *Gastroenterology* 99:150-157 (1990)
6. K.T.Schomacker, J.K.Frisoli, C.C.Compton, T.J.Flotte, J.M.Richter, N.S.Nishioka, T.F.Deutsch, Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential, *Lasers Surg Med* 12:63-78 (1992)
7. R.Drezek, C.Brookner, I.Pavlova, I.Boiko, A.Malpica, R.Lotan, M.Follen, R.Richards-Kortum, Autofluorescence microscopy of fresh cervical-tissue sections reveals alterations in tissue biochemistry with dysplasia, *Photochem Photobiol* 73(6):636-41 (2001)
8. S.Anderson-Engels, C. af Klintenberg, K.Svanberg, S.Svanberg, In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics, *Phys Med Biol* 42:815-24 (1997)
9. S.Lam, C.MacAulay, J.Hung, J.LeRiche, A.E.Profio, B.Palcic, Detection of dysplasia and carcinoma in situ with lung imaging fluorescence endoscope device, *J Thorac Cardiovasc Surg* 105(6):1035-1040 (1993)
10. N.Ramanujam, Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues, *Neoplasia* 2:89-117 (2000)
11. B.Valeur, *Molecular fluorescence: principles and applications*, Willey-VCH Verlag GmbH, 2001
12. R.Ackroyd, C.Kelty, N.Brown, M.Reed, The history of photodetection and photodynamic therapy, *Photochem Photobiol* 74(5):656-669 (2001)
13. H.Stübel, Die Fluoreszenz tierischer Gewebe in ultravioletten Licht, *Pflügers Arch Physiol* 142: 1 (1911)
14. A.Policard, Etude sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la luminere de Wood, *C R Soc Biol* 91:1423-1424 (1924)
15. C.J.Sutro, M.S.Burman, Examination of pathogenic tissue by filtered ultraviolet radiation, *Arch Pathol* 16:346-50 (1933)
16. F.Ronchese, The fluorescence of cancer under the Wood light, *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 7:967-971 (1954)
17. R.C.Benson, R.A.Meyer, M.E.Kabura, G.M.McKhann, Cellular autofluorescence – is it due to flavins, *J Histochem Cytochem* 27:44-48 (1979)
18. B.Chance, P.Cohen, F.Jöbsis, B.Schoener, Intracellular oxidation-reduction states in vivo, *Science* 147:499-508 (1962)
19. L.Laifer, K.O'Brien, M.Stetz, G.Gindi, G T. arrand, L.Deckelbaum, Biochemical basis for the difference between normal and atherosclerotic arterial fluorescence, *Circulation* 80:1893-1901 (1988)
20. I.J.Rampil, L.Litt, A.Mayevsky, Correlated, simultaneous, multiple-wavelength optical monitoring in vivo of localized cerebrocortical NADH and brain microvessel hemoglobin oxygen saturarion, *J Clin Monit* 8:216–25 (1992)
21. R.R.Alfano, D.B.Tata, J.Cordero, P.Tomashefsky, F.Longo, M.Alfano, Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue, *IEEE J Quant Elektron* 20(12):1507-1511 (1984)

22. R.R.Alfano, A.Pradhan, G.C.Tang, Optical spectroscopic diagnosis of cancer and normal breast tissues, *J Opt Soc Am B* 6(5):1015-1023 (1989)
23. A.E.Profio, O.J.Balchum, Fluorescence diagnosis of cancer, *Adv Exp Med Biol* 193:43–50 (1985)
24. S.Andersson-Engels, B.C.Wilson, In vivo fluorescence in clinical oncology: fundamental and practical issues, *J Cell Pharmacol* 3:48-61 (1992)
25. R.M.Cothren, R.R.Kortum, M.V.Sivak, M.Fitzmaurice, R.P.Rava, G.A.Boyce, M.Doxtader, R.Blackman, T.B.Ivanc, G.B.Hayes, M.S.Feld, R.E.Petras, Gastrointestinal tissue diagnosis by laser-induced fluorescence spectroscopy at endoscopy, *Gastrointest Endosc* 36(2):105-111 (1990)
26. J.Hung, S.Lam, J.C.LeRiche, B.Palcic, Autofluorescence of normal and malignant bronchial tissue, *Lasers Surg Med* 11:99-105 (1991)
27. P.G.Cordeiro, R.E.Kirschner, Q.Y.Hu, J.J.C.Chiao, H.Savame, R.R.Alfano, L.A.Hoffman, D.A.Hidalgo, Ultraviolet excitation fluorescence spectroscopy: a noninvasive method for the measurement of redox changes in ischemic myocutaneous flaps, *Plast Reconstr Surg* 96:673-680 (1995)
28. I.Georgakoudi, B.C.Jacobson, M.G.Muler, E.E.Sheets, K.Badizadegan, D.L.Carr-Locke, C.P.Crum, C.W.Boone, R.R.Dasari, J.Van Dam, M.S.Feld, NAD(P)H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes, *Cancer Res* 62:682-687 (2002)
29. M.Tamura, O.Hazeki, S.Nioka, B.Chance, In vivo study of tissue oxygen metabolism using optical and nuclear resonance spectroscopies, *Ann Rev Physiol* 51:813-834 (1989)
30. M.Perk, G.J.Flynn, C.Smith, B.Bathgate, J.Tulip, W.Yue, A.Lucas, Laser-induced fluorescence emission: I. The spectroscopic identification of fibrotic endocardium and myocardium, *Lasers Surg Med* 11:523-534 (1991)
31. R.Richards-Kortum, A.Mehta, G.Hayes, R.Cothren, T.Kolubayev, C.Kitrell, N.B.Ratliff, J.R.Kramer, M.S.Feld, Spectral diagnosis of atherosclerosis using an optical fiber laser catheter, *Am Heart J* 118:381–91 (1989)
32. H.Auler, G.Banzer, Untersuchungen unter die Rolle der Porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren, *Z Krebsforsch* 53:65-68 (1942)
33. B.Palcic, S.Lam, J.Hung, C.MacAulay, Detection and localization of early lung cancer by imaging techniques, *Chest* 99:742-743 (1991)
34. S.Takehana, M.Kaneko, H.Mizuno, Endoscopic diagnostic system using autofluorescence, *Diagnost Therap Endosc* 5:59-63 (1999)
35. H.Zeng, A.Weiss, C.E.MacAulay, N.MacKinnon, R.Cline, R.Dawson, Development of a fluorescence video endoscopy imaging system for the early detection of cancer in the gastrointestinal tract, *SPIE* 2976:291-296 (1997)
36. D.E.J.G.J.Dolmans, D.Fukumura, R.K.Jain, Photodynamic therapy for cancer, *Nature* 3:380-386 (2003)
37. F.H.J.Figge, Near-ultraviolet rays and fluorescence phenomenon as aids to discovery and diagnosis in medicine, *Univ Md Med Bull* 26:165-176 (1945)
38. J.R.Leonard, W.L.Beck, Hematoporphyrin fluorescence: an aid in diagnosis of malignant neoplasms, *Laryngoscope* 81:365-372 (1971)
39. F.H.J.Figge, G.S.Weiland, L.A.Manganiello, Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins, *Proc Soc Exp Biol Med* 68:640-641 (1948)
40. L.O.J.Manganiello, F.H.J.Figge, Cancer detection and therapy II: Methods of preparation and biological effects of metalloporphyrins, *Bull School Med Univ Maryland* 36:3-7 (1951)
41. D.S.Rassmussen-Taxdal, G.E.Ward, F.H.J.Figge, Fluorescence of human lymphatic and cancer tissues following high doses of intravenous hematoporphyrin, *Cancer* 8:78-81 (1955)
42. R.L.Lipson, E.J.Baldes, A.M.Olsen, The use of derivative of haematoporphyrin in tumour detection, *J Natl Cancer Inst* 26:1-11 (1961)
43. R.L.Lipson, M.J.Gray, E.J.Baldes, Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer, *Cancer* 20:2255-2257 (1967)

44. G.E.Moore, W.T.Plyton, L.A.French, W.W.Walker, The clinical use of fluoresceine in neurosurgery, *J Neurosurg* 5:392-398 (1948)
45. Z.Malik, H.Lugaci, Destruction of erythroleukaemic cells by photoinactivation of endogenous porphyrins, *Br J Cancer* 56:589-95 (1987)
46. J.C.Kennedy, R.H.Pottier, D.C.Pross, Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience, *J Photochem Photobiol B: Biol* 6:143-148 (1990)
47. B.W.Henderson, L.Vaughan, D.A.Bellnier, H. van Leengoed, P.G.Johnson, A.R.Oseroff, Photosensitization of murine tumor, vasculature and skin by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin, *Photochem Photobiol* 62 (4):780-789 (1995)
48. C.Eker, S.Montan, E.Jaramillo, K.Koizumi, C.Rubio, S.Andersson-Engels, K.Svanberg, S.Svanberg, P.Slezak, Clinical spectral characterization of colonic mucosal lesions using autofluorescence and δ aminolevulinic acid sensitisation, *Gut* 44: 511-518 (1999)
49. Q.Peng, K.Berg, J.Moan, M.Kongshaug, J.M.Nesland, 5-aminolevulinic acid – based photodynamic therapy: principles and experimental research, *Photochem Photobiol* 65:235-251 (1997)
50. M.M.H.El-Sharabasy, A.M.El-Wassel, S.A.Hafez, Porphyrin metabolism in some malignant diseases, *Br J Cancer* 65:409-412 (1992)
51. R.R.Alison, G.H.Downie, R.Cuenca, H.Xin-Hua, C.J.H.Childs, C.Sibata, Photosensitizers in clinical PDT, *Photodiag Photodynam Therap* 1:27-42 (2004)
52. Ю.А.Владимиров, А.Я.Потапенко, Физико-химические основы фотобиологических процессов, (Москва, Высш. шк.) (1989)
53. J.R.Lakowicz, Principles of fluorescence spectroscopy, 3rd ed. Berlin: Springer, 2006
54. B.Nickel, From the Perrin diagram to the Jablonski diagram (Part I), *EPA Newsletter* 58:9-38 (1996)
55. B.Nickel, From the Perrin diagram to the Jablonski diagram (Part II), *EPA Newsletter* 61:27-60 (1997)
56. W.-F.Cheong, S.A.Prahl, A.J.Welch, A review of the optical properties of biological tissues, *IEEE J Qu Electron* QE-26:2166-2185 (1990)
57. E.Kohen, R.Santus, J.G.Hirschberg, *Photobiology*, Academic Press Inc, San Diego, (1995)
58. J.L.Boulnois, Photophysical processes in recent medical laser developments: a review, *Lasers Med Sci* 1:47-66 (1986)
59. M.H.Niemz, *Laser-tissue interactions: Fundamentals and applications*, Third Editon, Springer, Germany, (2004)
60. R.Marchesini, A.Bartoni, S.Andeola, E.Melloni, A.E.Sichirollo, Extinction and absorption coefficients and scattering phase functions of human tissues, *Appl Optics* 28:2318-2324 (1989)
61. J.R.Mourant, M.Canpolat, C.Brocket, O.E.Ramos, T.M.Johnson, A.Matanock, K.Setter, J.P.Freyer, Light scattering from cells: the contribution of the nucleus and the effects of proliferative status, *J Biomed Opt* 5:131-137 (2000)
62. G.Zonios, L. T.Perelman, V.Backman, R.Manoharan, M.Fitzmaurice, J.Van Dam, M.S.Feld, Diffuse reflectance spectroscopy of human adenomatous colon polyps in vivo, *Appl Opt* 38:6628– 6637 (1999)
63. Y.L.Kim, Y.Liu, R.K.Wali, H.K.Roy, M.J.Goldgerg, A.K.Kromin, K.Chen, V.Backman, Simultaneous measurement of angular and spectral properties of light scattering for characterization of tissue microarchitecture and its alteration in early precancers, *IEEE J of Selected Topics in Quantum Electron* 9(2):243-255 (2003)
64. J.R.Mourant, A.H.Hielscher, A.A.Eick, T.M.Johnson, J.P.Greyer, Evidence of intrinsic differences in the light scattering properties of tumorigenic and nontumorigenic cells, *Cancer Cytopath* 84:366-74 (1998)
65. A.Vogel, V.Venugopalan, Mechanisms of pulsed laser ablation of biological tissues, *Chem Rev* 103:577-644 (2003)
66. T.Vo-Dinh, *Biomedical photonics handbook*, Boca Raton: CRC Press LLC, 2003

67. S.J.Matcher, C.E.Elwell, C.C.E.cooper, M.Cope, D.T.Delpy, Performance comparison of several published tissue near-infrared spectroscopy algorithms, *Anal Biochem* 227:54-68 (1995)
68. D.Freifelder, *Physical biochemistry: applications to biochemistry and molecular biology*, 2nd ed., W.H. Freeman, New York, 1982
69. B.C.Wilson, S.L.Jacques, Optical reflectance and transmittance of tissues: principles and applications, *IEEE J.Quantum Electron* 26(12):2186-99 (1990)
70. D.Malonek, A.Grinvald, Interactions between electrical activity and cortical microcirculation revealed by imaging spectroscopy: implications for functional brain mapping, *Science* 272:551-554 (1996)
71. R.R.Anderson, J.A.Parrish, Selective photothermolysis: precise microsurgery by selective absorption of pulsed radiation, *Sci* 220(4596):524-527 (1983)
72. J.Eichler, J.Knof, H.Lenz, Measurements on the depth of penetration of light (0.35-1.0 μm) in tissue, *Radiat Environ Biophys* 14:239-242 (1977)
73. J.Wu, M.S.Feld, P.R., Rava Analytical model for extracting intrinsic fluorescence in turbid media, *Appl Optics* 32:3585-3595 (1993)
74. R.Graaff, A.C.M.Dassel, M.H.Koelink, F.F.M. de Mul, J.G.Aarnoudse, W.G.Zijlstra, Optical properties of human dermis in vitro and in vivo, *Appl Opt* 32:435-447 (1993)
75. B.C.Wilson, W.P.Jeeves, D.M.Lowe, In vivo and post-mortem measurements of the attenuation spectra of light in mammalian tissues, *Photochem Photobiol* 42:153-162 (1985)
76. A.Roggan, D.Schädel, U.Netz, J.-P.Ritz, C.-T.Germer, G.Müller, The effect of preparation technique on the optical parameters of biological tissue, *Appl Phys B* 69:445-453 (1999)
77. R.R.Alfano, G.C.Tang, A.Pradhan, W.Lam, D.S.Choy, E.Opher, Fluorescence spectra from cancerous and normal breast and lung tissues, *IEEE J Quantum Electron* 10:1906-11 (1987)
78. K.Koenig, H.Schneckenburger, Laser-Induced autofluorescence for medical diagnosis, *J of Fluoresc* 44:17-40 (1994)
79. P.S.Andersson, E.Kjellen, S.Montan, K.Svanberg, S.Svanberg, Autofluorescence of various rodent tissues and human skin tumors samples, *Lasers Med Sci* 2:41-49 (1987)
80. G.Weagle, P.E.Paterson, J.Kennedy, R.Pottier, The nature of the chromophore responsible for naturally occurring fluorescence in mouse skin, *J Photochem Photobiol B: Biol* 2:313-320 (1988)
81. E.W.J. Van der Breggen, A.I.Rem, M.M.Christian, C.H.J.Yang, K.H.Calhoun, H.J.C.M.Sterenborg, M.Motamedi, Spectroscopic detection of oral and skin tissue transformation in a model for squamous cell carcinoma: autofluorescence versus systemic aminolevulinic acid-induced fluorescence, *IEEE J Selected Topics in Quant Electron* 2(4):997-1006 (1996)
82. J.Haringsma, G.N.J.Tytgat, Fluorescence and autofluorescence, *Bailliere's Clinical Gastroenterol* 13(I):1-10 (1999)
83. D.Fujimoto, K.Akiba, N.Nakamura, Isolation and characterization of a fluorescent material in bovine achilles tendon collagen, *Biochem Biophys Res Commun* 76(4):1124-1129 (1977)
84. D.R.Eyre, M.A.Paz, P.M.Gallop, Cross-linking in collagen and elastin, *Annu Rev Biochem* 53:717-748 (1984)
85. A.J.Bailey, R.G.Paul, L.Knott, Mechanisms of maturation and ageing of collagen, *Mech Ageing Dev* 106(1-2):1-56 (1998)
86. D.G.Dyer, J.A.Dunn, S.R.Thorpe, K.E.Bailie, I.J.Lyons, D.R.McCance, J.W.Baynes, Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and ageing, *J Clin Invest* 91:2463-2469 (1993)
87. H.Hoshino, M.Takahashi, K.Kushida, T.Ohishi, K.Kawata, T.Inoue, Quantitation of the crosslinks, pyridinoline, deoxypyridinoline and pentosidine in human aorta with dystrophic calcification, *Atherosclerosis* 112:39-46 (1995)

88. J.R.Chen, M.Takahashi, M.Suzuki, K.Kushida, S.Miyamoto, T.Inoue, Comparison of the concentrations of pentosidine in the synovial fluid, serum and urine of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis, *Rheumatology (Oxford)* 38:1275-1278 (1999)
89. C.R.Lovell, K.A.Smolenski, V.C.Duance, N.D.Light, S.Young, M.Dyson, Type I and III collagen content and fibre distribution in normal human skin during aging, *Br J Dermatol* 117:419-428 (1987)
90. D.P.Thornhill, Separation of a series of chromophores and fluorophores present in elastin, *Biochem J* 14(7):215-219 (1975)
91. C.J.McIntosh, P.F.Davis, P.A.Ryan, W.E.Stehbens, Urinary excretion of connective tissue protein markers in arterial disease, *Angiology* 40:814-817 (1989)
92. P.J.Stone, Potential use of collagen and elastin degradation markers for monitoring liver fibrosis in schistosomiasis, *Acta Trop* 77(1):97-99 (2000)
93. N.Kollia, R.Gillies, M.Moran, I.E.Kochevar, R.R.Anderson, Endogenous skin fluorescence includes bands that may serve as quantitative markers of aging and photoaging, *J Invest Dermatol* 111(5):776-780 (1998)
94. B.Chance, Pyridine nucleotide as an indicator of the oxygen requirements for energy-linked functions of mitochondria, *Circ Res* 38:31-38, (1976)
95. R.C.Benson, R.A.Meyer, M.E.Zabura, G.M.McKhann, Cellular autofluorescence – is it due to flavins?, *Histochem Cytochem* 27:44-48 (1979)
96. A.A.Heikal, Intracellular coenzymes as natural biomarkers for metabolic activities and mitochondrial anomalies, *Biomark Med* 4(2):241-263 (2010)
97. S.Thomsen, D.Tatman, Physiological and pathological factors of human breast disease that can influence optical diagnosis, *Ann NY Acad Sci* 838:171-193 (1998)
98. W.Lohmann, J.Mussmann, C.Lohmann, W.Künzel, Native fluorescence of the cervix uteri as a marker for dysplasia and invasive carcinoma, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 31:249-253 (1989)
99. F.N.Ghadially, W.J.P.Neish, Porphyrin fluorescence of experimentally produced squamous cell carcinoma, *Nature* 188:1124-1224 (1960)
100. R.S.Ajioka, J.D.Phillips, J.P.Kushmer, Biosynthesis of heme in mammals, *Biochimica et Biophysica Acta* 1763:723-736 (2006)
101. W.E.Daniell, H.L.Stockbridge, R.F.Labbe, J.S.Woods, K.E.Anderson, D.M.Bissell, J.R.Bloomer, R.D.Ellefson, M.R.Moore, C.A.Pierach, W.E.Schreiber, A.Tefferi, G.M.Franklin, Environmental chemical exposures and disturbances of heme synthesis, *Environ Health Perspect*, 105(1), 37-53 (1997)
102. H.N.Shah, R.Bonnet, B.Mateen, R.A.D.Williams, The porphyrin pigmentation of subspecies of bacteroides melaninogenicus, *J Biochem* 180, 45-50 (1979)
103. C.E.Cornelius, G.D.Ludwig, Red fluorescence of comedones: production of porphyrins by *Corynebacterium acnes*, *J Invest Derm* 49:368-370 (1967)
104. K.Konig, G.Flemming, R.Hibst, Laser-induced autofluorescence spectroscopy of dental caries, *Cell Mol Biol* 44(8):1293-1300 (1998)
105. R.Marchesini, M.Brambilla, E.Pignoli, G.Bottiroli, A.C.Croce, M.D.Fante, P.Spinelli, S. di Palma, Light-induced fluorescence spectroscopy of adenomas, adenocarcinomas and non-neoplastic mucosa in human colon I. In vitro measurements, *J Photochem Photobiol B* 14:219-230 (1992)
106. T.D.Wang, J.Van Dam, J.M.Crawford, E.A.Preisinger, Y.Wang, M.S.Feld, Fluorescence endoscopic imaging of human colonic adenomas, *Gastroenterol* 111(5):1182-91 (1996)
107. K.T.Schomacker, J.K.Frisoli, C.C.Compton, T.J.Flotté, J.M.Richter, T.F.Deutsch, N.S.Nishioka, Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic polyps, *Gastroenterol* 102:001-005 (1992)
108. R.M.Cothren, M.V.Sivak, J. Van Dam, R.E.Petras, M.Fitzmaurice, J.M.Crawford, J.Wu, J.F.Brennan, R.P.Rava, R.Manoharan, M.S.Feld, Detection of dysplasia at colonoscopy using laser-induced fluorescence: a blinded study, *Gastrointest Endosc* 44(2):168-76 (1996)

109. K.Orth, D.Russ, R.Steiner, H.G.Beger, Fluorescence detection of small gastrointestinal tumours: principles, technique, first clinical experience, *Langenbeck's Arch Surg* 385:488-494 (2000)
110. J. Van den Boogert, R. van Hillegersberg, F. W. de Rooij, R.W. de Bruin, A.E.-Bosdijk, A.B.Houtsmuller, P.D.Siersema, J.H.Wilson, H.W.Tilanus, 5-Aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX accumulation in tissues: pharmacokinetics after oral or intravenous administration, *J Photochem Photobiol B: Biol* 44:29-38 (1998)
111. C.S.Loh, D.Vernon, A.J.MacRobert, J.Bedwell, S.G.Bown, S.B.Brown, Endogenous porphyrin distribution induced by 5-aminolevulinic acid in the tissue layers of the gastrointestinal tract, *J Photochem Photobiol B: Biol* 20:47-54 (1993)
112. I.Wang, L.P.Clemente, R.M.Pratas, E.Cardoso, M.P.Clemente, S.Montan, S.Svanberg, K.Svanberg, Fluorescence diagnostics and kinetics in the head and neck region utilizing low-dose δ -aminolevulinic acid sensitization, *Cancer Letters* 135:11-19 (1999)
113. H.J.C.M.Sterenborg, M.Motamedi, R.F.Wagner, M.Duvic, S.Thomsen, S.L.Jacques, In vivo fluorescence spectroscopy and imaging of human skin tumours, *Lasers Med Sci* 9:191-201 (1994)
114. W.Stummer, S. S.tocker, S.Wagner, H.Stepp, C.Fritsch, C.Goetz, A.E.Goetz, R.Kiefmann, H.J.Reulen, Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence, *Neurosurg* 42(3):519-526 (1998)
115. F.S. de Rosa, M.V.L.B.Bentley, Photodynamic therapy of skin cancers: sensitizers, clinical studies and future directives, *Pharmaceutical Research* 17(12):1147-1454 (2000)
116. S.A.Friesen, G.O.Hjortland, S. J.Madsen, H.Hirschberg, O.Engebråten, J.M.Nesland, Q.Peng, 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic detection and therapy of brain tumors (Review), *Int J Oncol* 21:577-582 (2002)
117. R.Cubeddu, C G.anti, P.Taroni, G.Valentini, Study of porphyrin fluorescence in tissue samples of tumour – bearing mice, *J Photochem Photobiol B: Biol* 29:171-178 (1995)
118. J.P.Celli, B.Q.Spring, C.L.Evans, K.S.Samkoe, S.Verma, B.W.Pogue, T.Hasan, Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization, *Chem Rev* 110:2795-2838 (2010)
119. B.Krammer, K.Uberrieglner, In vitro investigation of ALA-induced protoporphyrin IX, *J Photochem Photobiol B: Biol* 36:121-126 (1996)
120. S.A.-Engels, A.Elner, J.Johansson, S.-E.Karlsson, L.G.Salford, L.-G.Stromblad, K.Svanberg, S.Svanberg, Clinical recording of laser-induced fluorescence spectra for evaluation of tumour demarcation feasibility in selected clinical specialities, *Lasers Med Sci* 6(4):415-424 (1991)
121. C.A.Klinteberg, M.Andreasson, O.Sandstrom, S.Andersson-Engels, S.Svanberg, Compact medical fluorosensor for minimally invasive tissue characterisation, *Review of Sci Instrum* 76(3):034303-034306 (2005)
122. M.Sinaasappel, H.J.C.M.Sterenborg, Quantification of the hematoporphyrin derivative by fluorescence measurement using dual-wavelength excitation and dual-wavelength detection, *Appl Opt* 32(4):541-548 (1993)
123. W.Zheng, W.Lau, C.Cheng, K.C.Soo, M.Olivo, Optimal excitation-emission wavelengths for autofluorescence diagnosis of bladder tumors, *Int J Cancer* 104:477-481 (2003)
124. B.-H.Li, S.-S.Xie, Autofluorescence excitation-emission matrices for diagnosis of colonic cancer, *World J Gastroenterol* 11(25):3931-3934 (2005)
125. M.Anidjar, D.Ettori, O.Cussenot, P.Meria, F.Desgrandchamps, A.Cortesse, P.Teillac, A.deDuc, S.Avrillier, Laser induced autofluorescence diagnosis of bladder tumours: dependence on the excitation wavelength, *J Urology* 156(5):1590-1596 (1996)
126. L.M.A.Crane, G.Themelis, R.F.Pleijhuis, N.J.Harlaar, et al., Intraoperative multispectral fluorescence imaging for the detection of the sentinel lymph node in cervical cancer: a novel concept, *Molecular imaging and Biology* 13(5):1043-1049 (2011)
127. R.S.DaCosta, H.Andersson, B.C.Wilson, Molecular fluorescence excitation-emission matrices relevant to tissue spectroscopy, *Photochem Photobiol* 78(4):384-392 (2003)
128. D.L.Heintzelman, U.Utzinger, H.Fuchs, A.Zuluaga, K.Gossage, A.M.Gillenwater, R.Jacob, B.Kemp, R.R.Richards-Kortum, Optimal excitation wavelengths for in vivo

- detection of oral neoplasia using fluorescence spectroscopy, *Photochem Photobiol* 72(1):103-113 (2000)
129. R.A.Zangaro, L.Silveira, R.Manoharan, G.Zonios, I.Itzkan, R.R.Dasari, J.Van Dam, M.S.Feld, Rapid multiexcitation fluorescence spectroscopy system for in vivo tissue diagnosis, *Appl Opt* 35(25):5211-5219 (1996)
 130. W.S.Poon, K.T.Schmacker, T.F.Deutsch, R.L.Martuza, Laser-induced fluorescence: experimental intraoperative delineation of tumor resection margins, *J Neurosurg* 76:679-686 (1992)
 131. K.J.Brodbeck, A.E.Profio, T.Frewin, O.J.Balchum, A system for real time fluorescence imaging in colon for tumor diagnosis, *Med Phys* 14:637-639 (1987)
 132. R.Baumgartner, H.Fisslinger, D.Jacham, H.Lenz, L.Ruprecht, H.Stepp, E.Unsold, A fluorescence imaging device for endoscopic detection of early stage cancer – instrumental and experimental studies, *Photochem Photobiol* 46:759-764 (1987)
 133. B.W.Pogue, S.L.Gibbs, B.Chen, M.Savellano, Fluorescence imaging in vivo: raster scanned point-source imaging provides more accurate quantification than broad beam geometries, *Technol Cancer Res Treat* 3(1):15-21 (2004)
 134. V.Nadeau, K.Hamdan, J.Hewett, W.Sibbett, I.Tait, A.Cuschieri, M.Padgett, Endoscopic fluorescence imaging and point spectroscopy system for the detection of gastrointestinal cancers, *J Modern Opt* 49(5):731-741 (2002)
 135. E.H.Moriyama, A.Kim, A.Bogaardas, L.Lilge, B.C.Wilson, A ratiometric fluorescence imaging system for surgical guidance, *Advances in Opt Technol* 1-10, doi:10.1155/2008/532368 (2008)
 136. R.Cubeddu, D.Comelli, D.C.D'Andrea, P.Taroni, G.Valentini, Time-resolved fluorescence imaging in biology and medicine, *J Phys D: Appl Phys* 35:61-76 (2002)
 137. Q.Fang, T.Papaioannou, J.A.Jo, R.Vaitha, K.Shastry, Time-domain laser-induced fluorescence spectroscopy apparatus for clinical diagnostics, *Rev Sci Instrum* 75(1):151-162 (2004)
 138. L.Marcu, M.C.Fishbein, J.M.I.Maarek, W.S.Grundfest, Discrimination of human coronary artery atherosclerotic lipid-rich lesions by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy, *Atheroscler Tromb Vasc Biol* 21:1244-1250 (2001)
 139. J.Rao, A.D.Andrasi, H.Yao, Fluorescence imaging in vivo: recent advances, *Current Opinion in Biotechnology* 18:17-25 (2007)
 140. F.Lebland, S.C.Davis, P.A.Valdes, B.W.Pogue, Pre-clinical whole-body fluorescence imaging: review of instruments, methods and applications, *J Photochem Photobiol B: Biol* 98:77-94 (2010)
 141. D.Kentner, V.Sourjik, Use of fluorescence microscopy to study intracellular signaling in bacteria, *Annual Rev Microbiol* 64:373-390 (2010)
 142. E.Betzig, G.H.Patterson, R.Sougrat, O.W.Lindwasser, S.Olenych, J.S.Bonifacino, M.W.Davidson, J.Lippincott-Schwartz, H.F.Hess, Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution, *Sci* 313, 1642-1645 (2006)
 143. Y.Yong, X.Tie, Z.Wei, F.XiaoHong, Single-molecule fluorescence imaging of membrane-bound proteins for studies of cell signal transduction, *Chinese Sci Bull* 56(11):1063-1067 (2011)

2

Eksperimentinių galvos smegenų glijos navikų fluorescencijos tyrimas

2.1. Įvadas

Galvos smegenų piktybinės gliomos yra vieni dažniausiai diagnozuojamų pirminių centrinės nervų sistemos navikų, pasižymintį blogiausia prognoze. JAV sergamumo dažnis pirminiais intrakranialiniais smegenų navikais yra 11,8 100 tūkst. gyventojų per metus, tuo tarpu Lietuvoje - maždaug 7,1 100 tūkst. gyventojų [1]. Įvairių autorių duomenimis, apie 50-60 % pirminių galvos smegenų navikų sudaro neuroepiteliniai navikai, o pastarųjų didžiąją dalį - gliomos (apie 90 %) [2]. Vienas efektyviausių gydymo būdų yra chirurginis naviko pašalinimas [3-4]. Tačiau radikalų gliomų pašalinimą komplikuoja infiltratyvus naviko augimas bei dažnai neaiškios naviko ribos. Dėl infiltracinio galvos smegenų gliomų augimo bei panašumo į aplinkinį sveiką smegenų audinį sudėtinga įvertinti tikras naviko ribas. Lyginamieji tyrimai pasitelkus kompiuterinės tomografijos ar branduolių magnetinio rezonanso metodus parodė, kad išsisėjusias naviko ląsteles galima aptikti maždaug iki 20 mm atstumu nuo navikinio darinio ribos [5-8]. Tolesnis naviko augimas iš infiltruotų, makroskopiškai sveikai atrodančių, smegenų sričių apie pašalinto naviko guolį yra vienas iš pagrindinių gyvenimo trukmei įtakos turinčių veiksnių šių navikų atveju [9]. Todėl tikslus navikinio darinio išplitimo

ribų nustatymas operacijos metu yra būtinas norint radikaliai pašalinti naviką bei išvengti galimo naviko ataugimo (recidyvo).

Fluorescenciniai diagnostikos metodai yra vieni perspektyviausių inovatyvių vaizdinimo metodų, padedančių nustatyti navikinius darinius įvairiuose organuose, ypač tais atvejais, kai įprastiniai metodai neveiksmingi [10-13]. Pakitusi piktybinių ląstelių biochemija - specifinių fermentų aktyvumas, pernašos mechanizmai (metabolizmo ciklas), turi įtakos registruojamos fluorescencijos intensyvumui, spektro formos skirtumams ar naudojamo sensibilizatoriaus susikaupimui. Vienas pirmųjų darbų, kur stebėti žmogaus smegenų ir smegenų navikų - astrocitomos ir meningiomas, savosios fluorescencijos spektrų skirtumai, paskelbtas 1987 m. [14]. Didžiausių skirtumų rasta tarp meningiomos ir baltosios bei pilkosios smegenų substancijos savosios fluorescencijos spektrų, žadinant 337 nm bangos ilgio spinduliuote, tačiau astrocitomos atveju skirtumų nerasta. S.Andersson-Engels ir bendraautoriai [15] panaudojo 405 nm bangos ilgio spinduliuotę savosios fluorescencijos žadinimui bei nustatė, kad smegenų navikų pažeistiems audiniams charakteringas mažesnis fluorescencijos intensyvumas mėlynai žalioje spektro srityje ir intensyvesnė endogeninių porfirinų fluorescencija raudonoje spektro srityje. Chung ir bendraautoriai [16], paskelbė, kad ex vivo gliomos bandinių savosios fluorescencijos intensyvumas yra mažesnis nei sveikų smegenų (fluorescencijos smailės padėtis ties 470 nm). Autoriai teigia, kad pagrindinė priežastis yra pakitęs navikinių audinių metabolinis aktyvumas lyginant su sveiku smegenų audiniu. Bottiroli ir bendraautoriai [17] nustatė, kad didžiausi savosios fluorescencijos spektro ir intensyvumo skirtumai tarp naviko ir sveiko audinio stebimi žadinant 405 nm bangos ilgio spinduliuote. Tam įtakos turi keletas skirtingų smegenų audinio endogeninių fluoroforų, o kiekvieno iš jų santykinis įnašas skiriasi lyginant naviką ir sveiką audinį. Mažesnis navikinio audinio fluorescencijos intensyvumas ir fluorescencijos spektro praplatėjimas į ilgesnių nei 500 nm bangos ilgių sritį galėtų būti sąlygotas ląstelės flavininių ir piridininių kofermentų oksiduotos ir redukuotos formų pusiausvyros sutrikdymo, o tai signalizuoja apie navikinių ląstelių metabolinių procesų sutrikdymą ar migruojančių ląstelių atsiradimą. Navikinių darinių diagnozavimui itin svarbu

tinkamai parinkti spinduliuotės žadinimo bangos ilgį, išryškinant esminius navikinio ir sveiko audinio fluorescencijos savitumų skirtumus, kurie įgalintų pakankamai tiksliai identifikuoti patį naviką ar lokalizuoti jo išplitimo ribas. Lin ir bendraautorai [18] paskelbė, kad vadovaujantis vien tik savosios fluorescencijos intensyvumo verte negalima atskirti smegenų naviko nuo sveiko audinio žadinant 337 nm bangos ilgio spinduliuote, tačiau nežymūs fluorescencijos skirtumai visgi matomi. Tuo tarpu kitos mokslininkų grupės [17] atlikti tyrimai parodė, kad žadinant 366 nm spinduliuote galima atskirti naviką nuo sveiko smegenų audinio remiantis vien tik savosios fluorescencijos spektro formos ir intensyvumo skirtumais. Įvairių smegenų glijos navikų metabolinių vyksmų eigos skirtumai bei atskirų endogeninių fluoroforų pasiskirstymo bei jų kiekio kitimą sąlygojančių veiksnių įtaka nepakankamai iširta, tačiau atlikti preliminarūs tyrimai yra daug žadantys. Taigi, nors savoji audinių fluorescencija nesuteikia pakankamo fluorescencijos kontrasto tarp naviko ir sveiko smegenų audinio, tačiau gali būti svarbi lokalizuojant naviką aplinkinių sveikų audinių fone.

Geresnis sveikų audinių ir glijos navikų fluorescencijos kontrastas gautas naudojant įvairius sensibilizatorius, kurie pasižymi savybe selektyviau kauptis navikiniuose dariniuose. Kadangi sensibilizatoriaus fluorescencijos intensyvumas yra objektyvus jo susikaupimo audiniuose rodiklis, registruojant fluorescencijos spektrus ar fluorescencijos vaizdus galima objektyviau lokalizuoti besiformuojančio navikinio ar ikinavikinio darinio išplitimo ribas greta esančiuose sveikuose audiniuose. Įvairių sensibilizatorių selektyvus kaupimasis buvo stebėtas *in vivo*, *in vitro* bei klinikinių tyrimų metu neurochirurginiu būdu pašalintuose navikiniuose audiniuose [19-22]. Tačiau menkas kai kurių eksperimentiniuose tyrimuose naudotų sensibilizatorių [23-24] prasiskverbimas į smegenų audinius, neretai sąlygotas naudojamos dozės, nepakankamas kontrastas tarp sveiko ir navikinio audinių, įvairių pašalinių poveikių atsiradimas paskatino naujų, endogeninių sensibilizatorių panaudojimo galvos smegenų navikų chirurginei fluorescencinei diagnostikai tyrimus. Itin gerų rezultatų pasiekta smegenų gliomų diagnostikoje naudojant 5-ALA indukuojamą PpIX [13,20]. 5-ALA yra maža, vandenyje tirpi molekulė, kuri gali patekti į ląstelę, kirtusi hematoencefalinį (blood-

brain) barjerą [17], išlikti ląstelės viduje ir dėl savo metabolizmo sukelti porfirinų sintezę, tuo tarpu prie didelių 5-ALA koncentracijų, gali sąlygoti neurotoksinį poveikį [25,26]. In vivo atlikti eksperimentiniai tyrimai parodė, kad nepažeistas hematoencefalinis barjeras tik silpnai pralaidus 5-aminolevulino rūgšties molekulėms, todėl navikas yra potencialus taikyns 5-ALA indukuotam PpIX [17,25]. Selektivaus PpIX kaupimosi smegenų gliomose priežastys dar nepakankamai iširtos. Tačiau pažymima, kad tam įtakos turi didesnis pasisavinamos 5-ALA kiekis glijos navike dėl pažeisto hematoencefalinio barjero bei hemosintezę reguliuojančių fermentų aktyvumo sutrikimų [22]. Esant pažeistam hematoencefaliniam barjerui, 5-ALA lengvai patenka į smegenų ląsteles bei indukuoja porfirinų sintezę. Suaktyvėjusi navikinių ląstelių pernašos sistema bei geras aprūpinimas krauju, o kartu ir deguonimi, sudaro sąlygas po tam tikro laiko sukaupti didesnę 5-ALA kiekį, o tuo pačiu inicijuoti perteklinę porfirinų sintezę. Porfirinų sintezės padidėjimą nulemia ir greita navikinių ląstelių proliferacija bei geležies jonų koncentracija. Konfokalinės fluorescencinės spektroskopijos tyrimai [27] įrodė, kad 5-ALA gali prasiskverbti per hematoencefalinį barjerą ir sąlygoti porfirinų sintezę smegenų srityse, kur nepažeistas hematoencefalinis barjeras. Tačiau santykinis indukuojamo PpIX fluorescencijos intensyvumas yra žymiai mažesnis nei tose smegenų srityse, kur hematoencefalinis barjeras yra pažeistas. Autoriai pažymi [19], kad fluorescencijos kontrastas tarp sveiko ir navikinio audinio yra esminis radikaliai naviko pašalinimui. Fluorescencijos kontrastui gali turėti įtakos tiek savoji, tiek ir sensibilizuota audinio fluorescencija bei registracijos sistemos jautrumas.

Šiame skyriuje nagrinėjamo darbo tikslas - sukonstruoti eksperimentinę fluorimetrinę sistemą eksperimentinių piktybinių galvos smegenų gliomų diagnostikai in vivo, bei atlikti tiek fluorescencijos spektrinės, tiek ir fluorescencijos vaizdinės informacijos analizę siekiant įvertinti fluorimetrinio metodo jautrumą ir specifiškumą glijos navikų atpažinimui. Iširti perteklinės 5-ALA sukeltą selektyvų PpIX kaupimąsi eksperimentinėse gliomose - žiurkių glioblastomos 101.8 ir žmogaus eksperimentinės gliomos C6 – įvertinant integrinio fluorescencijos intensyvumo pokytį; nustatyti spektrofluorimetrinio

metodo jautrumą, specifiškumą bei tikslumą chirurginės eksperimentinių navikų diagnostikos metu; įvertinti sensibilizuotų galvos smegenų gliomų fluorescencijos spektrų matavimo operacijos metu galimybes praktiniam taikymui klinikoje; įvertinti fluorescencinio vaizdinimo metodo galimybes eksperimentinės chirurginės operacijos sąlygomis lokalizuoti navikinio darinio ribas; iširti galvos smegenų navikų savąją fluorescenciją siekiant nustatyti specifinius fluorescencijos spektrų formos pokyčius audinių diferenciacijai bei įvertinti savosios fluorescencijos tinkamumą galvos smegenų navikų identifikavimui.

2.2. Medžiagos ir metodai

2.2.1. Eksperimentinė spektrofluorimetrinė sistema

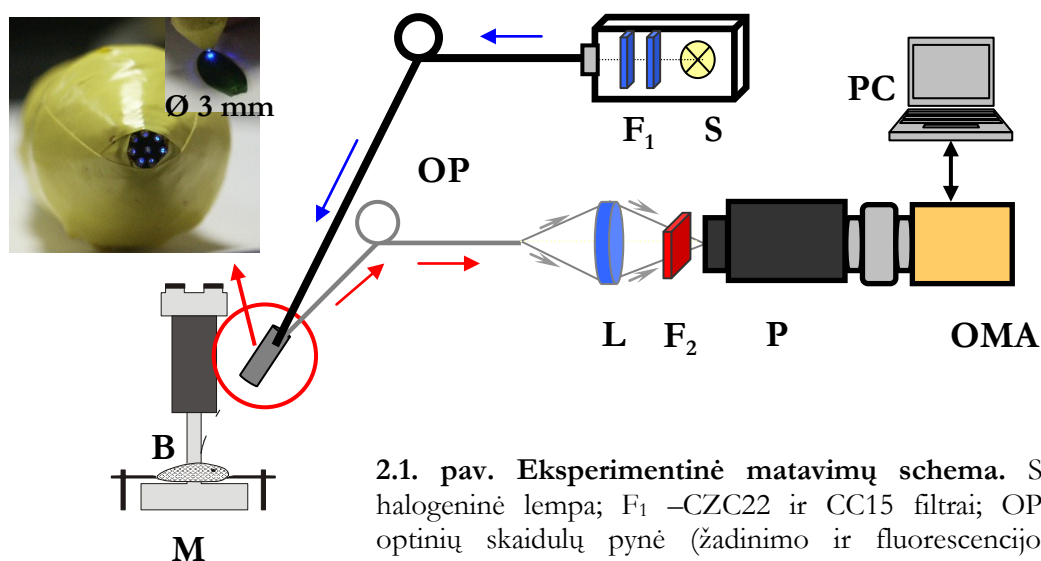
Smegenų audinių in vivo fluorescencijos spektrų registravimo sistemos schema pateikta 2.1. pav. Fluorescencijos žadinimui buvo naudojama halogeninė lempa (150W), kurios spektrinė sudėtis - 370 – 500 nm spektrinė sritis - formuojama filtrų CZC22 ir CC15 dėka (2.2. pav.). Žadinančios spinduliuotės nuvedimui iki tiriamojo audinio bei fluorescencijos surinkimui buvo sukonstruota speciali optinė skaidulų pynė (aštuonių skaidulų pagrindu). Septynios kvarcinės skaidulos, išdėstytos ratu aplink centrinę skaidulą, suformuodavo žadinančios spinduliuotės lauką maždaug 3 mm skersmens. Tuo tarpu centrine pynės skaidula (600 μm , skaitinė apertūra 0,22) buvo surenkama fluorescencija (iš $\sim 0,17 \text{ mm}^2$ ploto) ir nuvedama iki registracijos sistemos. Fluorescencijos spektrų registravimui buvo naudojamas plokščio lauko polichromatorius (S380 Solar TII, Ltd) bei optinis daugiakanalis analizatorius OMA IV (EG&G Instruments Corp.). Fluorescencijos signalas iš optinės skaidulos objektyvu nukreipiamas į polichromatoriaus plyšį taip, kad plyšio plokštumoje buvo gaunamas tikras apverstas optinės skaidulos galo vaizdas. Polichromatoriaus išėjimo plokštumoje suformuoti fluorescencijos spektrai buvo registruojami optinio daugiakanalio analizatoriaus OMA pagalba. Jo pagrindas yra CCD kamera, sudaryta iš 256 eilučių po 1024 šviesai jautrių elementų kiekvienoje eilutėje. Šis analizatorius buvo atšaldomas skystu azotu iki $-120 \text{ }^\circ\text{C}$ temperatūros, siekiant sumažinti CCD kameros savuosius triukšmus bei užtikrinti pakankamą spektrinei analizei santykį signalas/triukšmas. Fluorescencijai atskirti nuo išsklaidytos žadinančios spinduliuotės prieš polichromatoriaus įėjimo plyšį buvo pastatomas OC13 filtras. Visi matavimai buvo atlikti naudojant 9 sekundžių ekspoziciją fluorescencijos signalo kaupimui. Kadangi tirti eksperimentiniai smegenų navikų dariniai yra kelių kvadratinų milimetrų pločio, ir sunkiai įžiūrimi plika akimi, jiems stebėti buvo naudojamas mikroskopas MBC-10 (dirbta 16 kartų didinimo režime).

Kiekviename tirtame taške buvo atliekama iki trijų matavimų ir vertinamas jų vidurkis. Visi spektriniai matavimai atlikti tamsoje žadinančios šviesos pluoštą

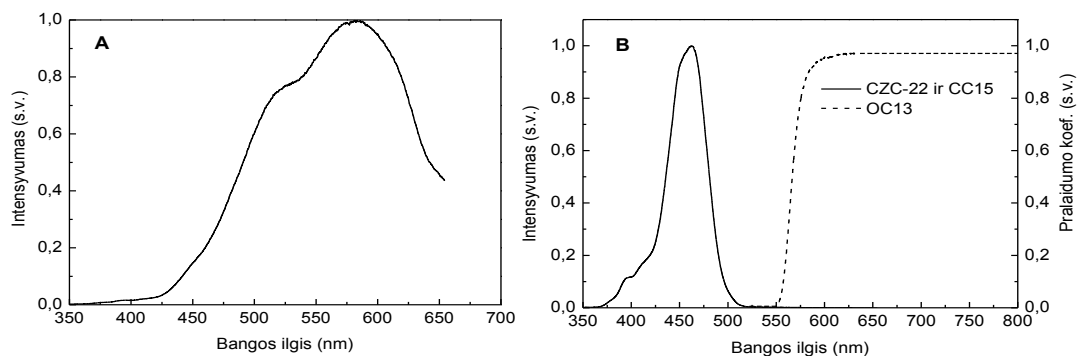
nukreipiant statmenai tiriamam paviršiui, išlaikant apie 0,8-1 mm atstumą nuo optinės pynės galo iki tiriamo audinio.

Audinių fluorescencijos matavimus atlikome in vivo – gyvūnui esant gyvam, realiomis atviros kraniotomijos sąlygomis tuo maksimaliai priartindami bandymo sąlygas realioms. Audinių pjūviai ir dekompresinė kraniotomija atliekama steriliais chirurginiais mikroinstrumentais. Kraujavimo stabdymui naudotas 3 proc. peroksido tirpalas ir bipolinė elektrokaustika.

Praėjus 5 val. 30 min. po 5-ALA injekcijos, gyvūnui atlikta dekompresinė kraniotomija intraveninėje kalipsolio nejautoje. Tyrimo metu eksperimentinis gyvūnas buvo padedamas ant mikroskopo stalo taip, kad neurochirurgas regėjimo zonoje aiškiai matytų tiriamąjį audinį, ir fiksuojamas reguliuojamais laikikliais. Pradžioje buvo atveriamas pažeistų smegenų pusrutulio sritis ir užregistruojamos naviko bei abejotinių audinių – naviko paribinių sričių fluorescencinės charakteristikos. Sveikų smegenų fluorescencija buvo registruojama iš priešingo galvos smegenų pusrutulio (dešinysis smegenų pusrutulis). Kiekvienas tirtas taškas buvo pažymimas specialiu, audinio rezekcijos ribų žymėjimui skirtu dažu (Indijos rašalo sintetinis pakaitalas). Sukauptų eksperimentinių duomenų patvirtinimui iš tirtų ir pažymėtų vietų buvo imamos biopsijos morfologiniam tyrimui.



2.1. pav. Eksperimentinė matavimų schema. S- halogeninė lempa; F₁ –CZC22 ir CC15 filtrai; OP- optinių skaidulų pynė (žadinimo ir fluorescencijos surinkimo sistema); B- bandinio fiksavimo įtaisas; M- mikroskopas; L – lęšis; F₂ – OC13 filtras; P- polichromatorius; OMA –optinis daugiakanalis analizatorius



2.2. pav. A – halogeninės lempos spektras, B – žadinimo spinduliuotės spektras suformuotas CZC22 ir CC15 filtrų dėka bei žadinimo spinduliuotę atkertančio filtro OC13 charakteristika

C6 gliomos savosios fluorescencijos registravimas

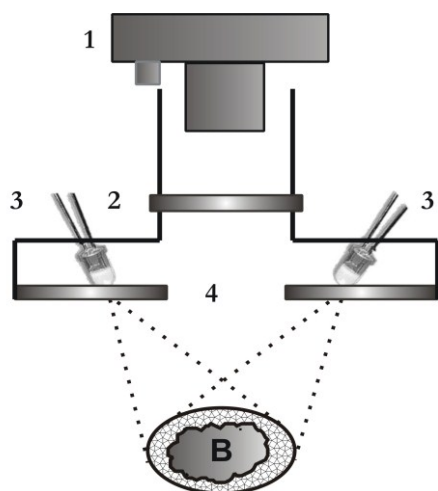
C6 gliomos ir sveikų smegenų savosios fluorescencijos spektrų matavimai atlikti *ex vivo* žadinant derinamo bangos ilgio lazerine spinduliuote spektrinėje srityje nuo 380 iki 440 nm (kas 10 nm) (3.1. pav.). Tyrimai atlikti praėjus 12 parų po naviko implantavimo procedūros. Laboratoriniai gyvūnai ($n=2$) buvo numarinami intraperitonine neskiesto kalipsolio tirpalo 2-3 ml injekcija, atveriami galvos audiniai bei išimamos smegenys, kurios iki bandymo pradžios (apie 30 min) buvo laikomos fiziologiniame tirpale. Eksperimento metu užregistruota po 10 savosios fluorescencijos spektrų sveikų smegenų (baltoji smegenų substancija matuojant iš dešiniojo galvos smegenų pusrutulio) ir smegenų naviko srityse bei apskaičiuoti jų vidurkiai spektrinei analizei atlikti.

2.2.2. Fluorescencijos vaizdinimo sistema

Smegenų navikų sensibilizuotos fluorescencijos vaizdinimui buvo naudojamas C6 gliomos eksperimentinis modelis. Tyrimai atlikti praėjus 12 parų po naviko implantavimo procedūros. Fluorescencijos žadinimui sumontuota mobili žiedo formos šviesos diodų matrica (31 šviesos diodas, $\lambda_z=405$ nm, 5mW vidutinės galios), kurios centre esanti kiaurymė leido skaitmeniniu fotoaparatu per atitinkamai parinktą šviesos filtrą registruoti eksperimentinių navikų fluorescencijos vaizdus (2.3. pav.). Žadinančios spinduliuotės spektrinė sudėtis buvo formuojama CZC22 filtro dėka. 10 cm atstume nuo šviestukų matricos buvo

suformuojamas tolygus žadinančios šviesos intensyvumo pasiskirstymo laukas ($\sim 3\text{mW}/\text{cm}^2$).

Eksperimentinių navikų fluorescencijos vaizdų registravimui naudota skaitmeninė fotokamera (Minolta Dimage 7 (5,24 mln. vaizdo elementų)), kuri



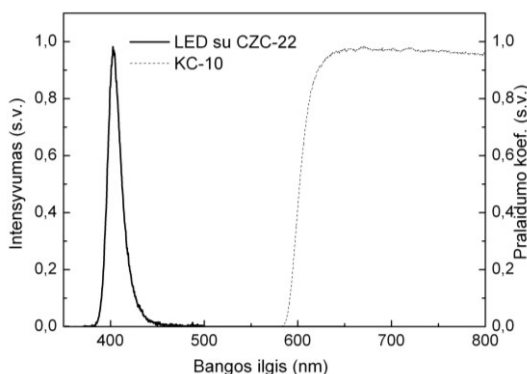
2.3. pav. Smegenų navikų fluorescencijos vaizdinimo schema

1- skaitmeninis fotoaparatas Dimage7; 2-KC10 filtras; 3-LED šviestukai; 4-CZC22 filtras; B- bandinys

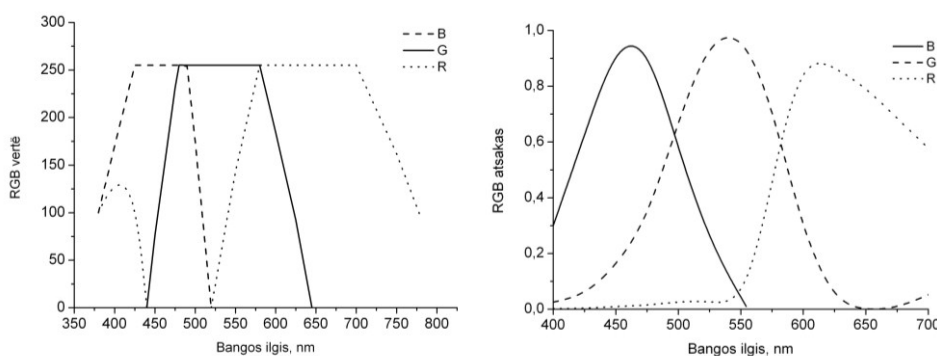
buvo įtvirtinama virš tiriamo objekto (25 cm atstumu (ribinis atstumas dirbant makro režimu)) statmenai jo paviršiui. 2.5 paveikslo dešinėje pateikta naudoto skaitmeninio fotoaparato CCD lusto jautrumo kreivė RGB signalui. Kadangi protoporfirinas IX sugeria mėlynos spektro srities spinduliuotę (Sore juostos maksimumas yra ties 405 nm), o fluorescuoja 600-700 nm spektrinėje srityje (pagrindinės fluorescencijos smailės ties 636 nm ir 706 nm), todėl parinktos eksperimentinės sąlygos atitinka selektyvų būtent endogeninių porfirinų sužadinimą bei jų fluorescencijos registravimą skaitmenine

fotokamera, kuri pakankamai jautri 600-700 nm spektrinėje srityje.

Kiekvieno eksperimentinio naviko atveju buvo užregistruojami fluorescencijos spektrai (fluorescencijos surinkimui naudota centrinė optinės pynės skaidula (600 μm)), o tuomet daromos trys nuotraukos: pirma - žadinančios spinduliuotės fone; antra - naviko pažeistos smegenų srities fluorescencijos vaizdas, tarp skaitmeninės fotokameros objektyvo ir bandinio įterpiant KC10 filtrą (kuris eliminuoja žadinančios spinduliuotės įtaką < 600 nm, (2.4. pav.)); ir trečia - baltoje šviesoje, prieš tai pažymėjus tirtus taškus. Baltos ir žadinančios spinduliuotės fone objekto vaizdai užregistruojami fotokamerai dirbant auto režimu, o smegenų naviko fluorescencija fotografuota naudojant 4 ir 10 s ekspozicijos trukmes. Vaizdas analoginiu/skaitmeniniu keitikliu konvertuojamas į 8 bitų kiekvienam RGB kanalui JPG formata. Gauti vaizdai išsaugomi kompiuterio atmintyje tolimesnei analizei.



2.4. pav. Šviesos diodo (LED) spektras naudojant CZC-22 filtrą ir KC-10 filtro pralaidumo charakteristika

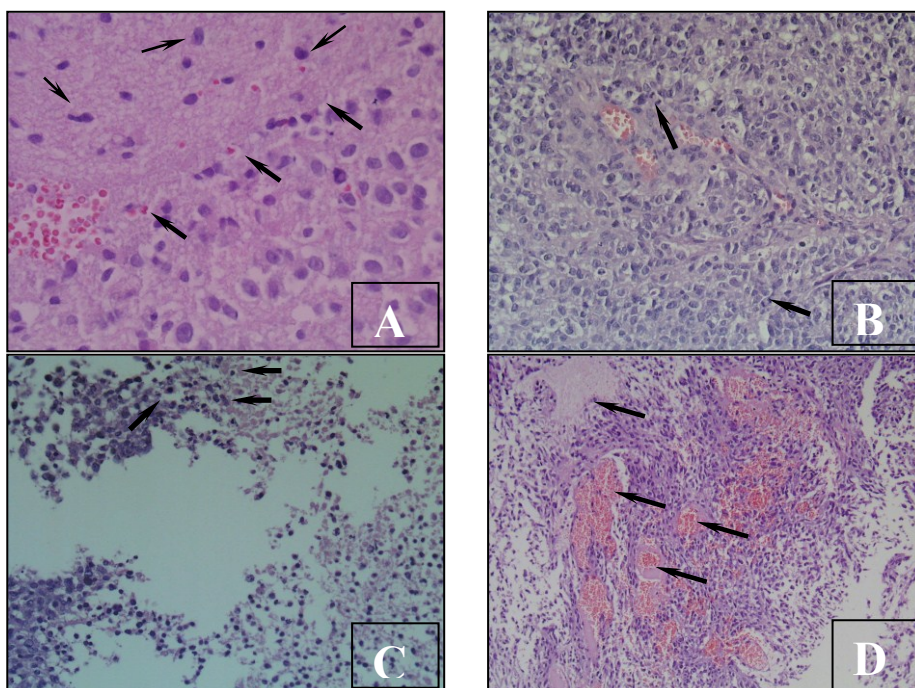


2.5. pav. Kairėje: Standartinė RGB spalvinių verčių priklausomybė nuo bangos ilgio. Dešinėje: Skaitmeninio fotoaparato Dimage7 CCD lusto pavienio pikselio RGB jautrumo spektrinės charakteristikos

Kiekvieno išsaugoto eksperimentinio bandymo nuotraukos dydis sudarė 2560 x 1920 pikselių matricą. Kiekvieną vaizdą sudaro vienas po kito eilutėmis ir stulpeliais išdėstyti vaizdo elementai (pikseliai), kurie tarpusavyje skiriasi tik padėtimi ir spalva. Visais atvejais informacija koduojama tuo pačiu principu - „taškas–spalva“. Vienos spalvos kodavimui naudojamas trijų skaitmenų kodas, atitinkantis raudoną (Red), žalią (Green) ir mėlyną (Blue) spalvas. Kiekvienos spalvos intensyvumas apibrėžiamas skaitine verte nuo 0 iki 255 (1 bitas 1 spalvos komponentui). Pavyzdžiui: (0,0,0) – juoda; (255, 255, 255) – balta; (255, 0, 0) – raudona; (0, 255, 0) – žalia; (0, 0, 255) – mėlyna. Atitinkamai parinkus skaitinių verčių kombinacijas, nusakančias RGB spalvinių kanalų intensyvumą, galima gauti bet kurią spalvą 380 – 780 nm spektro srityje.

2.2.3. Eksperimentinių smegenų navikų ląstelių linijos

Žiurkių 101.8 gliomos ląstelių kultūra gauta iš Kijevo Neurorengenchirurgijos tyrimų centro mokslinio bendradarbiavimo pagrindu. Eksperimentinio naviko ląstelių linijos atitikimas žmogaus gliomai vertintas ruošiant smegenų naviko histologinius preparatus. Nustatyta, kad 101.8 gliomos ląstelių augimo savybės pilnai atitinka PSO nustatytus žmonių smegenų gliomų piktybiškumo kriterijus: branduolių polimorfizmas, piktybinių ląstelių infiltracija į sveikų smegenų audinius, kraujagyslių proliferacija, ląstelių mitozė (2.6. pav.).



2.6. pav. 101.8 žiurkių gliomos histologiniai preparatai iliustruojantys pagrindinius gliomos piktybiškumo požymius: navikinių ląstelių infiltracija į sveikų smegenų audinius (A); branduolių polimorfizmas (B); kraujagyslių proliferacija (C); ląstelių mitozė (D)

Žmogaus C6 gliomos ląstelių kultūra gauta iš Rygos organinės sintezės instituto (Latvija). Šis štamai - vienas dažniausiai naudojamų gliomos eksperimentinių navikų modelių savo piktybiškumu, angiogenezės bei naviko augimo ir infiltracijos į sveikus smegenų audinius mechanizmais ypač artimas žmogaus gliomai [28].

2.2.4. Eksperimentinis glijos navikų modelis

2 - 3 savaičių amžiaus *Wistar* linijos žiurkėms buvo įskiepijamas galvos smegenų navikas - žiurkių glioblastoma, naudojant C6 arba 101.8 gliomos ląsteles. Ląstelių kultūros gyvybingumas palaikomas pastoviai perskiepijant iš vienos žiurkės smegenų kitai. Kita štamo dalis užšaldoma pagal Kijevo institute įsisavintą metodiką.

Užmigdžius gyvūnus intraperitonine Sol. Kalipsoli 0.25 proc. tirpalo injekcija (0.4 – 0.6 ml/50g k.s.) buvo atliekama galvos audinių incizija. Kairėje momeninėje užpakalinėje paramedialinėje srityje buvo išgręžiama dviejų mm skersmens ertmė, pro kurią specialia adata (2 mm gylyje) lėtai suleidžiama naviko ląstelių suspensija (0.03-0.04 ml suspensijos, kurioje būdavo apie 4 - 5 mln. navikinių ląstelių). Audinių pjūvis sulipdomas biologiniais klijais. Šis štamas auga 14 - 15 parų (C6 gliomos atveju – 12 parų). Praėjus 14 dienų po naviko implantavimo naviko skersmuo siekė nuo 3 iki 6 mm. Navikas pilkšvai rausvas, baltojoje smegenų substancijoje neturintis aiškių ribų. Po inkubacinio periodo, šešios valandos prieš intervenciją, eksperimentiniams gyvūnams į uodegos veną buvo suleidžiama 5-aminolevulininės rūgšties hidroklorido tirpalo dozė. Po sensibilizatoriaus įvedimo gyvūnai penkias su puse val. laikomi tamsoje iki chirurginės intervencijos pradžios. Tuomet gyvūnai pakartotinai užmigdomi. Gyvūno galva fiksuojama specialiaime rėme, atnaujinus audinių pjūvį, buvo atliekama abipusė dekompresinė kraniotomija, atveriami smegenų dangalai ir atliekami fluorescencijos spektrų matavimai. C6 gliomos atveju užregistravus audinių fluorescencijos spektrus buvo registruojami fluorescencijos vaizdai naviko skiepijimo srities (kairysis smegenų pusrutulio) bei sveikų smegenų (dešinysis smegenų pusrutulio). Baigus spektrinių charakteristikų/vaizdų registravimą, gyvūnai būdavo numarinami intraperitonine neskiesto kalipsolio tirpalo 2-3 ml injekcija. Tirtos audinių sritys pažymimos specialiu dažu bei paaimami šių vietų audinių mėginiai morfologiniams tyrimams.

Audinių gabalėliai fiksuoti 10% buferinizuoto formalino tirpale. Histologiniai preparatai paruošti pagal standartinę metodiką įliejant į parafiną ir atliekant 4 µm storio pjūvius. Vertinti tik tie preparatai, kuriuose buvo matomas audinių žymėjimui naudotas dažas.

2.2.5. Eksperimentiniai gyvūnai

Eksperimentams naudotos Wistar rūšies žiurkės (svoris 35-120 g) gautos iš Imunologijos instituto. Darbui su gyvūnais buvo gautas Lietuvos Laboratoriųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės veterinarijos tarnybos leidimas Nr. 0035.

2.2.6. Sensibilizatorius

Eksperimentinių smegenų navikų (žiurkių glioma 101.8) fluorescencijos jautrinimui buvo naudojamas 5 - aminolevulininės rūgšties hidrochloridas (Medac GmbH, Hamburg). Tamsoje laikyti milteliai buvo ištirpinami steriliame izotopiniame NaCl tirpale prieš pat bandymą. Naudota 300 mg/kg sensibilizatoriaus dozė. Preparato tirpalas buvo suleidžiamas į žiurkių uodegos veną. Po 5-ALA įvedimo gyvūnai buvo laikomi tamsoje iki bandymo pradžios.

C6 gliomos eksperimentiniai tyrimai atlikti naudojant kito gamintojo 5 - aminolevulininės rūgšties hidrochloridą (FLUKA). Preparato tirpalas buvo suleidžiamas intraveniškai. Naudotos dvi skirtingos dozės – 300 mg/kg ir 100 mg/kg.

2.2.7. Fluorescencijos spektrų ir vaizdų apdorojimo procedūra

Fluorescencijos spektrų analizė atlikta Origin 6.0 Professional programiniu paketu. Iš kiekvieno užregistruoto spektro buvo atimamas CCD matricos foninis triukšmas bei spektrai pakoreguoti pagal OC13 (arba KC10, kuomet fluorescencijos žadinimui naudoti šviesos diodai) filtro pralaidumo charakteristiką. Vaizdų apdorojimas atliktas Matlab programiniu paketu.

2.2.8. Eksperimentinio spektrofluorimetrinio metodo diagnostinių rodiklių apskaičiavimas

Kiekybiniam spektrofluorimetrinio metodo patikimumo įvertinimui (statistinei duomenų analizei) buvo apskaičiuotos integrinio intensyvumo vertės, vertinant normuotų sveikų smegenų struktūrų ir naviko fluorescencijos spektrų vidurkių integrinio intensyvumo vertes gautas suintegravus plotą po pirmąją PpIX smaile.

Kiekvieno bandomojo gyvūno atveju buvo užregistruojami fluorescencijos spektrai iš keturių skirtingų sričių: naviko, sveikų smegenų (priešingame smegenų pusrutulyje) bei abejotinių audinių – abejotinas sveikas audinys ir abejotinas navikas (naviko skiepavimo pusrutulyje). Matavimų vieta pažymima specialiu dažu ir tuomet bandomieji gyvūnai priskiriami vienai iš trijų grupių (atsitiktinio skaičiaus verte generuojama kompiuterio pagalba):

- *1 grupė* (9 žiurkės) - pasirinkti taškai įvardijami (navikas, abejotinas navikas, abejotiniai smegenys, smegenys) mikroskopo kontrolėje (chirurgo vertinimas). Biopsija tik iš pažymėtų taškų;
- *2 grupė* (9 žiurkės) - pasirinkti taškai įvardijami remiantis spektrofluorimetriniais matavimais (remiantis spektrų analize). Biopsija tik iš pažymėtų taškų;
- *kontrolinė grupė* (9 žiurkės) - pasirinkti ir pažymėti taškai įvardijami morfologinio tyrimo metu: navikas yra arba naviko nėra. Morfologiniam tyrimui imtas visas pažeistas smegenų pusrutulius.

Eksperimentas būdavo pabaigiamas imant iš kiekvieno tirta taško dažais pažymėtų audinių biopsiją morfologiniam ištyrimui. Iš viso trijose bandymų grupėse vertinta 99 biopsijos. Gavus morfologines išvadas, įvertinti kiekvieno iš diagnostikos metodų (mikroskopinio ar spektrofluorimetrinio) jautrumas, specifiškumas ir tikslumas. Šiame tyrime “auksinio standarto” metodu laikyta morfologinio tyrimo išvada.

Statistinė duomenų analizė atlikta naudojant NCSS2000 ir SPSS 11.5 programinius paketus. Diagnozuojant mikroskopo pagalba ir spektrofluorimetriniu metodu, jautrumas, specifiškumas ir tikslumas skaičiuoti lyginant su morfologinio tyrimo išvadomis. Tam buvo sudaroma susijusių požymių lentelė:

2.1. lentelė. Susijusių požymių lentelė spektrofluorimetrinio metodo jautrumo, specifiškumo ir tikslumo skaičiavimams

<i>Spektrofluorimetrinis metodas</i>	<i>Morfologinis tyrimas</i>	
	TAIP	NE
TAIP	Tikrai teigiamas TT	Klaidingai teigiamas KT
NE	Klaidingai neigiamas KN	Tikrai neigiamas TN

Spektrofluorimetrinio metodo jautrumo, specifiškumo ir tikslumo skaičiavimai buvo atliekami pagal formules:

$$Jautrumas = \frac{TT}{TT + KN},$$

$$Specifiškumas = \frac{TN}{TN + KT},$$

$$Tikslumas = \frac{TT + TN}{TT + TN + KT + KN}.$$

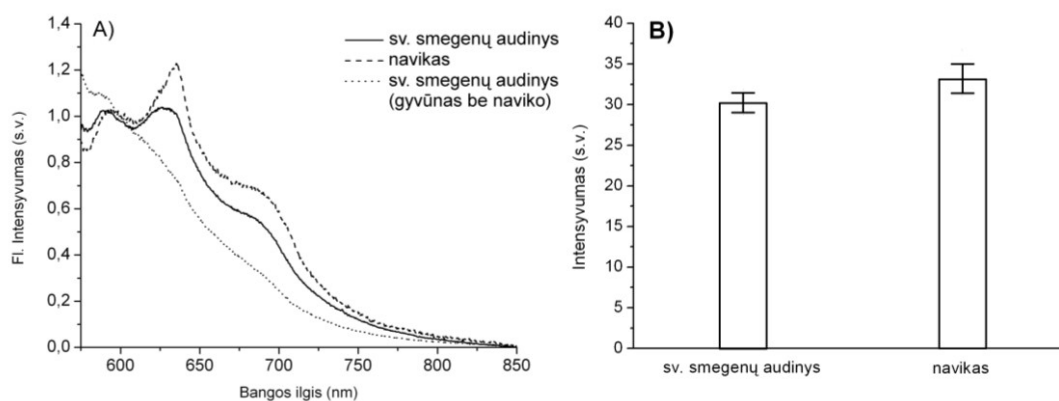
Klaidingo diagnozavimo tikimybės (dažnumams) palyginti buvo taikytas tikslus Fišerio kriterijus. Taškas, skiriantis mažos ir didelės naviko rizikos grupes nustatytas iš ROC (Receiver Operating Characteristics - imtuvo funkcinės charakteristikos) kreivių. Spektrofluorimetrinio metodo bei makroskopinio vertinimo statistinė duomenų analizė atlikta dr. K.Skaumino [29].

2.3. Pagrindiniai rezultatai

2.3.1. Savosios fluorescencijos tyrimo rezultatai

2.3.1.1. 101.8 gliomos savosios fluorescencijos tyrimo *in vivo* rezultatai

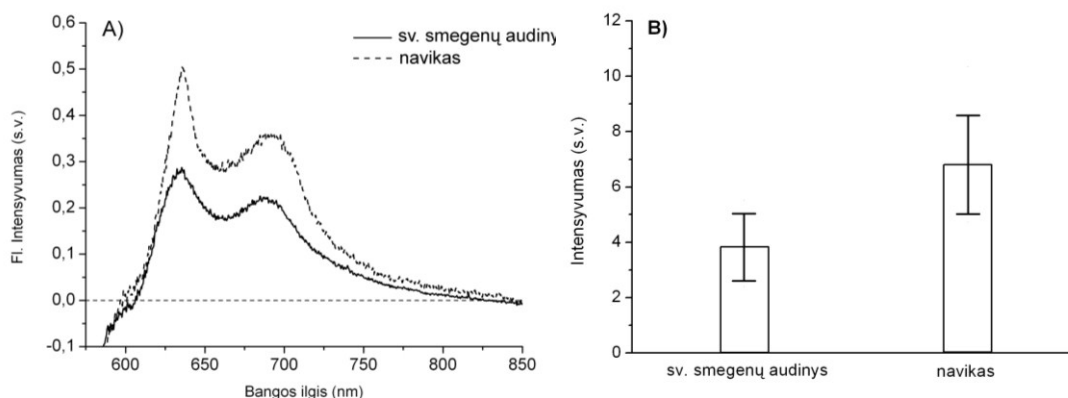
Tiriant sveikų smegenų ir eksperimentinių navikų - 101.8 gliomos savąją fluorescenciją, nustatyta, kad nedideli skirtumai matomi tarp to paties ar atskirų gyvūnų sveikų ir navikinių audinių, tuo tarpu lyginant atskirų gyvūnų tik sveikų arba tik naviko audinių fluorescencijos spektrų formos skirtumai nėra tokie ženkliūs. Sunormavus vidutinius sveikų smegenų audinių ir smegenų naviko savosios fluorescencijos spektrus išryškėjo spektrų formos skirtumai (2.7. pav. A).



2.7. pav. A) sveikų smegenų audinių (kontrolinė sritis) ir smegenų naviko savosios fluorescencijos spektrų vidurkiai (spektrai sunormuoti į vienetinį intensyvumą ties 600 nm). B) sveikų smegenų audinių ir smegenų naviko integrinių fluorescencijos intensyvumų vertės gautos integruojant plotą po pirmąją PpIX smailę 620-660 nm spektrinėje srityje. Vertės pateiktos kaip vidurkis \pm vidutinis kvadratinis nuokrypis (SD) (reikšmingumo lygmuo $p=0,05$). ($n_{sv.sm.a.}=10$, $SD=1,2$; $n_{nav.}=15$, $SD=1,8$)

Eksperimentinių gyvūnų su ir be smegenų naviko - 101.8 gliomos, sveikų smegenų savosios fluorescencijos spektrai skiriasi spektrinėje srityje nuo 600 nm iki 720 nm. Šie sveikų smegenų audinių (kontrolinė sritis) savosios fluorescencijos spektro formos pokyčiai galimai yra susiję su naviko implantacija t.y. smegenų apsauginio - hematoencefalinio barjero pažeidimu arba dėl gyvūnui sukeliama streso naviko skiepijimo procedūros metu. Smegenų navikui, spektro formos skirtumai šioje srityje yra nežymiai didesni nei sveiko audinio gyvūno su naviku - sąlyginai labiau išreikšta pirmoji endogeninio protoporfirino smailė ties 636 nm, tačiau šis skirtumas yra daug didesnis jei palyginsime su sveikų smegenų audiniu gyvūno be naviko. Tiek sveikų audinių, tiek ir naviko spektre matoma įduba ties

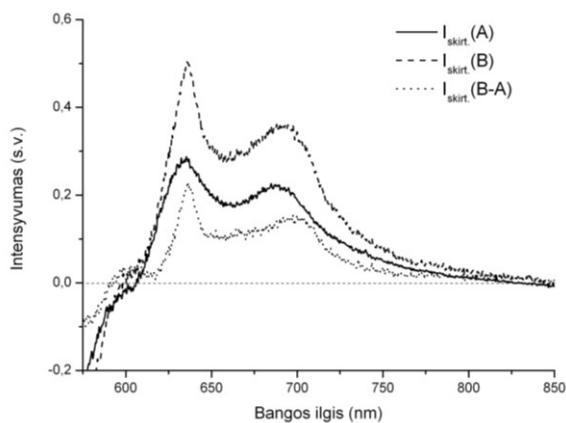
580 nm, kuri yra sąlygota hemoglobino sugerties. Kadagi spektrų registravimas atliekamas in situ, nesutrikdant gyvūno gyvybinių funkcijų, todėl kraujas ir jo įtaka daugiau ar mažiau bus juntama analizuojant eksperimentinius duomenis. Nors stebimi normuotų fluorescencijos spektrų skirtumai tarp sveikų smegenų audinių (gyvūno su naviku) ir smegenų naviko nėra dideli, tačiau yra sąlygoti endogeninio protoporfirino santykinio kiekio padidėjimu navikinio darinio srityje. Suintegravus plotą po kreive, 620 – 660 nm spektrinėje srityje, atitinkančioje pirmąją endogeninio protoporfirino smailę (smailė ties 636 nm) buvo įvertintos integrinio intensyvumo vertės, parodančios PpIX koncentracijos skirtumus tarp smegenų naviko ir sveiko smegenų audinio. Nustatyta, kad sveiko smegenų audinio vidutinė fluorescencijos integrinio intensyvumo vertė – $30,2 \pm 1,2$ s.v., tuo tarpu smegenų naviko – $33,2 \pm 1,8$ s.v. Taigi optinis kontrastas tarp sveikų smegenų audinių (gyvūnas su naviku) ir smegenų naviko nėra pakankamas audinių diferenciacijai. Tačiau palyginus šių audinių skirtuminių spektrų, gautų iš užregistruotų sveikų smegenų audinių (gyvūnas su naviku) ir naviko savosios fluorescencijos spektrų atėmus gyvūno be naviko sveikų smegenų audinių fluorescencijos spektrą, integrinio intensyvumo vertę 620 – 660 nm spektrinėje srityje nustatyta, kad sveikų smegenų audinių vidutinė fluorescencijos integrinio intensyvumo vertė – $3,8 \pm 1,2$ s.v., tuo tarpu smegenų naviko – $6,8 \pm 1,8$ s.v. (2.8. pav.). Taigi skirtuminių spektrų analizės dėka gaunamas didesnis optinio kontrasto skirtumas tarp smegenų naviko ir sveikų smegenų audinių (gyvūnas su naviku), kuris galėtų būti



2.8. pav. A) sveikų smegenų audinių (kontrolinė sritis) ir smegenų naviko skirtuminiai savosios fluorescencijos spektrai. B) sveikų smegenų audinių ir smegenų naviko integrinių fluorescencijos intensyvumų vertės gautos integruojant plotą po pirmąją PpIX smailę 620-660 nm spektrinėje srityje. Vertės pateiktos kaip vidurkis \pm vidutinis kvadratinis nuokrypis (SD) (reikšmingumo lygmuo $p=0,05$). ($n_{sv.sm.a.}=10$, $SD=1,2$; $n_{nav.}=15$, $SD=1,8$)

reikšmingas rodmuo identifikuojant glijos naviką pasitelkiant savosios fluorescencijos metodą.

Pažymėtina, kad gyvūnų su implantuotu smegenų naviku, sveikų smegenų audinių ir naviko spektrų formos skirtumai yra saviti ir sąlygoti įvairių endogeninių porfirinų santykinio kiekio skirtumų audiniuose. Siekiant išryškinti spektro formos savitumų skirtumus bei išskirti atskirų endogeninių porfirinų daromą įtaką registruojamam fluorescencijos spektrui, buvo atlikta detalesnė palyginamoji gyvūnų su implantuotu naviku sveikų smegenų audinių ir smegenų naviko skirtuminių spektrų analizė. Kaip matyti iš pateikto skirtuminių spektrų paveikslo (2.8. pav. A), navikui charakteringesnė aštresnė (tuo pačiu ir siauresnė) fluorescencijos smailė ties 636 nm bei fluorescencijos juosta ties 700 nm - su praplatėjimu link 680 nm ir statesniu ilgabangiu šlaitu, tuo tarpu sveikų smegenų audinių fluorescencijos juosta ties 636 nm yra platesnė ir lėkštesnė, o fluorescencijos juosta ties 700 nm – labiau pasislinkusi link trumpabangės spektro srities ir lėkštesniu ilgabangiu šlaitu. Šie spektro formos skirtumai rodo, kad šių audinių savosios fluorescencijos spektrą formuoja keletas skirtingų endogeninių porfirinų. Endogeniniam protoporfirinui IX būdingos fluorescencijos smailės ties 636 nm ir 706 nm, tuo tarpu vandenyje tirpūs endogeniniai porfirinai pasižymi fluorescencijos smailėmis ties 625 nm (koproporfirinas III) bei 620 nm (uroporfirinas III). Iš smegenų naviko skirtuminio spektro atėmus sveikų smegenų skirtuminį spektrą buvo gautas skirtuminis spektras, kuris savo forma ir fluorescencijos smailių padėtimis (ties 636 nm ir 706 nm) atitinka endogeniniam PpIX charakteringą fluorescencijos spektrą (2.9. pav. $I_{skirt.}(B-A)$). Taigi smegenų naviko savosios fluorescencijos spektre dominuoja endogeninis PpIX, tačiau taip

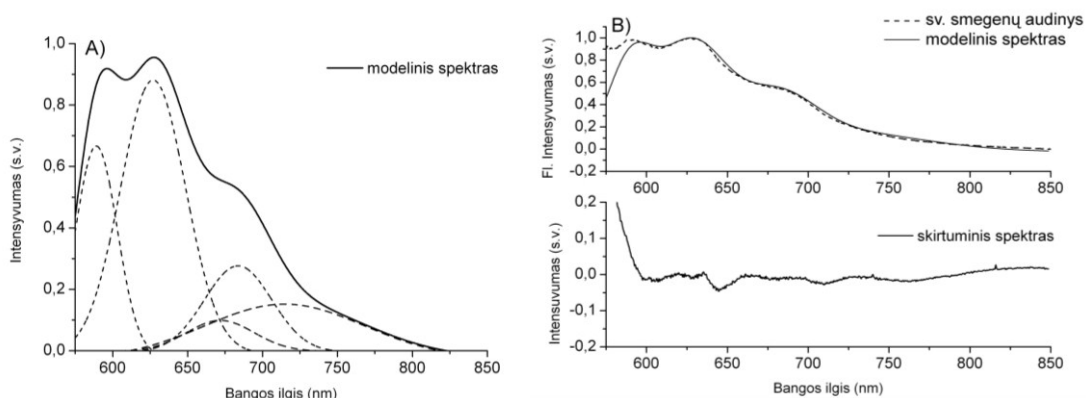


2.9. pav. Sveikų smegenų audinių ir naviko skirtuminiai spektrai: $I_{skirt.}(A)$ - iš sveikų smegenų audinių spektro atėmus gyvūno be naviko sveikų smegenų audinių spektrą, $I_{skirt.}(B)$ - iš smegenų naviko spektro atėmus gyvūno be naviko sveikų smegenų audinių spektrą, $I_{skirt.}(B-A)$ - iš smegenų naviko skirtuminio spektro atėmus sveikų smegenų audinių skirtuminį spektrą

pat yra ir kitų vandenyje tirpių endogeninių porfirinų, kurie dominuoja tik sveikų smegenų audinių savosios fluorescencijos spektre.

Siekiant parodyti, kad sveikų smegenų audinių savosios fluorescencijos spektre dominuoja tik vandenyje tirpūs endogeniniai porfirinai, pasitelkiant Origin Pro8 programinio paketo funkciją „Fit multi-peaks“ buvo sumodeliuotas sveikų smegenų audinių fluorescencijos spektras (2.10. pav. A). Pasirinktos penkios Gauso funkcijos, kurių smailių padėtys atitiko 590 nm, 626 nm, 671 nm, 684 nm ir 715 nm bangos ilgius, t.y. laikoma, kad sveikų smegenų audinyje dominuoja tik vandenyje tirpūs endogeniniai porfirinai, kurių fluorescencijos smailės yra ties 626 nm ir 684 nm. Smailės ties 590nm, 715 nm formuoja savosios fluorescencijos bazinę spektro formą (t.y. pradinį lygmenį ties 600 nm ir ilgabangį šlaitą virš 710 nm), tuo tarpu smailė ties 671 nm buvo įskaityta atsižvelgiant į eksperimentinius rezultatus bei spektro formos pokyčius ties šiuo bangos ilgiu (gali būti sąlygota fluorescuojančio pašaro pigmento, susidarantių degradacinių produktų arba kaip kitų vandenyje tirpių endogeninių porfirinų antroji smailė).

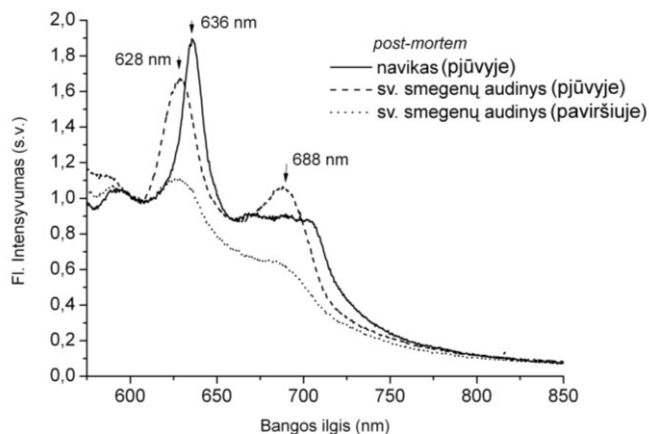
Gautas modelinis penkių Gauso funkcijų suminis spektras savo forma sutampa su eksperimentiniu sveikų smegenų savosios fluorescencijos spektru (2.10. pav. B). Taigi, galime teigti, kad sveikų smegenų audinių savosios fluorescencijos spektrą formuoja vandenyje tirpūs porfirinai. Antrosios fluorescencijos smailės formai įtakos gali turėti ir fluorescuojančio pigmento smailė ties 671 nm.



2.10. pav. A) sveikų smegenų audinių modelinis spektras gautas susumavus penkias Gauso funkcijas: ties 590 nm (plotis – 27,7, intensyvumas – 0,68), 626 nm (plotis – 43,4, intensyvumas – 0,89), 671 nm (plotis – 44,9, intensyvumas – 0,1), 684 nm (plotis – 44,9, intensyvumas – 0,28) ir 715 nm (plotis – 106,7, intensyvumas – 0,18). B) normuoti sveikų smegenų audinių ir modelinis spektrai bei jų skirtuminis spektras

Taigi smegenų naviko savosios fluorescencijos spektre dominuoja PpIX, o taip pat yra ir vandenyje tirpių endogeninių porfirinų, kurių santykinis kiekis identiškas sveikų smegenų audinių atvejui. Tuo tarpu gyvūnų su implantuotu naviku sveikų smegenų audinių savosios fluorescencijos spektre išskirtinai dominuoja tik vandenyje tirpūs endogeniniai porfirinai, tačiau šie porfirinai nėra stebimi gyvūnų be naviko sveikų smegenų audiniuose (kontrolinė sritis).

Užregistruoti gyvūnų su implantuotu naviku sveikų smegenų audinių ir smegenų naviko savosios fluorescencijos spektrai *in vivo* buvo palyginti su šių audinių fluorescencijos spektrais *post-mortem* (*ex vivo*) (2.11. pav.). Nustatyta, kad tiek savosios fluorescencijos spektro smailių padėtys, tiek ir naviko sutampa su fluorescencijos spektrų smailių padėtimis užregistruotomis *in vivo* (2.7. pav.).



2.11. pav. Normuoti sveikų smegenų audinių ir smegenų naviko savosios fluorescencijos spektrai *post-mortem* (*ex vivo*). Spektrai sunormuoti į vienetinį intensyvumą ties 600 nm

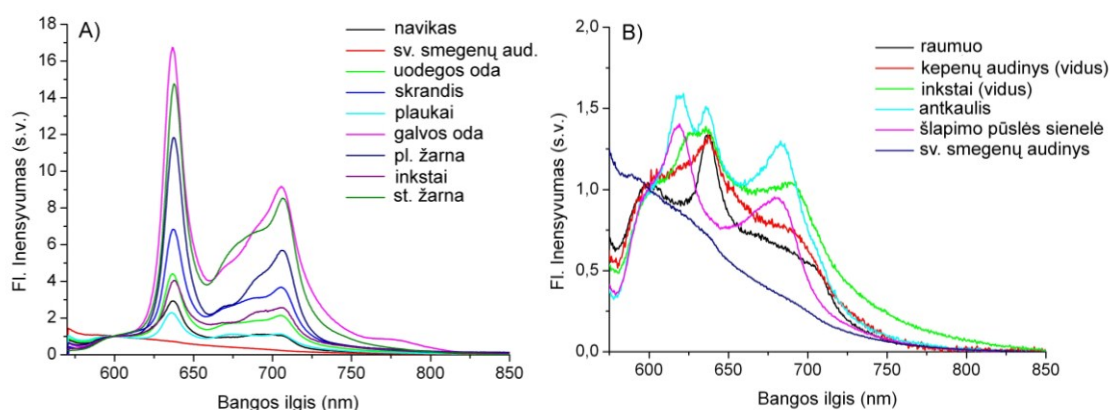
Smegenų naviko fluorescencijos spektre, užregistruoto navikinio darinio pjūvyje po gyvūno mirties, dominuoja endogeninis protoporfirinas IX. Tuo tarpu sveikų smegenų audinių savosios fluorescencijos spektre (*post-mortem*, užregistruota pjūvyje), matomos aiškios, vandenyje tirpių endogeninių porfirinų fluorescencijos smailės (ties 628 nm ir 688 nm). Be to, skiriasi ir fluorescencijos santykinis intensyvumas spektrus registruojant nuo audinio paviršiaus ar padarius tiriamo audinio pjūvį ir užregistravus giliau esančių audinių savosios fluorescencijos spektrą.

Taigi navikinių darinių lokalizavimui, o tuo pačiu ir smegenų audinių diferenciacijai, taikant savosios fluorescencijos metodą, tikslinga vertinti to paties gyvūno sveikų audinių ir smegenų naviko integrinių intensyvumų santykį

$I_{620-660}(sv.aud.)/I_{620-660}(nav.)$, apibrėžiantį endogeninio protoporfirino santykinio kiekio pokytį glijos naviko atveju. Norint gauti didesnę optinį kontrastą, integrinio intensyvumo vertę galima skaičiuoti vadovaujantis sveikų smegenų audinių ir naviko skirtuminiais spektrais.

2.3.1.2. Eksperimentinių gyvūnų skirtingų audinių savosios fluorescencijos tyrimo ex vivo rezultatai

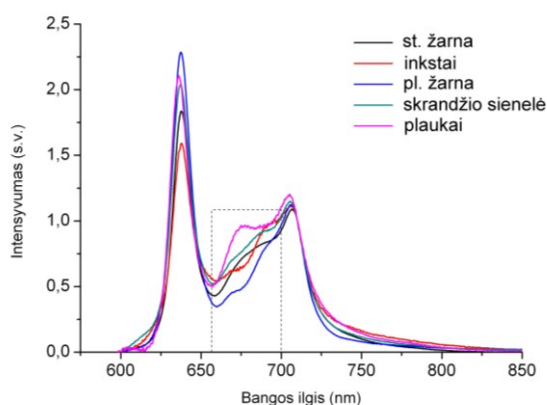
Tiriant įvairių Wistar linijos žiurkių (gyvūnai su naviku) skirtingų audinių savąją fluorescenciją pastebėta, kad kai kurie audiniai (pvz., oda, antkaulis ir kt.) pasižymi daug intensyvesne fluorescencija raudonoje spektro srityje su endogeniniam protoporfirinui charakteringomis fluorescencijos smailėmis registruojamame spektre. Atlikti tyrimai ex vivo parodė, kad beveik visuose (išskyrus sveikų smegenų baltąją substanciją, kontrolinė sritis) Wistar linijos žiurkių audinių savosios fluorescencijos spektruose dominuoja endogeninio protoporfirino smailės ties 636 nm ir 707 nm, tačiau skiriasi jų santykinis intensyvumas (2.12. pav. A). Didžiausia santykinė endogeninio protoporfirino koncentracija nustatyta odoje ir virškinamajame trakte (skrandis, pl. ir st. žarna), o mažiausia - plaukuose. Tuo tarpu sveikų smegenų (kontrolinė sritis) savosios fluorescencijos spektre jokių endogeniniam porfirinui charakteringų smailių nėra. Taigi fluorescencijos intensyvumo pokyčiai ties 636 nm atspindi PpIX koncentracijos skirtumus eksperimentinių gyvūnų audiniuose.



2.12. pav. Normuoti skirtingų audinių (gyvūnai su smegenų naviku) savosios fluorescencijos spektrų vidurkiai užregistruoti ex vivo (n=3). Spektrai sunormuoti į vienetinį intensyvumą ties 600 nm

Įvertinus integrinio fluorescencijos intensyvumo vertę (suintegravus plotą po kreive 620 – 660 nm spektrinėje srityje) nustatyta, kad naviko fluorescencija 2,6 karto intensyvesnė nei sveikų smegenų audinio. Tuo tarpu odos savoji fluorescencija 3,6 karto intensyvesnė nei naviko ir 9,4 karto nei sveikų smegenų audinio.

Atlikta palyginamoji normuotų skirtuminių spektrų analizė (iš tiriamo audinio spektro atimant sveikų smegenų savosios fluorescencijos spektrą, kaip atraminį dėka endogeniniams porfirinams nebūdingų fluorescencijos smailių) parodė, kad šių audinių fluorescencijos spektro formos skirtumai 650 – 700 nm spektrinėje srityje, galimai yra sąlygoti fluorescuojančio pigmento ties 670 nm (2.13. pav.).



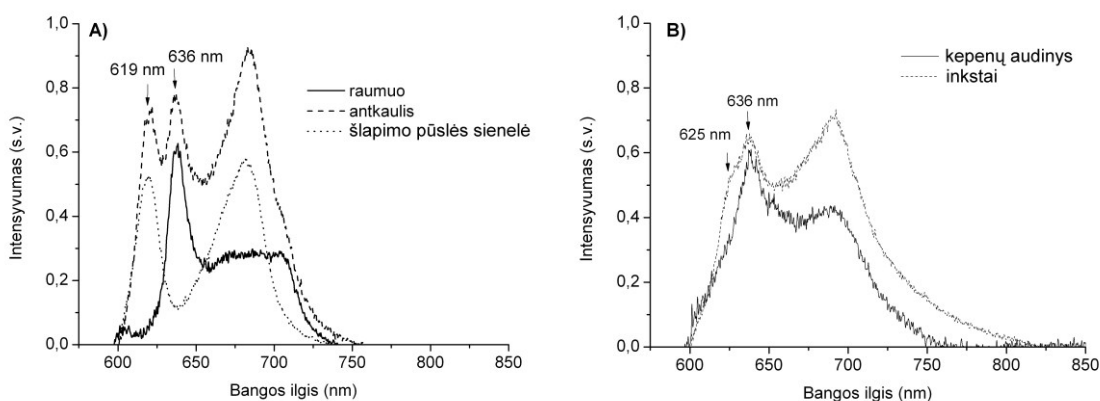
2.13. pav. Normuoti skirtuminiai skirtingų audinių savosios fluorescencijos spektrai. Spektrai sunormuoti į vienetinį intensyvumą ties 710 nm

Tiriant kai kurių kitų audinių savąją fluorescenciją *ex vivo*, buvo nustatytas ir vandenyje tirpių endogeninių porfirinų indėlis į registruojamą spektrą (2.12. pav. B). Antkaulio ir šlapimo pūslės savosios fluorescencijos spektre atsiranda dvi papildomos smailės: išraiškina smailė ties 620 nm ir 680 nm. Inkstų vidaus audinių fluorescencijos spektre taip pat stebime spektro formos iškreipimus ties 625 nm. Tuo tarpu kepenų tiek išorės, tiek vidaus audinių savosios fluorescencijos spektrai pasižymėjo tik nedideliais spektriniais pokyčiais ties 620 nm su nežymia smaile ties 636 nm.

Skirtuminių spektrų analizė parodė, kad šlapimo pūslės sienelės savosios fluorescencijos spektre dominuoja vandenyje tirpūs endogeniniai porfirinai su smaile ties 619 nm ir 684 nm (uroporfirinas III), tuo tarpu nugaros raumens savosios fluorescencijos spektre vyrauja endogeninis protoporfirinas (smailės ties

636 nm ir 706 nm) (2.14. pav. A). Antkaulio skirtuminiame spektre matomos tiek vandenyje tirpių endogeninių porfirinų, tiek ir protoporfirino fluorescencijos smailės.

Inkštų ir kepenų skirtuminiuose savosios fluorescencijos spektruose matoma endogeninio protoporfirino smailė ties 636 nm bei stebimas spektro formos iškreipymas ties 625 nm ir 690 nm atitinkamai (2.14. pav. B). Be endogeninio protoporfirino, šiuose audiniuose yra ir vandenyje tirpių endogeninių porfirinų fluorescuojančių ties 625 nm ir 691 nm (koproporfirinas III).



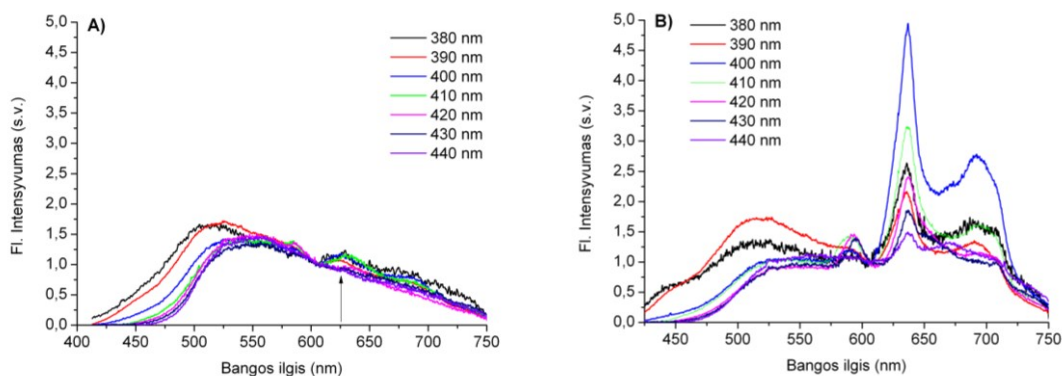
2.14. pav. Skirtingų audinių skirtuminiai savosios fluorescencijos spektrai

Galima pažymėti, kad gyvūnų, kuriems implantuotas smegenų navikas, skirtingų audinių savosios fluorescencijos spektrai pasižymi savitu įvairių endogeninių porfirinų kiekiu, todėl fluorescencijos intensyvumo, kaip audinyje susikaupusio endogeninio protoporfirino IX santykinio kiekio vertinimas galimas tik lyginant to paties tipo audinius. Natūralus endogeninių porfirinų kaupimasis įvairiuose audiniuose skirtingais kiekiais gali būti charakteringas šios veislės gyvūnų bruožas ir yra sąlygotas įgimtų ir specifinių organizmo hemo biosintezės ciklo reguliacinių mechanizmų.

2.3.1.3 C6 gliomos savosios fluorescencijos tyrimo ex vivo rezultatai

Atrankiai žadinant savąją fluorescenciją nustatyta, kad dėl pakitusių apykaitos procesų smegenų navike (eksperimentinė C6 glioma) registruojami spektrai pasižymi specifiniais skirtumais lyginant su sveikų smegenų struktūromis (kontrolinė sritis). Priklausomai nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio, sveikose smegenyse intensyviausia fluorescencija 420-580 nm spektriniame

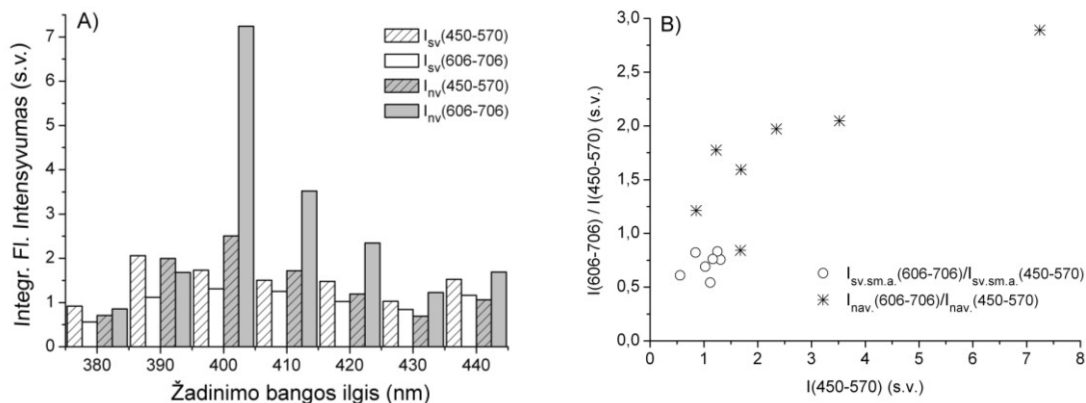
intervale, kur fluorescuoja NADH, flavinai arba jų dariniai, o naviko fluorescencijos intensyvumas didžiausias 600-700 nm spektrinėje srityje, dėl endogeninių porfirinų indėlio į registruojamą fluorescencijos spektrą (2.15. pav. A ir B).



2.15. pav. Normuotų sveikų smegenų (A) ir C6 smegenų gliomos (B) savosios fluorescencijos spektrų vidurkiai užregistruoti žadinant skirtingų bangos ilgių spinduliuote, ($n=2$). Spektrai sunormuoti į vienetinį intensyvumą ties 605 nm

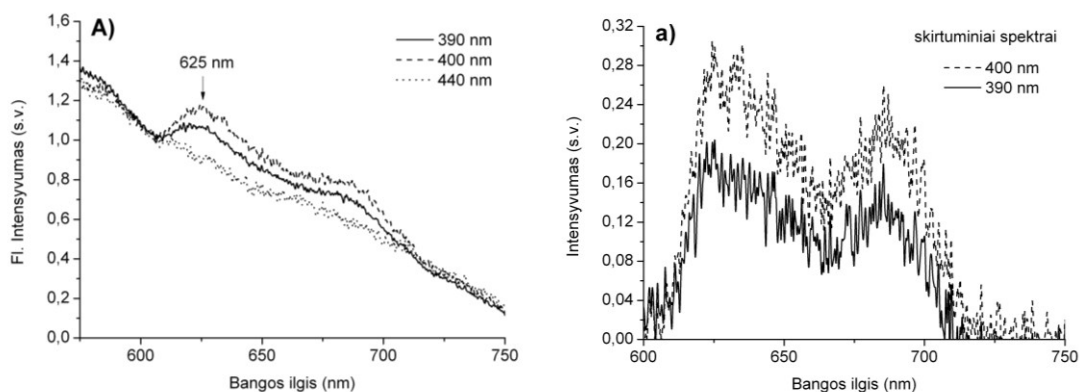
Lyginant apskaičiuotų integrinių intensyvumų vertes 450 – 570 nm ir 606 – 706 nm spektriniuose intervaluose nustatyta, kad endogeninių porfirinų fluorescencija (606 – 706 nm) smegenų navike daug intensyvesnė nei sveikų smegenų audinių žadinant 380 – 440 nm bangos ilgio spinduliuote, tuo tarpu naviko fluorescencijos intensyvumas mėlynoje – žalioje spektrinėje srityje (450 – 570 nm) yra didesnis žadinant 400 – 410 nm bangos ilgio spinduliuote (2.16. pav. A). Skaičiuodami integrinių intensyvumų santykį raudonoje ir mėlynoje – žalioje spektrinėje srityse, naviko atveju gautume didesnes santykio vertes nei sveikų smegenų audiniui, o tai galima būtų panaudoti šių audinių diferenciacijai (2.16. pav. B). Naviko atveju, apskaičiuotų integrinio intensyvumo santykio verčių išsibarstymas yra daug didesnis nei sveikų smegenų audinių, bei parodo šių audinių metabolinių procesų skirtumus - atsiranda tam tikrų endogeninių fluoroforų santykinio kiekio pakitimai dėl patologijos.

Tačiau vertindami fluorescencijos integrinio intensyvumo reikšmes tik raudonoje spektro srityje, kurioje dominuoja endogeniniai porfirinai, fluorescencija turėtų būti žadinama 400-420 nm bangos ilgio spinduliuote. Tokiu būdu, dėka efektyvaus PpIX fluorescencijos sužadavimo galimybė atskirti sveiką smegenų audinį nuo C6 gliomos padidėja.



2.16. pav. A - sveikų smegenų audinių ir smegenų naviko (C6 glioma) fluorescencijos integrinių intensyvumų vertės skirtinguose spektriniuose intervaluose. B - sveikų smegenų audinių ir smegenų naviko (C6 glioma) fluorescencijos santykinių integrinių intensyvumų verčių pasiskirstymo žemėlapis

Pažymėtina, kad tiek 101.8 gliomos, tiek ir C6 gliomos sveikų smegenų audinių savosios fluorescencijos spektre stebime vandenyje tirpių endogeninių porfirinų fluorescencijos savitą braižą (2.7. pav. ir 2.17. pav.).

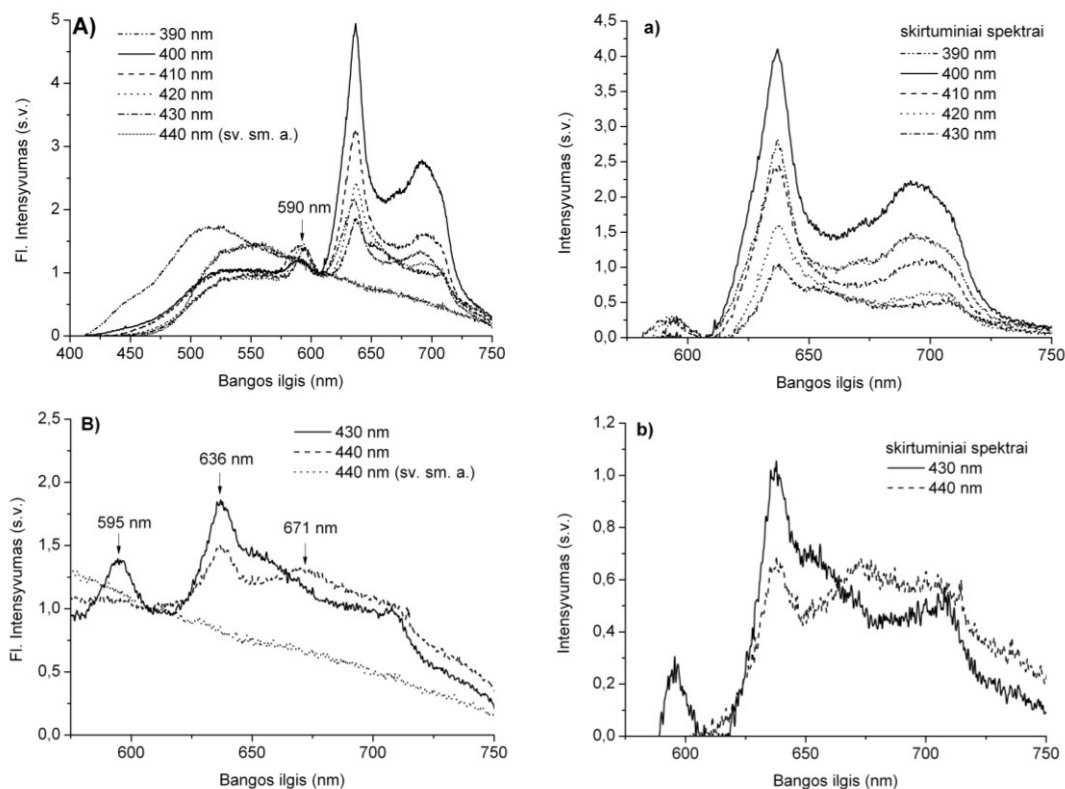


2.17. pav. Normuoti sveikų smegenų audinių savosios fluorescencijos spektrai (A) bei jų skirtuminiai spektrai (a) žadinant skirtingo bangos ilgio spinduliuote. Spektrai sunormuoti į vienetinį intensyvumą ties 605 nm

Žadinant 380 – 400 nm bangos ilgio spinduliuote sveikų smegenų audinių (gyvūnas su C6 glioma) savosios fluorescencijos spektre vyrauja nedideli spektro formos iškreipymai 600 – 700 nm spektrinėje srityje. Atėmus sveikų smegenų audinių spektrą be charakteringųjų spektro iškreipimų minėtoje srityje (paimtas sv. smegenų spektras žadinant 440 nm bangos ilgio spinduliuote), gautas skirtuminis spektras iliustruojantis vandenyje tirpių porfirinų, fluorescuojančių ties 625 nm ir 686 nm, buvimą (2.17. pav.).

Lyginant normuotų smegenų naviko savosios fluorescencijos spektrų formos skirtumus nustatyta, kad keičiant žadinančios spinduliuotės bangos ilgį

fluorescencijos spektruose vyrauja endogeniniams porfirinams charakteringos smailės, tuo tarpu žadinant nuo 400 nm iki 430 nm - išryškėja dar viena fluorescencijos smailė ties 590 nm. Sveikam smegenų audiniui ši smailė beveik nėra charakteringa. Tik labai nežymūs spektro formos pokytis įžvelgiamas ties 590 nm žadinant 410 ir 420 nm bangos ilgio spinduliuote.



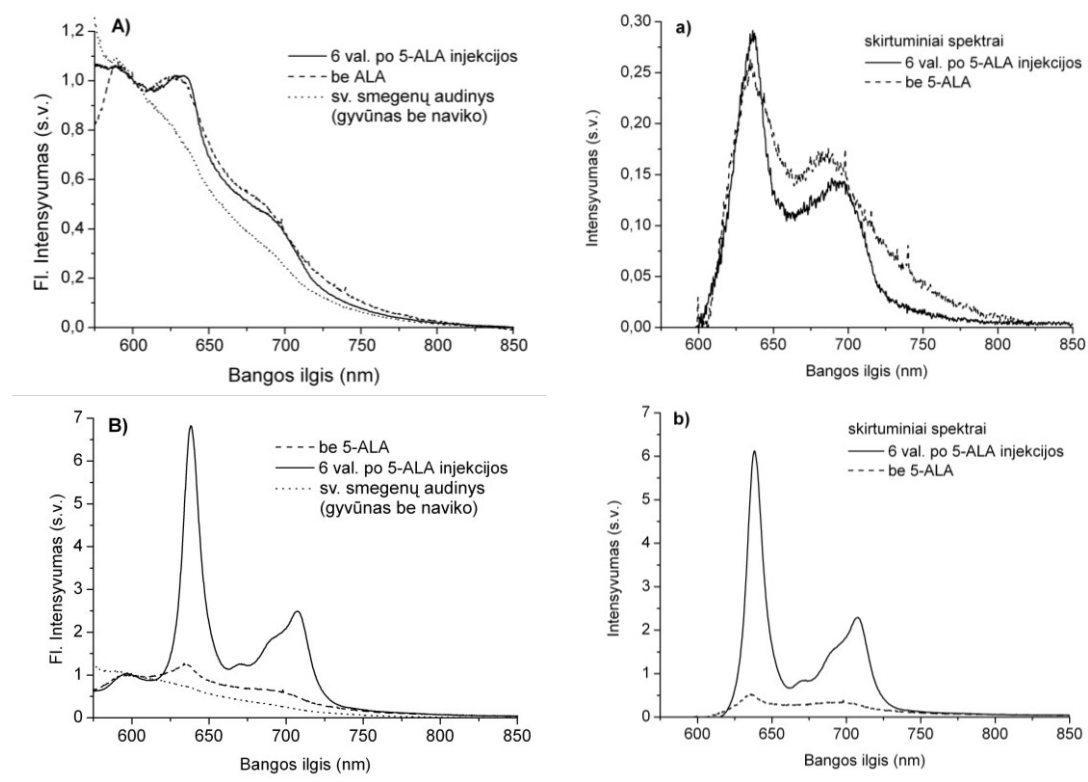
2.18. pav. Normuoti smegenų naviko (A,B) ir sveikų smegenų audinių savosios fluorescencijos spektrai bei jų skirtuminiai spektrai (a ir b) žadinant skirtingo bangos ilgio spinduliuote. Spektrai sunormuoti į vienetinį intensyvumą ties 605 nm

Panašiai kaip ir 101.8 gliomos atveju, C6 gliomos savosios fluorescencijos spektruose dominuoja endogeninis protoporfiras IX bei, taip pat, matoma vandenyje tirpių porfirinų daroma įtaka. Žadinant 440 nm bangos ilgio spinduliuote, skirtuminiame spektre išryškėja fluorescencijos smailė ties 671 nm, kuri stebima tik navike (2.18. pav. b).

2.3.2. Eksperimentinio spektrofluorimetrinio metodo diagnostinių rodiklių skaičiavimo rezultatai

Panaudojus perteklinę egzogeninio 5-ALA dozę, biologiniame audinyje sutrikdomas natūralus hemo biosintezės ciklas, dėl to organizme ima kauptis

endogeninis protoporfirinas IX. Dėl navikinėms ląstelėms būdingų metabolinių pokyčių, PpIX selektyviau kaupiasi navikiniame audinyje nei sveikame. Fluorescencijos intensyvumo pokyčiai ties 636 nm atspindi PpIX koncentracijos kitimą eksperimentinių gyvūnų audiniuose, tokiu būdu galima įvertinti per kiek laiko po 5-ALA intraveninės injekcijos susikaupia maksimali fotosensibilizatoriaus koncentracija. Tiriant 5-ALA indukuoto protoporfirino IX kaupimąsi nustatyta, kad didžiausias kontrastas tarp sveiko ir eksperimentinio glijos naviko gautas praėjus 6 valandoms po intraveninės 5-aminolevulininės rūgšties injekcijos (naudojant 300 mg/kg dozę). Normuoti sveikų smegenų ir gliomos savosios bei 5-ALA sensibilizuotos fluorescencijos spektrinės charakteristikos pateiktos 2.19 A ir B paveiksluose.

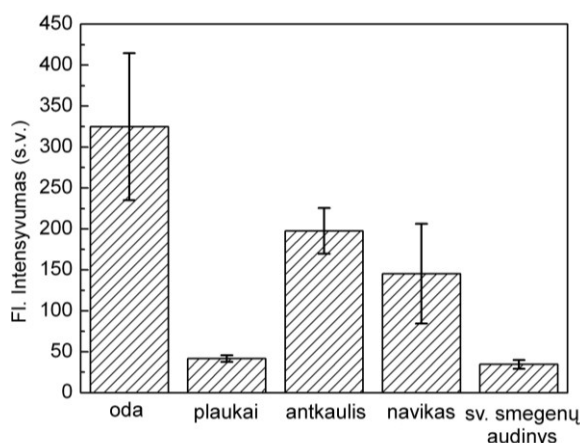


2.19 pav. A) sveikų smegenų audinių savosios ir 5-ALA indukuoto PpIX (6 val. po 300 mg/kg i.v. injekcijos) fluorescencijos spektrų vidurkiaiai. B) smegenų naviko 101.8 gliomos savosios ir 5-ALA indukuoto PpIX (6 val. po 300 mg/kg i.v. injekcijos) fluorescencijos spektrų vidurkiaiai. (a) ir (b) – skirtuminiai spektrai prieš ir po 5-ALA injekcijos. Spektrai sunormuoti į vienetinį intensyvumą ties 600 nm

Lyginant sveikų smegenų fluorescencijos spektrus po intraveninės 5-ALA injekcijos ir prieš, matome, kad fluorescencijos spektrų forma bei intensyvumas beveik nepasikeitė (2.19. pav. A). Eksperimento metu nustatyta, kad gyvūnų su

navikais sveiki smegenų audiniai beveik nekaupia PpIX - būdingas tik nežymus fluorescencijos padidėjimas pirmosiomis valandomis po 5-ALA injekcijos, o fluorescencijos spektruose dominuoja vandenyje tirpūs endogeniniai porfirinai (kaip ir savosios fluorescencijos atveju) (2.19. pav. a). To priežastimi matomai yra nepažeistas hematoencefalinis barjeras ribojantis 5-ALA ir PpIX apykaitą bei hemo biosintezės ciklą reguliuojančių fermentų aktyvumas. Tuo tarpu smegenų navike po 5-ALA injekcijos stebime selektyvų indukuoto PpIX kaupimąsi dėl ko fluorescencijos spektre išryškėja dvi protoporfirinui IX būdingos smailės ties 636 nm ir 707 nm (2.19. pav. B).

Ištirus įvairių kitų žiurkės audinių fluorescencijos savitumus nustatyta, kad skirtingi audiniai geba sukaupti skirtingus protoporfirino IX kiekius praėjus šešioms valandoms po intraveninės injekcijos. Lyginamoji įvairių audinių sensibilizuotos fluorescencijos spektrų analizė atlikta sunormavus spektrų vidurkius į vienetinį intensyvumą ties 600 nm bei suskaičiavus integrinių intensyvumų vertes 620-660 nm spektrinėje srityje, atitinkančioje PpIX intensyviausios smailės padėtį (2.20. pav.). Intensyviausia PpIX fluorescencija užregistruota odoje (maždaug 9 kartus didesnė nei sveikų smegenų audinio). Tuo tarpu antkaulio fluorescencija 1,4 karto intensyvesnė nei naviko ir 5,7 karto nei sveikų smegenų audinio. Gauti eksperimentiniai duomenys rodo, kad operacijos metu itin svarbu atidžiai parinkti tiriamą vietą siekiant išvengti klaidinančios informacijos dėl greta esančių intensyviau fluorescuojančių kitų audinių.



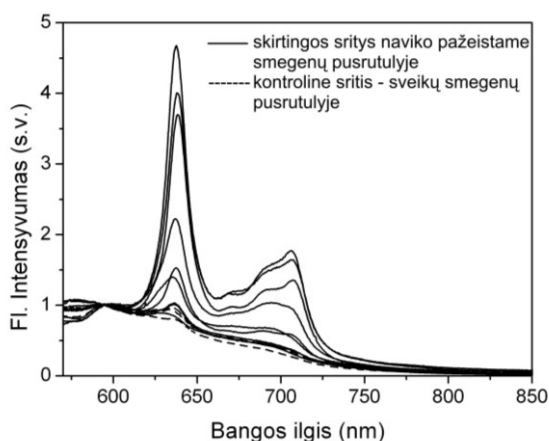
2.20. pav. Skirtingų audinių PpIX fluorescencijos intensyvumas praėjus 6 val. po 5-ALA intraveninės injekcijos. Vertės pateiktos kaip vidurkis \pm vidutinis kvadratinis nuokrypis (SD) (reikšmingumo lygmuo $p=0,05$). ($n_o.=5$, $SD=89,7$; $n_{pl.}=6$, $SD=3,9$; $n_{antk.}=6$, $SD=27,7$; $n_{nv.}=6$, $SD=60,8$; $n_{sv.sm.}=6$, $SD=5,4$)

Palyginus kitų sensibilizuotų žiurkės audinių fluorescencijos intensyvumo vertę su savosios fluorescencijos intensyvumu nustatyta, kad sensibilizuotos odos

fluorescencijos intensyvumas išauga iki dviejų kartų, plaukų fluorescencijos intensyvumas nepakinta, tuo tarpu antkaulio fluorescencijos intensyvumas padidėja iki keturių kartų.

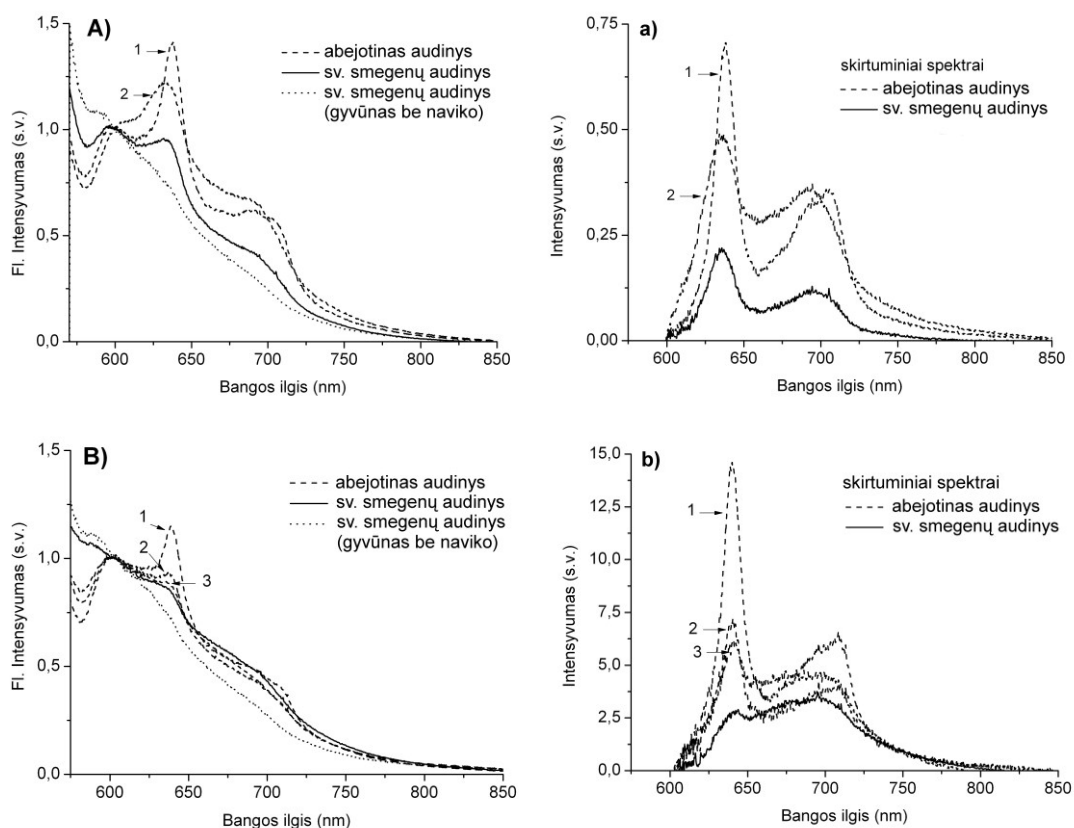
Eksperimento metu nustatyta, kad registruojamo optinio kontrasto dydį įtakojo smegenų dangalas. Gauta, kad smegenų dangalas iki dviejų kartų padidina smegenų audinių fluorescencijos signalą. Tai itin aktualu vertinant sveikų smegenų audinio 5-ALA indukuojamo PpIX fluorescencijos intensyvumą. Todėl visų atliekamų bandymų metu dangalai buvo pašalinami ir registruojama baltosios smegenų substancijos fluorescencija.

Kiekvieno eksperimentinio gyvūno atveju buvo registruojami fluorescencijos spektrai iš keturių skirtingų smegenų audinio vietų: pasirenkamos trys skirtingos sritys pažeistame smegenų pusrutulyje (atitinkančios naviką, abejotiną naviką bei abejotiną sveiką audinį) ir viena kontrolinė sritis - sveikų smegenų audinių fluorescencijai iš priešingo smegenų pusrutulio. 2.21 pav. pateikti naviko pažeisto smegenų pusrutulio skirtingų vietų ir sveikų smegenų fluorescencijos spektrų vidurkiai. Pažymėtina, kad fluorescencijos intensyvumai skirtinguose naviko pažeisto smegenų pusrutulio taškuose yra skirtingi. To priežastimi yra sparti navikinių ląstelių proliferacija ir infiltratyvus naviko augimo pobūdis bei neaiškios ribos, ko pasėkoje greta centrinės gliomos vietos (skiepijimo vieta) atsiranda įvairios paribinės sritys, kuriose vyksta navikinių ląstelių infiltracija į greta esančius sveikus smegenų audinius. Tokiu būdu, dalis žadinančios spinduliuotės formuojamo šviesos lauko apima navikines ląsteles, o kita - sveikas smegenų ląsteles.



2.21. pav. Normuoti sveikų smegenų (kontrolinė sritis) ir naviko pažeistos (abejotinas audinys) smegenų srities fluorescencijos spektrų vidurkiai ($n_{nav.sr.}=9$, $n_{sv.sm.}=3$). Spektrai užregistruoti praėjus 6 val. po 5-ALA dozės i.v. injekcijos

Lyginant normuotų sveikų smegenų (kontrolinė sritis) ir abejotino audinio srities (naviko pažeistas smegenų pusrutulius) fluorescencijos spektrų vidurkius nustatyta, kad tais atvejais, kai neturime naviko pažeistų smegenų audinių struktūrų (navikinės ląstelės buvo implantuotos į eksperimentinį gyvūną tačiau navikas neužaugo (2.22. pav. B) arba jo ląstelingumas nėra didelis (2.22. pav. A)), fluorescencijos spektruose dominuoja PpIX būdingos smailės, tačiau jų intensyvumas ženkliai mažesnis nei navikinio darinio atveju (2.21. pav. ir 2.22. pav.).



2.22. pav. Skirtingų gyvūnų (A ir B) normuoti sveikų smegenų ir naviko pažeistų smegenų audinių struktūrų fluorescencijos spektrų (užregistruotų kontrolinėje srityje ir naviko pažeistame smegenų pusrutulyje) vidurkiai. A) naviko ląstelingumas mažas, B) naviko nėra. Spektrai užregistruoti praėjus 6 val. po 5-ALA dozės i.v. injekcijos (sunormuoti ties 600 nm)

2.22 paveikslo A iliustracijoje pateikti eksperimentinio gyvūno smegenų audinių fluorescencijos tyrimo rezultatai, kuomet praėjus 12 parų po naviko implantacijos, naviko ląstelingumas yra mažas ir mikroskopu stebimas infiltratyvus naviko augimas smegenų paviršiuje. Šiuo atveju, abejotinas audinys skiepijimo vietoje (pažymėta 1) yra naviko užuomazga, o šalia pasirinkta abejotino audinio

sritis (pažymėta 2) – sveikas smegenų audinys (remiantis morfologo išvada). Skirtuminių spektrų analizė parodė, kad pirmu numeriu paženklintos abejotino audinio srities spektre dominuoja protoporfirino IX fluorescencijos smailės, tuo tarpu antruoju numeriu paženklintos srities spektre vyrauja vandenyje tirpių endogeninių porfirinų braižas, kuris stebimas ir sveikų smegenų spektre (kontrolinė sritis) tik mažesnio santykinio intensyvumo. Tuo atveju, kai praėjus 12 parų po naviko implantacijos eksperimentinio naviko neturime (navikas neužaugo), tik nežymus PpIX fluorescencijos pėdsakas stebimas naviko skiepijimo vietoje (2.22. pav. B, pažymėta 1 numeriu). Šalia esančių abejotinių smegenų sričių fluorescencijos spektrai savo forma ir santykiniu intensyvumu labiau panašūs į sveikų smegenų audinių (kontrolinė sritis) fluorescencijos spektrą.

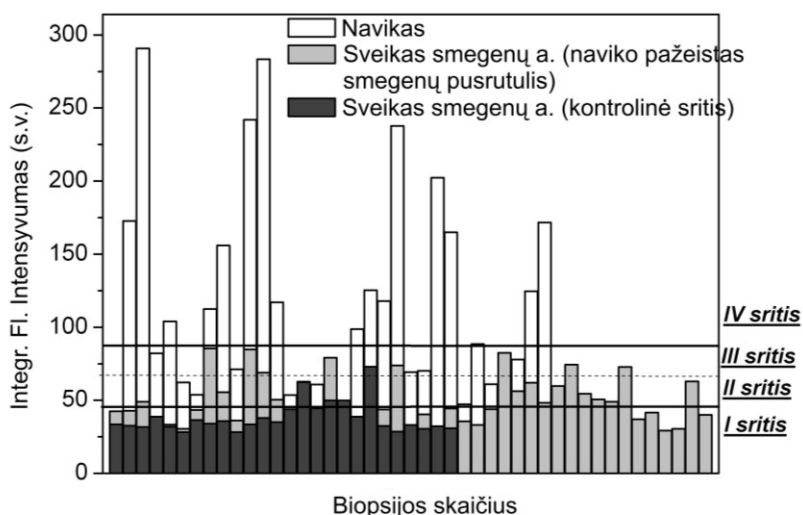
Protoporfirino kaupimasis pažeisto pusrutulio smegenų struktūrose yra sąlygotas pažeisto hematoencefalinio barjero naviko skiepijimo procedūros metu, bei lėmė 5-ALA ir PpIX apykaitą. Todėl nežymus PpIX fluorescencijos pėdsakas gali būti registruojamas skiepijimo pažaidos vietoje, bei nežymiai įtakoti sveikų smegenų fluorescenciją dėka vandenyje tirpių porfirinų santykinio kiekio padidėjimo. Pažymėtina, kad net ir tais atvejais, kai naviko ląstelingumas mažas, šalia naviko esančių audinių fluorescencijos signalas santykinai padidėja labiau, nei tais atvejais, kai naviko neturime. T.y. navike vyksta spartesnė PpIX sintezė bei didesnė dalis vandenyje tirpių porfirinų yra išplaunama į aplinkinius sveikus smegenų audinius dėka edemos. Tokiu būdu fluorescencijos vazidinimo eksperimentuose padidėjusi porfirinų koncentracija gali klaidinti vertinant paribines naviko išplitimo ribas į greta esančius sveikus smegenų audinius. Tačiau spektriniai pokyčiai aiškiai parodo vandenyje tirpių porfirinų ir PpIX indėlį, bei leidžia atskirti edemos sąlygotą smegenų sensibilizaciją bei naviką – dėka navikui būdingos PpIX apykaitos.

Siekiant statistiškai įvertinti spektrofluorimetrinio metodo galimybes identifikuoti eksperimentinį galvos smegenų naviką – 101.8 gliomą, buvo atlikti eksperimentiniai tyrimai nustatyti vidutinę sveikų smegenų ir naviko fluorescencijos intensyvumų skiriamąją ribinę vertę. Vertinant normuotų sveikų smegenų struktūrų ir naviko fluorescencijos spektrų vidurkių integrinio

intensyvumo vertes, gautas suintegravus plotą po pirmąją PpIX smaile (620 – 660 nm spektriniame intervale), nustatyta, kad vidutinė sveiko smegenų audinio fluorescencijos intensyvumo vertė siekia 40 ± 13 s.v., tuo tarpu navikui – 116 ± 73 s.v. (sveikų smegenų struktūros analizė atlikta vertinta 20 bandinių duomenis ir esant morfologinio tyrimo atsakymui – sveikas audinys; naviko analizė atlikta vertinant 19 bandinių duomenis ir esant morfologinio tyrimo atsakymui - navikas). Gautos skaitinės vertės atspindi PpIX indėlį į bendrą registruojamą tam tikros smegenų srities fluorescencijos spektrą.

Remiantis atliktos analizės duomenimis buvo nustatytos ribinės vertės galvos smegenų navikui ir sveikų smegenų audiniui atskirti: navikui – 87 s.v. (vertė gauta $(I_{nav}^{(max)}/2 + I_{sv}^{(min)}/2)/2$), sveikam smegenų audiniui – 43,5 (=87/2) s.v. Tiriamasis audinys, kurio integrinio intensyvumo vertė > 87 s.v. buvo priskiriamas navikui (IV sritis), jei vertė < 87 s.v. bet $> 43,5$ s.v. – abejotinam audiniui (II ir III sritis), tuo tarpu vertės $< 43,5$ s.v. – priskiriama tikrai sveikam smegenų audiniui (I sritis). Abejotino audinio sritis papildomai buvo padalinama į dvi lygias dalis $((87-43,5)/2 = 65,2)$. Integrinių intensyvumų sritis nuo 43,5 s.v. iki 65,2 s.v. – bandiniai priskiriami abejotinam sveikam audiniui (II sritis), tuo tarpu srityje 65,2 s.v. iki 87 s.v. – abejotinas navikas (III sritis).

Kiekybiniam 5-aminolevulininės rūgšties indukuotu protoporfirino IX sensibilizuotų galvos smegenų gliomų intraoperacinės fluorescencinės diagnostikos metodo patikimumo įvertinimui eksperimente naudojome 27 gyvūnų duomenis. Eksperimentinio bandymo metu kiekvienai gyvūno tirtai smegenų struktūrų vietai buvo apskaičiuota integrinio intensyvumo vertė atitinkanti PpIX indėlį į bendrą registruojamą spektrą bei priskiriama vienai iš anksčiau įvardintų sričių: IV sritis - navikas, III sritis - abejotinas navikas, II sritis - abejotinas sveikas audinys ir I sritis - sveikas smegenų audinys. 2.23 paveiksle pateiktos kiekvienai paimtai biopsijai apskaičiuotos integrinių intensyvumų vertės bei skaitinių verčių ribos, pagal kurias eksperimentiškai tirtų audinio sričių duomenų vertės priskirtos atitinkamai grupei. Bandymo metu iš viso paimta 105 biopsijos, tačiau spektrofluorimetrinio metodo jautrumo, tikslumo ir specifiškumo skaičiavimai atlikti naudojant tik 99 biopsijų duomenis, kuriose rastas audinių žymėjimo dažas.



2.23. pav. Tirtų smegenų struktūrų skirtingų vietų, iš kurių buvo imama biopsija morfologiniam tyrimui, apskaičiuotų integrinių intensyvumų vertės gliomos 101.8 štamui. Horizontalios linijos žymi apskaičiuotas ribines vertes bandinių paskirstymui į atskiras sritis: I – tikrai sveikas audinys; II – abejotinas sveikas audinys; III – abejotinas navikas; IV – tikrai navikas. (kiekvieno pažymėto stulpelio spalva atitinka morfologinio tyrimo išvadą)

Kaip matyti iš pateikto paveikslo, beveik pusė apskaičiuotų skaitinių verčių patenka į paribinę sritį – abejotinas navikas/abejotinas sveikas audinys. Pažymėtina, kad pažeisto pusrutulio sveikų smegenų fluorescencijos intensyvumas yra santykinai didesnis nei sveikų smegenų fluorescenciją registruojant priešingame smegenų pusrutulyje (kontrolinė sritis). Tai gali sąlygoti tam tikras paklaidas vertinant naviko paribines sritis gretimuose sveikuose smegenų audiniuose.

Remiantis gautomis morfologinio tyrimo išvadomis buvo apskaičiuotos vidutinės integrinio intensyvumo vertės (pateiktos kaip vidurkis \pm vidutinis kvadratinis nuokrypis (SD)) galvos smegenų 101.8 gliomai ir sveikų smegenų audiniui. Nustatyta, kad vidutinė integrinio intensyvumo vertė galvos smegenų navikui – $115 \pm 70,5$ s.v. (minimali vertė – 42 s.v., maksimali vertė – 291 s.v.; 33 biopsijos, iš kurių 29-iose rastas audinių žymėjimo dažas), tuo tarpu sveikam smegenų audiniui – $45 \pm 15,5$ s.v. (minimali vertė – 28 s.v., maksimali vertė – 85,5 s.v.; 71 biopsija, iš kurių 70-yje rastas audinių žymėjimo dažas). Pastarąją grupę galima suskirstyti į dvi: sveikas smegenų audinys naviko pažeistame smegenų pusrutulyje – vidutinė vertė siekia $49 \pm 16,6$ s.v. (min – 29,2 s.v., max – 85,5 s.v.) ir

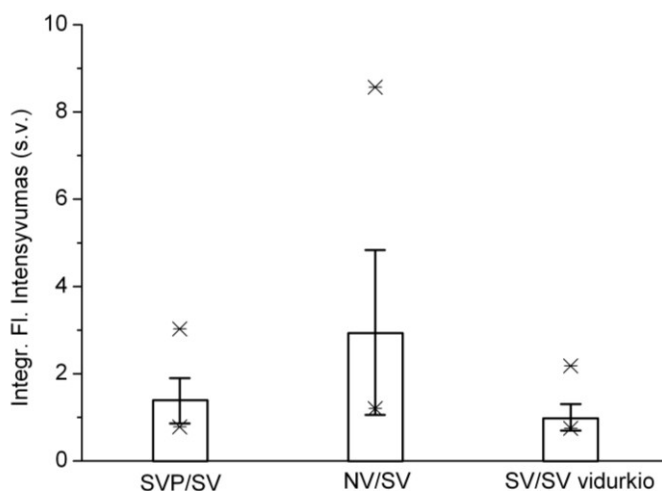
sveikas smegenų audinys fluorescenciją registruojant priešingame smegenų pusrutulyje – $38 \pm 10,7$ s.v. (min – 28 s.v., max – 73 s.v.).

Eksperimentinių duomenų analizė parodė, kad maždaug 40% visų integrinio intensyvumo verčių patenka į paribinę sritį – abejotinas navikas/abejotinas sveikas audinys (2.23. pav.). Nustatyta, kad naviko atveju 36,4% integrinio fluorescencijos intensyvumo skaitinių verčių yra mažesnės nei 87 s.v. (riba tarp abejotino audinio ir tikrai naviko), iš kurių 18,2 % yra mažesnės nei 65,2 s.v. (apskaičiuota ribinė vertė tarp abejotino sveiko audinio ir abejotino naviko). Tuo tarpu sveikam audiniui tik 10 % visų verčių (70 biopsijų) didesnės nei 65,2 s.v.

Remiantis tirtų audinio sričių atlikta klasifikacija, pagal integrinio intensyvumo skaitines vertes buvo sudarytos susijusių požymių lentelės bei apskaičiuotas taikyto metodo – vertinimas mikroskopo pagalba arba vertinimas remiantis spektrofluorimetriniais duomenimis - jautrumas (t.y. teisingai nustatytų patologijos (gliomos) diagnozių skaičius), specifiškumas (t.y. teisingai nustatytų sveikų atvejų (sveikas smegenų audinys) procentas) ir tikslumas (t.y. teisingų diagnozių ir visų diagnozių santykis). Siekiant optimizuoti spektrofluorimetrinių duomenų vertinimą, kiekvienai apskaičiuotai skaitinei vertei, apibrėžiančiai PpIX kiekį tiriamajame audinyje, buvo sudaryta jautrumo ir specifiškumo linijinė diagrama, kurios dėka nustatyta optimali skaitinė vertė, apibrėžianti minimalią naviko nediagnozavimo riziką (kuo didesnis spektrofluorimetrinio metodo jautrumas) išliekant kuo didesniui specifiškumui. ROC kreivių sankirtos taškas ties 62,2 skaitine verte būtent ir yra ta skiriamoji skaitinė vertė tarp mažos ir didelės naviko rizikos grupių. Pažymėtina, kad remiantis atliktu integrinių fluorescencijos intensyvumo verčių skaičiavimu, pagal kurias atliktas bandinių suskirstymas į tiriamąsias grupes statistinei analizei, skaitinė vertė skirianti abejotiną sveiką smegenų audinį ir abejotiną naviką lygi 65,2 s.v. Eksperimentinių duomenų statistinė analizė parodė, kad eksperimentinės operacijos metu galvos smegenų gliomos diagnozuotos 83 % jautrumu, 69 % specifiškumu ir 73 % tikslumu vertinant mikroskopu. Tuo tarpu intraoperaciniu spektrofluorimetriniu būdu žiurkių galvos smegenų piktybinės gliomos identifikuotos su 83 % jautrumu, 84 % specifiškumu ir 87 % tikslumu. Abiejų grupių metodų jautrumas,

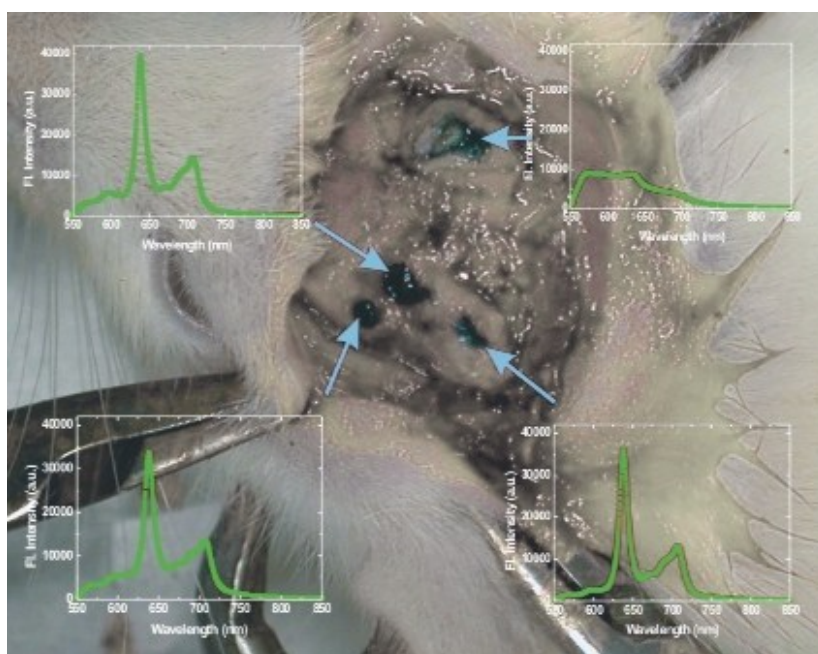
specifiškumas ir tikslumas skaičiuoti „auksiniu standartu“ (šimtaprocentinis patikimumas) laikant morfologinio tyrimo išvadas. Mūsų tyrimo duomenimis spektrofluorimetrinio metodo tikslumas (teisingų diagnozių skaičius) yra didesnis nei diagnozuojant mikroskopo kontrolėje. Pažymėtina, kad selektyvus PpIX kaupimasis galvos smegenų navike įgalina tiksliau diagnozuoti eksperimentinę gliomą operacijos metu. Įvertinti kiekybiniai parametrai rodo, kad spektrofluorimetrija galėtų būti papildoma efektyvi priemonė lokaliai gliomų chirurginiai diagnostikai.

Remiantis gautomis morfologinio tyrimo išvadomis buvo įvertintas optinis kontrastas tarp galvos smegenų naviko – 101.8 gliomos ir aplinkinių sveikų smegenų audinių. Padalinus to paties gyvūno naviko integrinio intensyvumo vertę, apskaičiuotą integruojant plotą po kreive 620 – 660 nm spektriniame intervale, iš sveiko smegenų audinio vertės (fluorescenciją registruojant kontrolinėje srityje) įvertinome optinio kontrasto dydį. Nustatyta, kad stebimas fluorescencijos kontrastas tarp sveikų smegenų ir naviko svyravo nuo 1:1,4 iki 1:8,7 (2.24. pav.). Vidutinė optinio kontrasto tarp sveikų smegenų audinio ir gliomos skaitinė vertė siekia $2,9 \pm 1,9$.



2.24. pav. Sveikų smegenų ir naviko optinio kontrasto verčių statistinis pasiskirstymas. NV/SV – naviko ir sveikų smegenų santykis (apskaičiuotas kiekvienam gyvūnui atskirai); SVP/SV – sveikų smegenų, naviko pažeistame pusrutulyje, santykis su sveiku smegenų audiniu iš priešingo smegenų pusrutulio (kontrolinės srities); SV/SV vidurkio – sveikų smegenų ir visų bandomųjų gyvūnų sveikų smegenų vidurkio santykis. Vertės pateiktos kaip vidurkis \pm vidutinis kvadratinis nuokrypis (SD) (reikšmingumo lygmuo $p=0,05$). ($n_{svp/sv}=32$, $SD=0,5$; $n_{nv/sv}=34$, $SD=1,9$; $n_{sv/sv(vid.)}=29$, $SD=0,3$; * – žymi maksimalią ir minimalią vertes)

2.25 paveiksle pateiktas vienas iš eksperimentinės chirurginės operacijos vaizdų, kuriame dažų pažymėtos trys abejotino audinio vietos naviko pažeistame smegenų pusrutulyje bei sveikų smegenų sritis priešingame smegenų pusrutulyje (kontrolinė sritis). Greta pateikti fluorescencijos spektrai užregistruoti pasirinktose vietose. Remiantis morfologinio tyrimo išvada: kairysis smegenų pusrutulius visas apimtas naviko, ką iliustruoja ir mūsų užregistruoti spektrai (išraiškingos PpIX smailės žyminčios sensibilizatoriaus santykinį kiekį audinyje), dešinysis smegenų pusrutulius – sveikas smegenų audinys (fluorescencijos spektre nėra PpIX būdingų smailių).



2.25. pav. Eksperimentinės chirurginės intervencijos vaizdas su pažymėtomis tirtomis audinių vietomis bei jose užregistruoti fluorescencijos spektrai (matavimai atlikti praėjus 6 val. po 300 mg/kg 5-ALA dozės i.v. injekcijos)

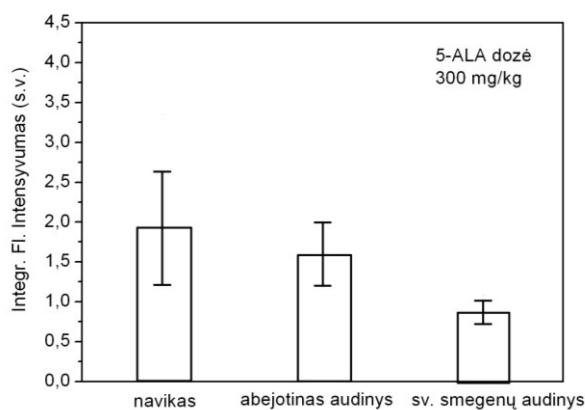
2.3.3. C6 gliomos fluorescencijos vaizdinimo in vivo tyrimo rezultatai

Remiantis skirtingose smegenų struktūrose užregistruotų fluorescencijos spektrų analizės rezultatais nustatyta, kad fluorescencijos kontrastas tarp sveikų smegenų baltosios substancijos ir naviko svyruoja nuo 1:1,4 iki 1:8,7 ir yra pakankamas tikslesnei gliomos diagnostikai operacijos metu. Ženklaus sukaupto PpIX kiekio skirtumai lyginant sveiką smegenų audinį ir smegenų naviką patvirtino, kad 5-ALA indukuotas PpIX selektyviai kaupiasi galvos smegenų gliomose. Įvertinę spektrofluorimetrinio metodo galimybes atpažinti naviką in vivo chirurginės operacijos metu, atlikome papildomus eksperimentinius tyrimus smegenų navikų atpažinimui in vivo remiantis registruojamu fluorescencijos vaizdu. Fluorescencijos žaditimui sumontuota mobili žiedo formos šviesos diodų matrica. Fluorescencijos vaizdų registravimui buvo naudojamas skaitmeninis fotoaparatas DiMAGE 7. Tokio pobūdžio mobili audinių fluorescencijos vaizdinimo sistema gali būti nesunkiai pritaikyta klinikoje ir kitų lokalizacijų navikinių darinių (pvz., odos navikų) fluorescencijos vaizdų tyrimui ir dokumentavimui. Fluorescencijos žaditimui naudoti mėlyni šviesos diodai ($\lambda_{\text{žad.}}=405 \text{ nm}$), kurių spinduliuojamas bangos ilgio maksimumas atitiko protoporfirino IX pagrindinę sugerties juostą (Soret juosta). Eksperimentiniai fluorescencijos vaizdinimo tyrimai atlikti dirbant su C6 eksperimentiniu galvos smegenų naviku. Matavimai atlikti in vivo praėjus 12 parų po naviko įskiepijimo. Bandyto metu naudotos dvi skirtingos 5-ALA dozės – 100 mg/kg ir 300 mg/kg. Kiekvienam gyvūnui pirmiausiai buvo užregistruotos fluorescencijos spektrinės charakteristikos gliomos centrinėje srityje, abejotino audinio vietose bei sveikų smegenų audinių (matavimai atlikti priešingame smegenų pusrutulyje). Atlikus fluorescencijos spektrų matavimus buvo užregistruojami fluorescencijos vaizdai: žadinančios spinduliuotės fone, fluorescencijos vaizdas naudojant KC10 filtrą ir nuotrauka baltos šviesos fone su pažymėtais tirtų vietų taškais.

Remiantis užregistruotais skirtingų smegenų struktūrų fluorescencijos spektrais, naudojant skirtingas 5-ALA dozes, buvo atlikta lyginamoji integrinių fluorescencijos verčių analizė. Kiekvienai tirtai audinio sričiai buvo įvertinta integrinio intensyvumo vertė, gauta suintegravus plotą po spektrine kreive,

atitinkančia pirmąją PpIX smaile (620-660 nm spektrinė sritis). Kadangi fluorescencijos spektrai registruoti skirtingais laiko tarpais po i.v. injekcijos, todėl naviko centrinės srities bei abejotino audinio (matuota toje pačioje smegenų pusėje) suskaičiuotos integrinių intensyvumų vertės buvo padalinamos iš to paties gyvūno sveikų smegenų apskaičiuotos integrinio intensyvumo vertės. Sveikų smegenų (matuota priešingoje smegenų srityje) apskaičiuota integrinio intensyvumo vertė buvo padalijama iš vidutinės eksperimentinių gyvūnų sveikų smegenų integrinio intensyvumo vertės (apskaičiuotas visų gyvūnų vidurkis tam tikram laiko momentui po 5-ALA injekcijos).

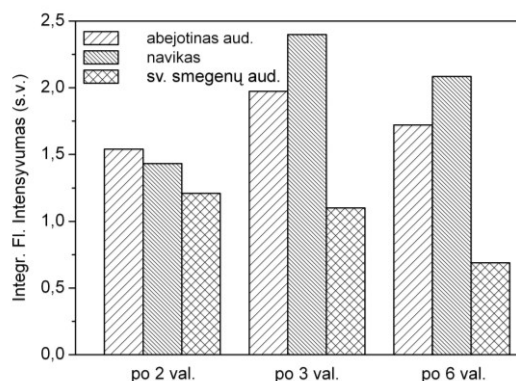
Lyginant apskaičiuotų integrinių intensyvumų vertes nustatyta, kad didžiausias skirtumas tarp naviko ir sveikų smegenų baltosios substancijos stebimas praėjus 6 val. po 5-ALA injekcijos naudojant 300 mg/kg dozę (~2,2 karto) (2.26. pav.). Tuo tarpu naudojant 100 mg/kg 5-ALA dozę nustatyta, kad didžiausia PpIX koncentracija navike pasiekama praėjus 3 val. po injekcijos,



2.26. pav. Skirtingų smegenų struktūrų fluorescencijos integrinių intensyvumų apskaičiuotų suintegravus plotą po spektrine kreive, atitinkančia pirmąją PpIX smaile (620-660 nm spektrinė sritis), vertės: naviko, abejotino smegenų audinio (naviko pažeistas smegenų pusrutulio) ir sveikų smegenų audinys iš priešingo smegenų pusrutulio (kontrolinė sritis). Fluorescencijos spektrai užregistruoti praėjus 6 val. po i.v. 5-ALA injekcijos. Vertės pateiktos kaip vidurkis \pm vidutinis kvadratinis nuokrypis (SD) (reikšmingumo lygmuo $p=0,05$). ($n_{nav.}=8$, $SD=0,7$; $n_{ab.a.}=4$, $SD=0,4$; $n_{sv.sm.a.}=5$, $SD=0,14$)

tačiau didžiausias optinis kontrastas tarp sveikų smegenų ir naviko gautas praėjus 6 val. po 5-ALA injekcijos (~3 kartus). Abiejų naudotų sensibilizatoriaus pirmtako dozių atveju, sveikų smegenų užregistruotų naviko pažeistoje smegenų srityje fluorescencijos intensyvumas ženkliai didesnis nei sveikų smegenų registruojant iš priešingo smegenų pusrutulio: naudojant 300 mg/kg dozę naviko pažeistos smegenų srities sveikų smegenų audinių fluorescencija 1,8 karto intensyvesnė nei sveikų smegenų (matuojant iš priešingo smegenų

pusrutulio, kontrolinė sritis), tuo tarpu naudojant 100 mg/kg dozę – 1,3 karto po 2 val., 1,8 karto po 3 val. ir 2,5 karto po 6 val. (2.27 pav.)

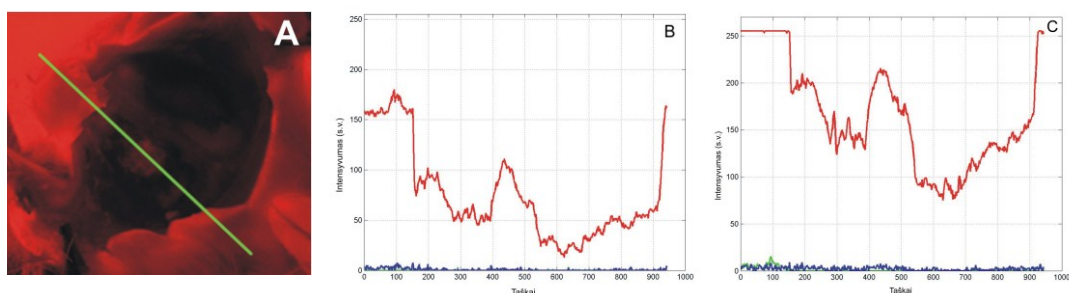


2.27. pav. Naviko ir sveikų smegenų (naviko pažeista ir kontrolinė sritis) fluorescencijos integrinių intensyvumų (620-660 nm spektrinė sritis) vertės skirtingais laiko momentais naudojant 100 mg/kg 5-ALA dozę skirtingais laiko intervalais po 5-ALA i.v. injekcijos ($n_{2\text{val.}}=3$, $n_{3\text{val.}}=3$, $n_{6\text{val.}}=6$)

Pažymėtina, kad tiek naudojant 100 mg/kg, tiek ir 300 mg/kg 5-ALA dozes gautas beveik tokio paties dydžio fluorescencijos kontrastas (santykis navikas/sveikos smegenys maždaug trys kartai).

Galvos smegenų eksperimentinių navikų fluorescencijos vaizdai užregistruoti naudojant dvi skirtingas ekspozicijos trukmes signalo kaupimui – 4s ir 10 s. Lyginant pradinių fluorescencijos vaizdų tam tikros pasirinktos srities pjūvius (išilgai naviko srities) charakterizuojančius intensyvumų skirstinius raudonam, žaliai ir mėlynai (RGB) CCD kameros spalviniams kanalams nustatyta, kad tiek žalio, tiek mėlyno kanalų intensyvumų skirstiniai nėra informatyvūs ir bendrame fluorescencijos vaizde duoda tik tam tikrą foninį triukšmą. Tuo tarpu lyginant raudono kanalo intensyvumų skirstinius stebimas ženklus kreivės formos iškraipymas, leidžiantis nustatyti naviko pažeistą sritį, registruojamą kaip fluorescencijos intensyvumo pokytis išilgai pjūvio (2.28. pav.). Nustatyta, kad naudojant 4 ar 10 sekundžių ekspozicijos trukmes naviko srities fluorescencijos intensyvumas 3 kartus didesnis nei gretimų sveikų audinių (4 sekundžių atveju - maksimumas 122 s.v., o minimumas 40 s.v.; 10 s - maksimumas 210 s.v., o minimumas 70 s.v.). Pažymėtina, kad ilgesnės ekspozicijos trukmė tiek naviko, tiek ir sveiko audinio fluorescencijos signalą padidina maždaug 1,7 karto. Be to, tiek trumpesnė ekspozicijos trukmė, tiek ir ilgesnė, naviko fluorescencijos intensyvumą padidina iki trijų kartų lyginant su greta esančiu sveikų smegenų

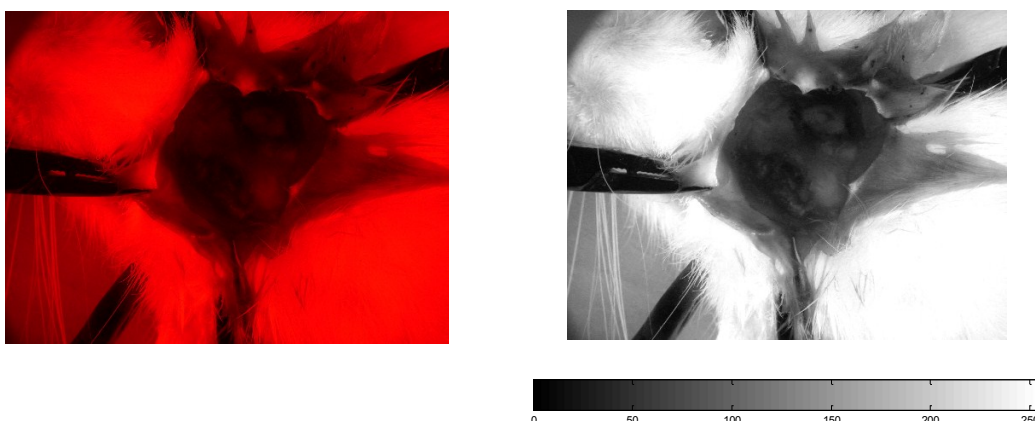
audiniu. Gautas skaitines fluorescencijos intensyvumo vertes palyginome su vertėmis apskaičiuotomis iš užregistruotų fluorescencijos spektrų. Suintegravus nenormuotų fluorescencijos spektrų visą plotą po kreive intervale 580 – 850 nm nustatyta, kad naviko santykinis intensyvumas yra 1,3 karto didesnis nei sveiko smegenų audinio. Spektrinės audinio sričių charakteristikos buvo registruojamos pirmiau, nesivadovaujant vaizdine informacija, tokiu būdu apskaičiuota iš spektrinių duomenų naviko/sveiko smegenų audinio santykinė integrinė fluorescencijos intensyvumo vertė skiriasi lyginant su gautąja atliekant vaizdinės informacijos analizę. Kadangi eksperimento metu fluorescenciją surinkdavome iš pakankamai nedidelio ploto $\sim 0,17 \text{ mm}^2$, todėl matomai ne visuomet tiksliai pataikydavome į naviko didžiausio fluorescencijos intensyvumo sritį. Pažymėtina, kad esant akivaizdžiam navikui (kuomet vizualiai galėjome atskirti pilkšvai melsvą naviką baltoje smegenų substancijoje) užregistruotų spektrų skaitinės fluorescencijos kontrasto vertės sutapo su gautomis vertėmis analizuojant fluorescencijos vaizdus. Tačiau tais atvejais, kai neturėjome akivaizdaus naviko (morfologinio tyrimo išvada – navikas ir sveikas smegenų audinys) didesnę fluorescencijos intensyvumo kontrastą tarp naviko ir aplinkinių sveikų smegenų gaudavome analizuojant vaizdinę informaciją, kurios analizė įgalino objektyviau identifikuoti skirtingo intensyvumo sritis.



2.28. pav. Fluorescencijos vaizde (A) išskirtos naviko srities pjūvio RGB spalvinių kanalų intensyvumų skirstiniai. Naviko sritis 400 - 550 taškų intervale. B: naudojant 4 s ekspozicijos trukmę; C: naudojant 10 s ekspozicijos trukmę. Fluorescencijos vaizdas užregistruotas praėjus 6 val. po 300 mg/kg 5-ALA dozės i.v. injekcijos

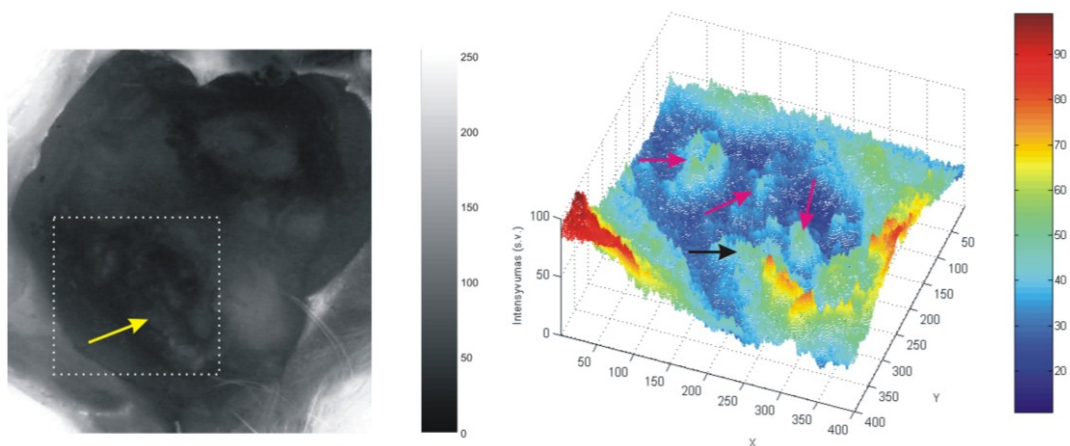
Eksperimentinių galvos smegenų navikų fluorescencijos vaizdinimui naudojome dvi skirtingas 5-ALA dozes: 100 mg/kg ir 300 mg/kg. Kadangi kiekvieno eksperimentinio gyvūno atveju pirmiausiai buvo užregistruojamos spektrinės pasirinktų audinio sričių charakteristikos, todėl atlikus spektrų analizę

nustatėme, kad 100 mg/kg 5-ALA dozei didžiausias fluorescencijos intensyvumo kontrastas tarp naviko ir sveikų smegenų stebimas parėjus 6 valandoms po intraveninės injekcijos, tačiau maksimali PpIX koncentracija navike pasiekama praėjus 3 val. Panagrinėkime šias valandas atitinkančius fluorescencijos vaizdus kuomet morfologinio tyrimo išvada yra teigiama (navikas). 2.29 paveikslo kairėje pateiktas tikras (realus) fluorescencijos vaizdas užregistruotas Dimage7 skaitmenine fotokamera per KC 10 filtrą. Oda, plaukai, antkaulis – vieni iš dominuojančių vaizde pagal fluorescencijos intensyvumą. Naviko pažeistame smegenų pusrutulyje (kairysis sm. pusr.) matome keletą intensyvesnių sričių, tuo tarpu priešingame smegenų pusrutulyje matoma nežymi sveikų smegenų fluorescencija. Paveikslo dešinėje pateiktas tas pats vaizdas tik gautas atvaizdavirus tik R spalvinio kanalo informaciją (mėlyno ir žalio spalvinių kanalų vertes prilyginant nuliui).



2.29. pav. Kairėje: bandymo metu užregistruojamas fluorescencijos vaizdas. Dešinėje: vaizdas gautas atvaizdavirus tik R spalvinio kanalo informaciją. (3 val. po 100 mg/kg 5-ALA dozės i.v. injekcijos)

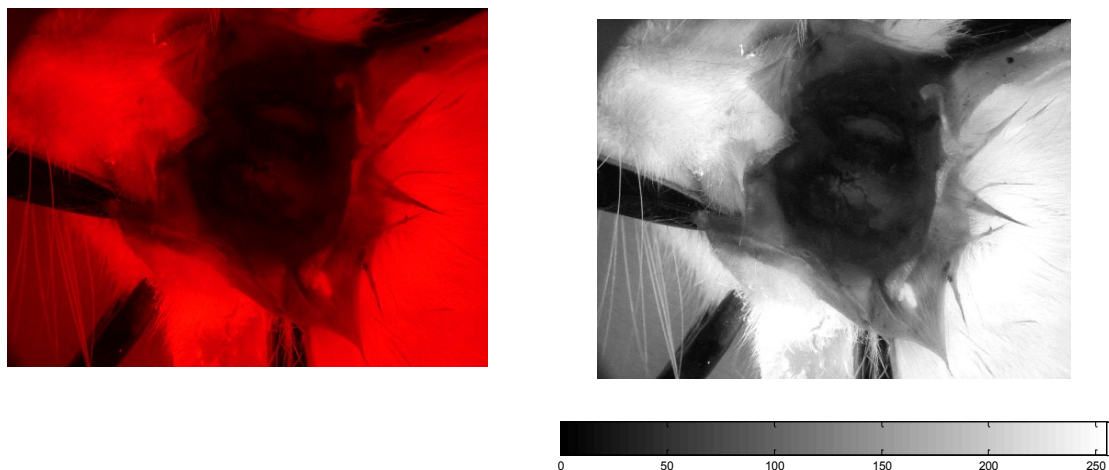
2.30 paveikslo kairėje pateiktas naviko pažeistos ir sveikos smegenų dalies vaizdas (R kanalas, juodai baltoje spalvinėje intensyvumų skalėje). Vaizde iškirpus sritį, atitinkančią naviko pažeistą smegenų dalį (pažymėta punktyrine linija), buvo atvaizduotas kaip fluorescencijos intensyvumų skirstinys.



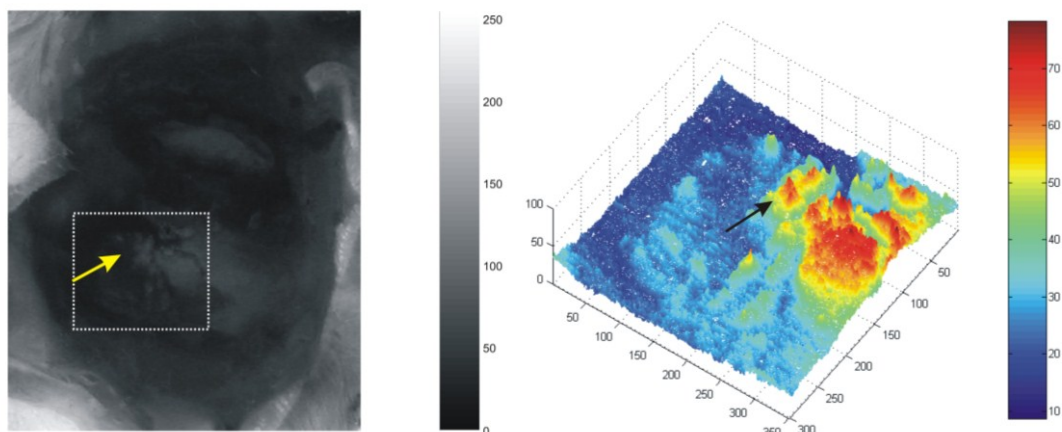
2.30. pav. Kairėje: eksperimentinio gyvūno pažeisto ir sveiko smegenų pusrutulio fluorescencijos vaizdas (atvaizduotas tik R kanalas). Dešinėje: išskirtos naviko srities fluorescencijos intensyvumų skirstinys. (3 val. po 100 mg/kg 5-ALA dozės i.v. injekcijos). Geltona ir juoda rodyklės žymi pasirinktą audinio sritį, kurioje buvo užregistruotas fluorescencijos spektras bei paimta biopsija morfologiniam tyrimui. Rausvos rodyklės žymi naujus naviko plitimo židinius

Tokiu būdu apdorojant vaizdinę informaciją galime tiksliau išryškinti sritis besiskiriančias PpIX charakteringomis fluorescencijos intensyvumo vertėmis. Kaip matome iš pateikto intensyvumų skirstinio, naviko pažeistoje smegenų pusėje galima identifikuoti kelis židinius atvaizduotus žalsvai geltona spalva (pažymėti rausvomis rodyklėmis), kurių intensyvumas siekia 60-70 s.v. Juoda rodyklė atitinka vietą, kurioje buvo pamatuotas fluorescencijos spektras bei imta biopsija morfologiniam tyrimui. Morfologinio tyrimo išvada – navikas.

Analogiška veiksmų seka atlikta apdorojant fluorescencijos vaizdą gautą praėjus šešioms valandoms po intraveninės injekcijos (2.31 – 2.32 pav.). Pažymėtina, kad ties šia valanda maždaug 1,5 karto sumažėja sveikų smegenų fluorescencijos intensyvumas. Atvaizdavirus naviko srities fluorescencijos intensyvumų skirtinį, išryškėja naviko pažeistos sritys. Juoda rodykle pažymėta vieta, kurioje užregistruotas fluorescencijos spektras bei imta biopsija.



2.31. pav. Kairėje: bandymo metu užregistruojamas fluorescencijos vaizdas. Dešinėje: vaizdas gautas atvaizdavus tik R spalvinio kanalo informaciją. Fluorescencijos vaizdas užregistruotas praėjus 6 val. po 100 mg/kg 5-ALA dozės i.v. injekcijos

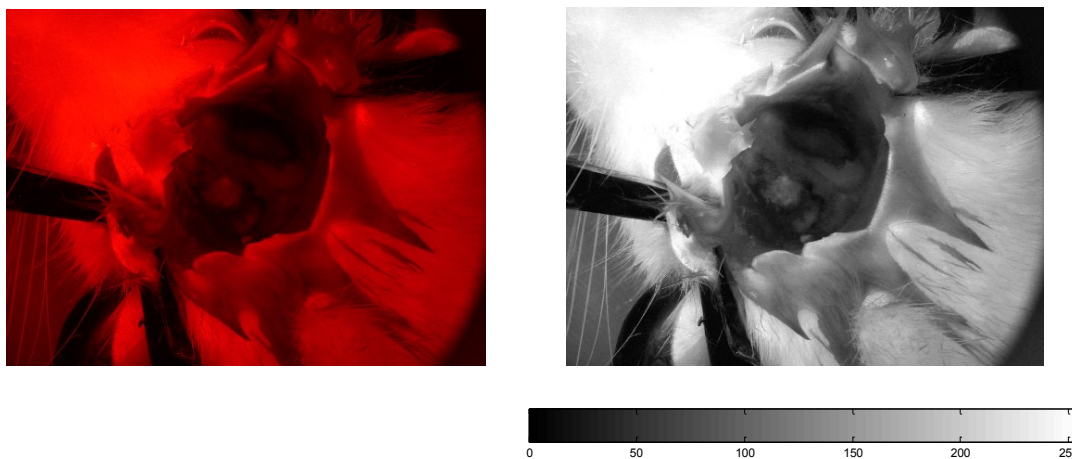


2.32. pav. Kairėje: eksperimentinio gyvūno pažeisto ir sveiko smegenų pusrutulio fluorescencijos vaizdas (atvaizduotas tik R kanalas). Dešinėje: Išskirtos naviko srities trimatis intensyvumų skirstinys. Fluorescencijos vaizdas užregistruotas praėjus 6 val. po 100 mg/kg 5-ALA dozės i.v. injekcijos

Apibendrinant gautos vaizdinės informacijos analizę, galima teigti, kad naudojant 100 mg/kg 5-ALA dozę naviko pažeistos srities atpažinimas duotu atveju yra sudėtingas vadovaujantis vien tik tikru fluorescenciniu vaizdu. Tiksliau abejotinos audinio sritys yra lokalizuojamos vadovaujantis tiriamos smegenų pusės fluorescencijos intensyvumų skirstiniu. Tokiu būdu vertinant naviko lokalizaciją tikslinga papildomai apdoroti gaunamus vaizdus. Pažymėtina, kad vienas iš nepageidaujamų veiksnių – santykinai padidėjusi sveikų smegenų fluorescencija ypač naviko pažeistoje smegenų dalyje, kas įtakoja registruojamo fluorescencijos

kontrasto dydį tarp naviko ir sveikų smegenų bei gali įnešti tam tikrų paklaidų atsiradimą naviko zonos atpažinimui registruojamame fluorescencijos vaizde.

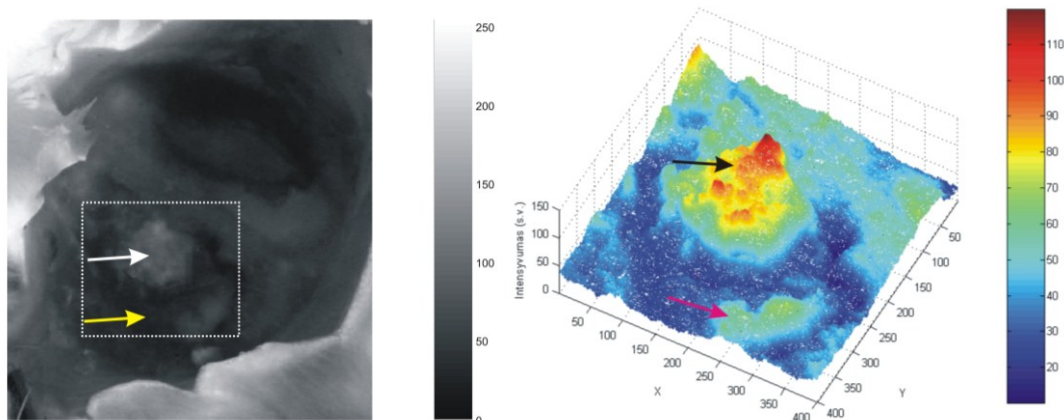
Naudojant 300 mg/kg 5-ALA dozę užregistruotuose fluorescencijos vaizduose akivaizdžiai matoma naviko pažeistos smegenų srities fluorescencija (2.33. pav. kairėje). Atvaizdavirus R spalvinio kanalo informaciją, gautame vaizde itin aiškiai galime lokalizuoti naviką, tuo tarpu aplinkiniai sveiki smegenų audiniai fluorescencija ženkliai silpniau.



2.33. pav. Kairėje: bandymo metu užregistruojamas fluorescencijos vaizdas. Dešinėje: vaizdas gautas atvaizdavirus tik R spalvinio kanalo informaciją. Fluorescencijos vaizdas užregistruotas praėjus 6 val. po 300 mg/kg 5-ALA dozės i.v. injekcijos

2.34 paveiksle pavaizduotas naviko ir sveikų smegenų tirtos srities vaizdas, kuriame geltona rodykle pažymėtas navikas. Eksperimento metu taip pat buvo paimta biopsija ir iš žemiau esančios abejotinos audinio srities (pažymėta balta rodykle). Morfologinis tyrimas parodė, kad geltona rodykle paženklintoje srityje yra navikas, tuo tarpu baltos rodyklės sritis – smegenys.

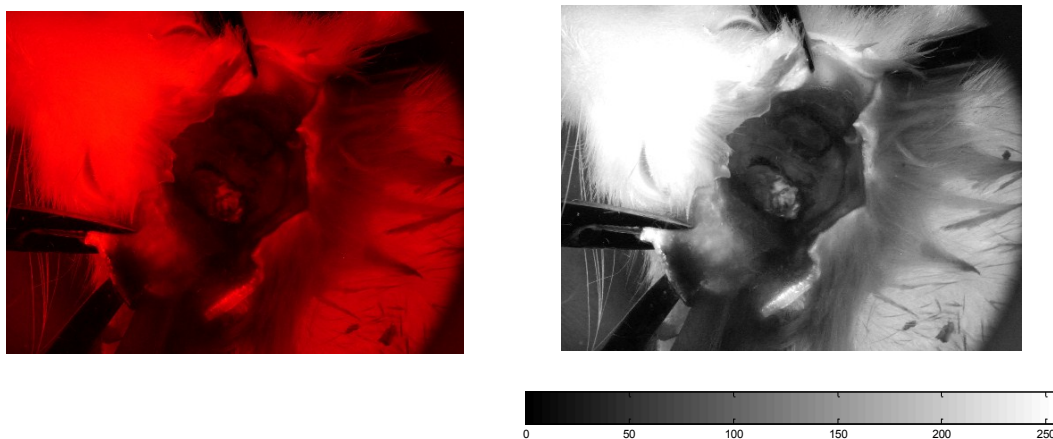
Išskyrus vien tik naviko sritį (punktyrine linija pažymėtas laukas) buvo gautas šios naviko pažeistos srities fluorescencijos intensyvumų skirstinys (2.34 pav. dešinėje). Kaip matome, navikas neturi griežtos ribos, tačiau aiškiai matoma centrinė jo dalis (maksimali intensyvumo vertė 122 s.v.) bei keletas intensyvesnių „salelių“ aplinkiniuose audiniuose.



2.34. pav. Kairėje: eksperimentinio gyvūno pažeisto ir sveiko smegenų pusrutulio fluorescencijos vaizdas (atvaizduotas tik R kanalas). Dešinėje: išskirtos naviko srities trimatis intensyvumų skirstinys. Fluorescencijos vaizdas užregistruotas praėjus 6 val. po 300 mg/kg 5-ALA dozės i.v. injekcijos

Šis vaizdas yra vienas iš akivaizdžių pavyzdžių, kuomet dėl labiau išreikštos aplinkinių smegenų sensibilizacijos naviko pažeistoje smegenų dalyje galima suklysti bei sveiką audinį palaikyti naviku (rausva rodykle paženklinta sritis).

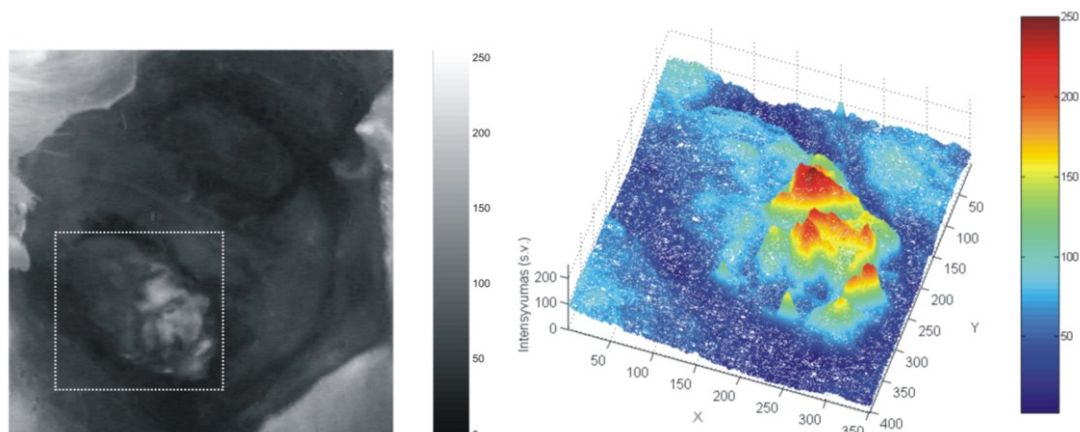
Dar vienas akivaizdžių naviko vaizdinimo pavyzdžių pateiktas 2.35 ir 2.36 paveiksluose. Šio bandymo metu gautas itin aiškiai išreikšto naviko, apėmusio visą kairįjį smegenų pusrutulį, fluorescencijos vaizdas.



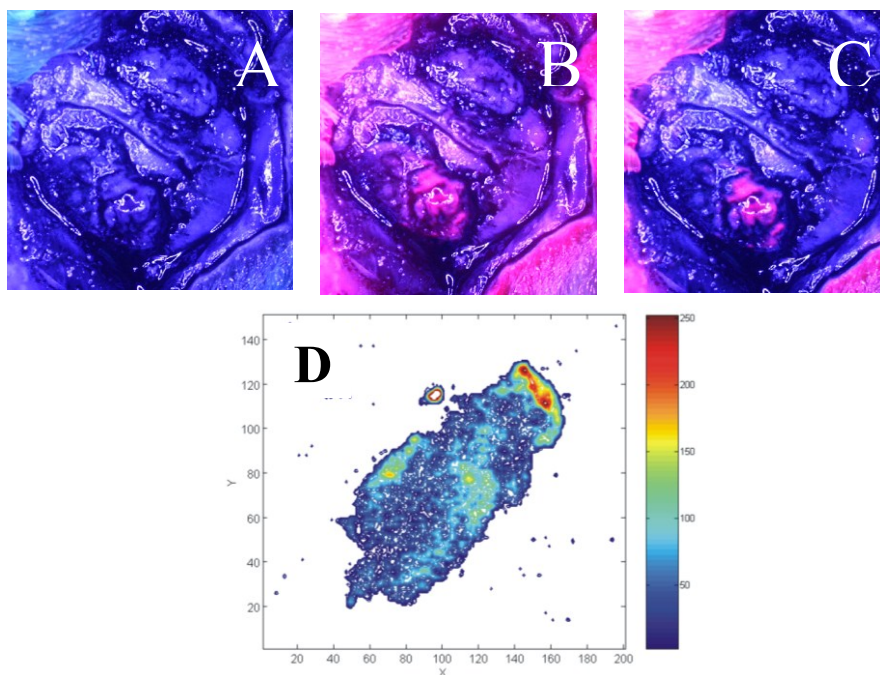
2.35. pav. Kairėje: bandymo metu užregistruojamas fluorescencijos vaizdas. Dešinėje: vaizdas gautas atvaizdavirus tik R spalvinio kanalo informaciją. Fluorescencijos vaizdas užregistruotas praėjus 6 val. po 300 mg/kg 5-ALA dozės i.v. injekcijos

Šiuo atveju turime gerai išreikštą naviko centrinę dalį bei aplink ją netaisyklingai išsijusių piktybinių ląstelių plotelius. 2.37 paveiksle pateiktas suminis vaizdas (C), gautas naviko pažeistos ir sveikos smegenų srities vaizdą (A), užregistruotą mėlynos šviesos fone, susumavus su šios srities fluorescencijos

vaizdu (B). D paveiksle pateiktas biopsijai paimto navikinio audinio fluorescencijos vaizdas, kuriame aiškiai matyti naviko infiltracinis augimo pobūdis.



2.36. pav. Kairėje: eksperimentinio gyvūno pažeisto ir sveiko smegenų pusrutulio fluorescencijos vaizdas (atvaizduotas tik R kanalas). Dešinėje: išskirtos naviko srities trimatis intensyvumų skirstinys. Fluorescencijos vaizdas užregistruotas praėjus 6 val. po 300 mg/kg 5-ALA dozės i.v. injekcijos



2.37. pav. A: eksperimentinio gyvūno naviko pažeisto ir sveikų smegenų sričių vaizdas žadinančios šviesos fone. B: suminis vaizdas gautas susumavus mėlynos šviesos vaizdą su fluorescencijos vaizdu. C: suminis vaizdas fluorescencijos vaizdą sunormavus į intensyvumo maksimumą. D: biopsijai paimto navikinio audinio mėginio fluorescencijos vaizdas. Fluorescencijos vaizdas užregistruotas praėjus 6 val. po 300 mg/kg 5-ALA dozės i.v. injekcijos

Apibendrinant galima pažymėti, kad registruojamo fluorescencijos intensyvumo kontrasto dydis tiek naudojant 100 mg/kg, tiek ir 300 mg/kg gautas

panašus (vidutiniškai apie tris kartus). Vaizdinės informacijos analizė įgalina daug objektyviau išskirti stipriau fluorescuojančias sritis sveikų smegenų fone, bei nurodyti vietas biopsijoms, vėlesniam morfologiniam tyrimui. Akivaizdu, jog esant gerai išreikštam navikui, kuomet naviko ląstelingumas nedidelėje srityje yra didelis, gaunamas daug didesnis fluorescencijos intensyvumų skirtumas, dėl ko galime tiksliau įvertinti navikinio darinio išplitimą vadovaujantis fluorescencijos vaizdu. Tačiau išplitimo ribos visgi lieka neaiškios. Fluorescencijos vaizdų analizė leidžia įvertinti platesnes gliomos išplitimą vaizduojančias sritis, vertinant intensyvumo pasiskirstymą, tačiau naviko atpažinimo patikimumui būtina atlikti audinio morfologinius tyrimus.

2.4. Aptarimas

Audinio biocheminių ir metabolinių procesų pokyčiai gali būti susiję su įvairiais patologiniais organizmo pakitimais, dėl ko pakinta tam tikrų endogeninių fluoroforų pasiskirstymas, santykinis kiekis bei juos supanti mikroaplinka (pvz. terpės pH). Visi šie pokyčiai įvardijami kaip tam tikri nukrypimai nuo normalios sveikos audinio (ląstelės) būklės ir gali būti identifikuoti remiantis audinio endogeninių fluoroforų fluorescencijos savitumais – fluorescencijos intensyvumu bei spektro formos skirtumais. Būtent specifiniai navikinių audinių fluorescencijos skirtumai davė pradžią savosios fluorescencijos metodų taikymui navikinių darinių diagnostikai in vivo daugelyje praktinės medicinos sričių [30-31]. Viena įdomesnių savosios fluorescencijos taikymo sričių yra navikinio darinio atpažinimas ankstyvose jo formavimosi stadijose bei naviko išplitimo ribų vaizdinimas ir kontrolė chirurginės operacijos metu.

Eksperimentinių tyrimų metu nustatyta, kad naudotų piktybinių galvos smegenų glijos navikų (žiurkių gliomos 101.8 linija ir žmogaus gliomos C6 linija) savosios fluorescencijos spektrams charakteringa endogeninių porfirino tipo pigmentų fluorescencija. Skirtingų navikų fluorescencijos spektrams būdingos juostos ties 636 nm ir 706 nm, kurių santykinis fluorescencijos intensyvumas atspindi audinyje sukaupto endogeninio protoporfirino kiekį. Gyvūnų su glijos naviku, sveikų smegenų savosios fluorescencijos spektruose stebėti tik nežymūs formos pokyčiai ties pirmąja protoporfirino fluorescencijos juosta (636 nm) matuojant in vivo. Tuo tarpu gyvūnų be glijos naviko, sveikų smegenų audinių savosios fluorescencijos spektruose jokių endogeniniams porfirinams būdingų formos pokyčių nėra (2.7. pav.). Skirtuminių spektrų analizės dėka nustatyta, kad šie spektro formos iškreipimai yra sąlygoti vandenyje tirpių endogeninių porfirinų (smailė ties 628 nm) (2.9. pav.). Panašūs spektro formos savitumų pastebėjimai gauti ir registruojant C6 gliomos savąją fluorescenciją ex vivo (2.17. pav.). Taigi naviko implantacija turi įtakos sveikų smegenų audinių savosios fluorescencijos spektro formai 600 – 700 nm spektrinėje srityje dėka vandenyje tirpių porfirinų daromos įtakos, tačiau sveikose smegenyse endogeninis protoporfirinas IX nesikaupia. Tokiu būdu navikinių darinių lokalizavimui ir smegenų audinių

diferenciacijai yra tikslinga vertinti integrinio intensyvumo santykį $I_{620-660}(\text{sv. aud.})/I_{620-660}(\text{nav.})$ apibūdinančią endogeninio protoporfirino IX santykinio kiekio pokytį glijos naviko atveju.

Praktiniu požiūriu, savosios fluorescencijos metodo taikymo navikinių darinių lokalizacijai ir smegenų audinių diferenciacijai vienas iš pagrindinių rodmenų – pakankams optinis kontrastas glijos naviko atpažinimui sveikų smegenų audinių fone. Eksperimentiniai rezultatai parodė, kad fluorescencijos integrinio intensyvumo vertės apskaičiuotos iš pradinių smegenų audinių savosios fluorescencijos spektrų neduoda pakankamo optinio kontrasto, tačiau skirtuminių spektrų analizės dėka galima gauti didesnes optinio kontrasto vertes glijos atpažinimui. Pažymėtina, kad registruojant C6 gliomos savąją fluorescenciją *ex vivo* gavome didesnę fluorescencijos kontrastą tarp naviko ir sveikų smegenų (maždaug 2,6 karto žadinant 400 nm bangos ilgio spinduliuote) nei atliekant matavimus *in vivo* su 101.8 glioma. Šių skirtumų priežastys gali būti kelios: visų pirma nevienodos eksperimentinės sąlygos – 101.8 gliomos matavimai atlikti *in vivo*, tuo tarpu C6 – *ex vivo*, t.y. galėjome tiksliau parinkti vizualiai besiskiriančių audinių - naviko vietas spektrams užregistruoti, be to, priklausomai nuo eksperimento metu naudoto spinduliuotės bangos ilgio (ar išskirtos spektrinės srities) fluorescencijos žadinimui skiriasi ir PpIX sužadavimo efektyvumas; antra – šiems navikams gali būti charakteringas skirtingas porfirinų kaupimasis priklausomai nuo naviko savybių (augimo, metabolinių vyksmų spartos ir t.t.); trečia – sensibilizuotos fluorescencijos taikymuose, skirtingų gamintojų 5-ALA taip pat gali sąlygoti savitą porfirinų kaupimąsi [32].

Žinoma, kad audinių *ex vivo* sistemose negrįžtamai sutrikdyti organizmo apykaitos mechanizmai (pvz.: kraujotaka), be to atsiranda įvairūs histologiniai pakitimai, kurie pakeičia audinio optines savybes, dėl ko pakinta šviesos prasiskverbimo gylys, o tuo pačiu ir audinio storis iš kurio surenkama fluorescencija [12,16]. Todėl daugelis autorių pažymi, kad egzistuoja neatitikimai fluorimetriniuose matavimuose lyginant *ex vivo* eksperimentinius duomenis bei duomenis gautus dirbant su *in vivo* sistema. Mūsų tyrime, *in vivo* ir *ex vivo* sistemų neatitikimą iliustruoja ne tik C6 glijos tyrimas, bet ir 101.8 gliomos

savosios fluorescencijos spektrai užregistruoti po gyvūno mirties *ex vivo* (2.11. pav.). Pažymėtina, kad dirbant su *ex vivo* sistemomis dažnai tiriamo audinio (navikas ar sveikas audinys) sritis fluorescencijos spektrams užregistruoti yra parenkama tiksliau, todėl gaunamas optinis kontrastas neatitiks duomenų gautų realiomis sąlygomis (*in vivo*) bei matuojant nuo audinio paviršiaus.

Įvairių autorių duomenimis, vieni esminių skirtumų tarp naviko ir sveiko audinio yra daug mažesnis navikinių audinių fluorescencijos intensyvumas trumpesnių bangos ilgių srityje (žaliai-geltonoje spektro srityje), ir intensyvesnė raudonoje spektro srityje (600 – 700 nm spektro srityje) [15,33]. Pažymima, kad žadinančios spinduliuotės bangos ilgis yra svarbus siekiant išryškinti esminius skirtumus. Chung ir bendraautoriai [16] paskelbė, kad *ex vivo* gliomos bandinių savosios fluorescencijos intensyvumas yra mažesnis nei sveikų smegenų (fluorescencijos smailės padėtis ties 470 nm). Autoriai teigia, kad tam įtakos turi pakitęs navikinių audinių metabolinis aktyvumas lyginant su sveiku audiniu, o pagrindiniai endogeniniai fluoroforai atsakingi už savosios fluorescencijos spektrų skirtumus yra NAD(P)H, flavinai ir porfirinai. Be to, nustatyta, kad pilkojoje smegenų medžiagoje porfirinų santykinis kiekis yra daug mažesnis nei baltojoje smegenų substancijoje dėka intensyvesnės hemo biosintezės. Tyrimų rezultate buvo pasiūlyti trys optimalūs žadinimo ir emisijos bangos ilgiai sveikų smegenų ir glijos navikų diferenciacijai (360nm/470nm, 440 nm/520nm, 490nm/630nm). Kitų autorių darbuose, taip pat stebėta fluorescencijos smailė ties 460 nm, žadinant 337 nm bangos ilgio spinduliuote, kuri priskiriama ląstelės metaboliniuose procesuose dalyvaujančiam endogeniniam fluoroforui - NAD(P)H [18,34-35]. Saraswathy ir bendraautoriai [36] panaudojo keturis skirtingus žadinimo bangos ilgius sveikų smegenų audinių ir skirtingų smegenų navikų diferenciacijai *in vitro*. Nustatyta, kad sveikų smegenų fluorescencijos intensyvumas visiems žadinimo bangos ilgiams buvo didžiausias (didžiausias skirtumas gautas žadinant 320 nm bangos ilgio spinduliuote) nei navikui. Autoriai teigia, kad 410 – 470 nm bangos ilgio spinduliuotė yra tinkamiausia smegenų naviko atpažinimui savosios fluorescencijos dėka. Įvairių autorių nuomone, endogeninių fluoroforų santykinis kiekis (bei jo pokytis patologijos atveju) gali

skirtis ne tik lyginant sveiką smegenų audinį ir naviką, tačiau jis gali būti skirtingas lyginant skirtingo tipo smegenų navikus [12,18,34,35-36].

Mūsų tyrimų rezultatai sutampa su kitų autorių skelbtais duomenis. Tiriant C6 gliomos savąją fluorescenciją *ex vivo* taikant atrankų žadinimą nustatyta, kad priklausomai nuo žadinančios spinduliuotės bangos ilgio, sveikų audinių fluorescencija intensyviausia 420 – 580 nm spektro srityje (išskirus žadinant 400 nm ir 410 nm bangos ilgio spinduliuote), tuo tarpu naviko fluorescencijos intensyvumas didžiausias 600 – 700 nm spektrinėje srityje (2.16. pav A). Navikui charakteringos dvi intensyvios fluorescencijos smailės 636 nm ir 706 nm, kurios sąlygotos endogeninio protoporfirino IX fluorescencijos. Tuo tarpu sveikų smegenų fluorescencijos spektre (kaip ir 101.8 gliomos atveju) vyrauja vandenyje tirpūs endogeniniai porfirinai žadinant 380 – 400 nm bangos ilgio spinduliuote. Nustatyta, kad didžiausi skirtumai raudonoje spektro srityje registruojami žadinant 400 – 420 nm bangos ilgiu, kuomet dėka efektyvaus endogeninio protoporfirino IX sužadavimo, galime atpažinti C6 gliomą. Smegenų audinių diferenciacijai galima naudoti ir fluorescencijos integrinų intensyvumų (606 – 706) nm ir (450 – 570) nm spektriniuose intervaluose santykio vertes (šis metodas dažnai naudojamas fluorescencijos vaizdinimo sistemose optinio kontrasto padidinimui [30]) - C6 gliomai šių verčių išsibarstymas yra daug didesnis lyginant su sveiku audiniu (2.16. pav B).

Pažymėtina, kad žadinant 400-430 nm spinduliuote fluorescencijos spektre ima dominuoti smailė ties 590 nm, kuri charakteringesnė navikui nei sveikam smegenų audiniui. Ši smailė priskiriama endogeniniams metaloporfirinams, o būtent cinko-protoporfirinui (ZnPp) [37]. Cinko- protoporfirinas (ZnPp) turi charakteringą fluorescencijos smailę ties 590 nm, kurios atsiradimas buvo stebėtas kepenų ląstelėse bei kraujo eritrocituose *in vitro* [38]. Kadangi nedidelis kiekis ZnPp gali būti eritrocituose, tikėtina, kad matuojant *ex vivo*, kuomet pažeista audinių kraujotaka, galime užregistruoti šio pigmento fluorescenciją. Taip pat, nustatyta, kad ZnPp gali būti suformuotas kaip šalutinis produktas hemo biosintezės metu. Esant geležies stygiui audinyje ferochelatazė vietoj geležies gali įterpti cinką į PpIX molekulę bei padidinti ZnPp santykinį kiekį [39]. Kiti autoriai

stebėjo metaloporfirinų formavimąsi hematoporfirino tirpaluose bei ląstelėse [40,41] arba po švitinimo, kuomet PpIX kiekis ženkliai sumažėja [42]. Padidėjęs ląstelių metabolinis aktyvumas, deguonies kiekis, terpės pH, temperatūra bei mikroaplika gali sąlygoti metaloporfirinų formavimąsi.

Tiriant Wistar linijos žiurkių (gyvūnai su naviku) skirtingų audinių savąją fluorescenciją nustatyta, kad endogeniniam protoporfirinui būdingų fluorescencijos smailių atsiradimas dominuoja beveik visuose tirtuose audiniuose (išskyrus sveikas smegenis). Didžiausia endogeninių porfirinų koncentracija nustatyta odoje, virškinamajame trakte (skrandis, plonoji ir storoji žarna). Natūralus šių pigmentų kaupimasis įvairiuose audiniuose skirtingais kiekiais gali būti charakteringas šios veislės gyvūnų bruožas ir galimai yra sąlygotas įgimtų ir specifinių organizmo hemo biosintezę reguliuojančių mechanizmų. Pavyzdžiui, hemo biosintezės sutrikimai yra charakteringi sergant porfirija [43]. Kiekvienas porfirijos tipas yra susijęs su tam tikrų specifinių fermentų aktyvumo sutrikimais, kurie svarbūs hemo biosintezės cikle. Taigi, dėka skirtingo endogeninio protoporfirino IX kiekio įvairiuose audiniuose, jo fluorescencijos intensyvumo santykinio kiekio vertinimas galimas tik lyginant to paties tipo audinius. Registruojant skirtingų audinių savąją fluorescenciją nustatyta, kad kai kuriems audiniams (virškinimo sistemos organai) būdingi nedideli spektro formos iškreipimai ties 670 nm. Be to, šios smailės atsiradimas buvo stebėtas C6 gliomos savosios fluorescencijos spektre (ex vivo) žadinant 440 nm bangos ilgio spinduliuote, tuo tarpu sveikų smegenų audinių savosios fluorescencijos spektre ši smailė nebūdinga. Fluorescencijos spektro formos iškreipimai ties 670 nm gali būti sąlygoti fluorescuojančio pašaro pigmento - chlorofilo - a arba dėl organizme susidariusių šio pigmento degradacinių produktų (feofitinas – a arba feoforbidas - a) [44-45].

Wistar linijos žiurkės priskiriamos albinosinių gyvūnų klasei (būdinga natūralaus pigmento melanino - stygius) bei turi tam tikrą įgimtą apsaugos priemonę nuo aplinkinės šviesos. Protoporfirinas IX yra naudojamas kaip akies tinklainę saugantis pigmentas nuo galimų aplinkinės šviesos fotopažaidų ir tokiu būdu kompensuojant melanino stoką šiuose organizmuose [46-47]. Už perteklinę

protoporfirino IX sintezę graužikų organizme yra atsakinga Harderinė liauka [48-49]. Šio pigmento sintezė yra skatinama tam tikrų liaukoje esančių hemo ciklo fermentų padidėjusiu aktyvumu. Tam tikrų hemo ciklo fermentų stygius gali sumažinti galutinio produkto – hemo sintezę, tačiau kaip kompensacinis procesas - padidinti ALA sintazės aktyvumą. Dėl šių veiksnių turime tarpinių hemo produktų, kurie susidaro iki fermentų trūkumo, perteklių [50]. Pavyzdžiui, dėl uroporfirinogeno kosintazės trūkumo gali pasireikšti uroporfirinų susikaupimas, tuo tarpu dėl ferochelatazės aktyvumo sumažėjimo bei dažnai greta pasireiškiančio geležies trūkumo itin padidėja PpIX kiekis. Nors hemo biosintezės ciklas vyksta kiekvienoje metaboliškai aktyvioje ląstelėje, tačiau porfirinų bei jų pirmtakų perteklius skirtingų porfirinų atveju yra sąlygotas kepenų ląstelių arba raudonųjų kaulų čiulpų (*erythropoietic*). Įgimtos porfirijos atveju raudonųjų kaulų čiulpai yra pagrindinis šaltinis porfirinų perteklinės sintezės. Sumažėjęs ferochelatazės aktyvumas dėl tam tikrų įgimtų genetinių sutrikimų sąlygoja protoporfirino perteklinio kiekio kaupimąsi bei iššaukia odos fotojautrumą [51]. Nustatyta, kad protoporfirinas iš organizmo yra pašalinamas per kepenis ir tulžį. Esant kepenų disfunkcijai gali atsirasti didesnis porfirinų kiekis šlapimo pūslėje (pagrindė vandenyje tirpūs porfirinai) [43]. Kadangi protoporfirinas iš organizmo pašalinamas per išmatas, tai paaiškintų mūsų eksperimentinių tyrimų pastebėjimus, kad didžiausias PpIX fluorescencijos intensyvumas yra virškinamajame trakte (skrandis, plonoji ir storoji žarna). Tuo tarpu vandenyje tirpių porfirinų fluorescencija buvo stebima šlapimo pūslėje, antkaulyje. Registruojant inkstų vidaus ir išorės audinių savąją fluorescenciją nustatyta, kad vidaus audiniams charakteringi nedideli PpIX smailės bei spektro formos iškraipymai ties 620 nm, tuo tarpu išorės audiniams charakteringos intensyvios PpIX smailės. Vandenyje tirpių porfirinų, kaip uroporfirinas (Up) (λ_{\max} =618-620 nm) ir koproporfirinas (Cp) (λ_{\max} =625 nm) fluorescencija buvo stebėta ir kitų autorių darbuose [52].

Apibendrinant literatūroje skelbtus duomenis apie savosios fluorescencijos metodo taikymą smegenų navikų diagnostikai, galima pažymėti, kad kol kas trūksta tikslesnių duomenų, patvirtinančių metodo taikymo galimybes šių navikų intraoperacinei lokalizacijai. Įvairių glijos navikų metabolinių vyksmų eigos

skirtumai bei atskirų endogeninių fluoroforų pasiskirstymo bei jų kiekio kitimą sąlygojančių veiksnių įtaka nėra pilnai iširta. Tačiau atlikti preliminarūs tyrimai yra daug žadantys [12,16,34,36]. Atkreiptinas dėmesys ir į tai, kad registruojant chirurginiu būdu pašalintų smegenų audinių savąją fluorescenciją ex vivo (ar in vitro), audinių preparatų paruošimas gali sąlygoti fluorescencijos spektro formos bei intensyvumo pokyčius. Todėl vertinant metodo perspektyvas labai svarbūs yra in vivo atliekami tyrimai specifinių navikinių darinių fluorescencijos skirtumų atpažinimui bei galimų gyvo organizmo operacijos metu pasireiškiančių veiksnių (kraujavimas, smegenų brinkimas ir t.t.) įtakos įvertinimui.

Nors savoji audinių fluorescencija neduoda pakankamo fluorescencijos kontrasto tarp naviko ir sveiko smegenų audinio, tačiau, autorių nuomone, gali būti svarbi nustatant naviko lokalizaciją [12,15,19]. Kai kurie navikiniai dariniai natūraliai sukaupia didesnę endogeninio PpIX kiekį lyginant su sveiku audiniu ir šis skirtumas teikia daug privalumų fluorimetrinio metodo panaudojimui diagnostiniams tikslams [53]. Tačiau tais atvejais, kai savoji fluorescencija neužtikrina pakankamo optinio kontrasto arba nėra aiškiai išskiriančio spektro formos braižo lyginant naviką ir sveiką audinį, papildomas perteklinis 5-ALA kiekis organizme galėtų pagerinti fluorimetrinio metodo jautrumą navikinio darinio fluorescenciniam atpažinimui.

Geresnis sveikų ir pažeistų audinių fluorescencijos kontrastas gautas naudojant įvairius sensibilizatorius, kuriems būdingas selektyvus kaupimasis įvairių lokalizacijų navikiniuose dariniuose [30]. Kadangi sensibilizatoriaus fluorescencijos intensyvumas yra objektyvus jo susikaupimo audiniuose rodiklis, registruodami fluorescencijos spektrus ar fluorescencijos vaizdus galime objektyviau lokalizuoti besiformuojančio navikinio darinio išplitimo ribas greta esančiuose sveikuose audiniuose.

Spektrofluorimetrinio metodo jautrumą, specifiškumą bei tikslumą įvertinome analizuodami eksperimentinių galvos smegenų navikų - žiurkių gliomos 101.8 – sukauptus eksperimentinius duomenis. Morfologiškai patvirtintas šių ląstelių pagrindinių žmonių gliomoms būdingų piktybiškumo požymių (mitozė, branduolių polimorfizmas, piktybinių ląstelių infiltracija į sveikų smegenų

audinius, kraujagyslių proliferacija, ląstelių mitozė) atitikimas. Tiriant 5-ALA indukuoto PpIX kaupimąsi smegenų navike ir aplinkiniuose sveikuose audiniuose nustatyta, kad PpIX selektyviai kaupiasi smegenų navike ir didžiausia PpIX koncentracija pasiekama praėjus 6 val. po intraveninės injekcijos, tuo tarpu sveikų smegenų fluorescencijos intensyvumas šiek tiek padidėja pirmosiomis valandomis po injekcijos, tačiau ties šešta valanda susitapatina su savosios smegenų fluorescencijos intensyvumo verte. Kiekviena metaboliškai aktyvi ląstelė vykdo hemo biosintezės ciklą. Normaliomis sąlygomis šis ciklas yra griežtai kontroliuojamas grįžtamosios reguliacijos mechanizmo, t.y. kiek pagaminama ALA, tiek ir suvartojama hemo sintezei. Egzogeninė 5-ALA dozė sutrikdo hemo biosintezės ciklą, bei stimuliuoja tarpinių ciklo porfirinų kaupimąsi ląstelėje (audinyje). Ferochelatazė nebepajėgia paversti viso PpIX į hemą, todėl PpIX ima kauptis audiniuose ir stebime sensibilizacijos reiškinių. Naudojant egzogeninę 5-ALA selektyvus porfirinų kaupimasis labiau charakteringas navikams nei sveikam audiniui. Tai susiję su mažu FeC aktyvumu [32] ir, tikriausiai, dėl padidėjusio porfobilinogeno dehidratazės (PBGD) aktyvumo, kuris yra vienas iš sintezės greitį ribojančių veiksnių navikiniuose audiniuose [54]. Kai kurie autoriai pažymi, kad įvairūs medžiagų apykaitos spartos procesų skirtumai taip pat gali įtakoti 5-ALA pasisavinimą bei porfirinų sintezę [55-56].

Selektyvaus PpIX kaupimosi smegenų gliomose priežastys nėra iki galo išnagrinėtos, tačiau pažymima, kad tam įtakos turi didesnis pasisavinamo 5-ALA kiekis glijos navike (dėl pažeisto hematoencefalinio barjero) bei hemo sintezę reguliuojančių fermentų aktyvumo sutrikimai [22]. Esant pažeistam hematoencefaliniam barjerui 5-ALA lengvai patenka į smegenų ląsteles bei indukuoja porfirinų sintezę. Manoma, kad dėl suaktyvėjusios navikinių ląstelių transporto sistemos bei gero apsirūpinimo krauju, o tuo pačiu ir deguonimi, po tam tikro laiko juose susikaupia didesnis 5-ALA kiekis. Porfirinų sintezės padidėjimą taip pat lemia greita navikinių ląstelių proliferacija, geležies jonų koncentracija ir kai kurių hemo ciklo fermentų veiklos aktyvumas. S.C.Garcia ir bendraautoriai [17] atliko *in vitro* 5-aminolevulininės rūgšties pernešimo per hematoencefalinį barjerą eksperimentinių žiurkių smegenyse tyrimą. Nustatyta,

kad 5-ALA iš kraujo gali patekti į ląstelę kirtusi hematoencefalinį barjerą, tačiau negali būti atiduota atgal į kraują. Tačiau in vivo atlikti eksperimentiniai tyrimai parodė, kad nepažeistas hematoencefalinis barjeras tik silpnai pralaidus 5-aminolevulininės rūgšties molekulėms [25]. Todėl navikas yra potencialus taikiny 5-ALA indukuotam PpIX.

Mūsų gauti eksperimentiniai rezultatai parodė, kad žiurkių smegenų navikas – glioma selektyviai kaupia ženkliai daugiau PpIX nei sveikos smegenys (fluorescencijos kontrastas siekia 1:1,4 – 1:8,7). Panašius duomenis pateikia ir kiti autoriai, tyrę 5-ALA indukuoto PpIX selektyvų kaupimąsi skirtinguose eksperimentiniuose glijos navikuose [22,27,57]. Pažymėtina, kad didelės 5-ALA dozės gali sulėtinti porfirinų biosintezę [25]. Tam įtakos gali turėti porfobilinogeno deminazės (PBGD) ir uroporfirinogeno deminazės fermentų veiklos aktyvumas. Tai galėtų paaiškinti mūsų gautus eksperimentinius rezultatus tiriant protoporfirino IX kaupimąsi C6 gliomose. Naudojant 100 mg/kg 5-ALA dozę maksimali koncentracija navike pasiekama praėjus 3 val. po injekcijos, tuo tarpu didžiausias fluorescencijos intensyvumų santykis tarp sveikų smegenų ir naviko gaunamas praėjus 6 val. po injekcijos. Naudojant tris kartus didesnę 5 - ALA dozę (300 mg/kg) gautas panašus fluorescencijos intensyvumų santykis praėjus 6 val. po 5 - ALA injekcijos, kuomet sveikų smegenų fluorescencijos intensyvumas nukrenta iki savosios fluorescencijos lygio.

Tyrimų metu gauta, kad sveikų smegenų audinių naviko pažeistame smegenų pusrutulyje fluorescencija intensyvesnė nei sveikų smegenų iš priešingo smegenų pusrutulio. Pažeistas hematoencefalinis barjeras palengvina porfirinų patekimą į gretimus sveikų smegenų audinius bei įtakoja jų sensibilizaciją. Padidėjęs sveikų smegenų fluorescencijos fonas įneša tam tikrų paklaidų vertinant naviko išplitimo ribas. Ypač tai aktualu fluorescencijos vaizdinime. Taip pat pažymėtina, kad smegenų dangalas, antkaulis pasižymi pakankamai intensyvia PpIX būdinga fluorescencija. Panašius pastebėjimus atliko ir keletas kitų mokslinių grupių [57,22]. Autoriai pabrėžia, kad tiek in vitro, tiek ir in vivo buvo stebimas 5 – ALA indukuoto PpIX kaupimasis kai kuriose normaliose smegenų struktūrose – kraujagysliniame rezginyje, didžiojoje smegenų jungtyje, kraujagyslių

endotelyje, bei baltojoje smegenų substancijoje esančioje šalia naviko ribų. PpIX kaupimasis kraujagysliniame rezginyje esant nepažeistam hematoencefaliniam barjerui aiškinamas dviem galimais mechanizmais: nepriklausomas nuo Na^+ transporto sistemų mechanizmas, susijęs su pH (mažesnis pH stimuliuoja kaupimąsi); arba priklausomas nuo Na^+ ir HCO_3^- mechanizmas, susijęs su organinių anijonų transportu [58]. W. Stummer ir bendraautoriai [59] atliko tyrimus, kuriuose parodė, kad sensibilizatorius dėl vazogeninės edemos, kuri atsiranda pažeidus hematoencefalinį barjerą, gali pasiekti gretimus, už naviko ribų esančius sveikus audinius. Nustatyta, kad protoporfirino IX prasiskverbimo gylis yra tapatus edemos prasiskverbimui į gilesnius audinius (siekė maždaug 5 mm praėjus 4 val. po injekcijos). Savo vėlesniuose tyrimuose [13] autoriai, tirdami 5-ALA indukuoto PpIX kaupimąsi eksperimentiniuose C6 navikuose, įrodė, kad praėjus 6 val. po injekcijos PpIX dėl edemos prasiskverbia maždaug 1,5 mm, ir šis atstumas išlieka nepakitęs praėjus 9 val. po 5-ALA injekcijos (naudota 100mg/kg dozė). Autoriai pažymi, kad glijos navikų infiltracijos mastai yra didesni nei registruojami, aplink naviką esančių sveikų smegenų padidėjusi fluorescencija. Taigi, edemos sąlygota sveikų smegenų fluorescuojanti 1,5 mm sritis nėra kritinė paribinei naviko sričiai įvertinti. Utsuki ir bendraautorių [60] atlikti klinikiniai tyrimai parodė, kad PpIX fluorescencija registruojama ne tik metastaziniuose galvos smegenų navikuose, bet ir aplinkinėse infiltruotose arba neinfiltuotose sveikų audinių srityse, kurios buvo paveiktos naviko sukeltos edemos. Sveikų smegenų sensibilizacija taip pat stebėta eksperimentiniuose navikuose naudojant ir kitus sensibilizatorius [61]. Taigi, pašalinus naviko centrinę dalį, gali kilti sunkumų identifikuojant išplitusias naviko liekanas gretimose sveikose smegenyse. Tai ypač aktualu lokalizuojant naviko išplitimo ribas fluorescencijos vaizdo dėka ar fotodinaminės terapijos veiksmingumui užtikrinti. Pažymėtina, kad skirtingos žmogaus gliomos ląstelių kultūros taip pat pasižymi labai savitu PpIX fluorescencijos intensyvumu [62]. Tai reiškia, jog pašalinus naviko centrinę dalį nedideli navikinių ląstelių segmentai paribinėje srityje gali fluorescuoti skirtingu intensyvumu priklausomai nuo paciento. Ne visuomet galime turėti pakankamą optinį kontrastą sveiko ir navikinio audinio diferenciacijai. Savitas PpIX

kaupimasis glijos ląstelėse taip pat gali turėti įtakos fotodinaminės terapijos veiksmingumui, nes ląstelėje sukaupto endogeninio porfirino koncentracija yra esminis rodiklis gydymo veiksmingumui užtikrinti.

Atlikta eksperimentinių duomenų statistinė analizė parodė, kad eksperimentinės operacijos metu galvos smegenų gliomos diagnozuotos 83 % jautrumu, 69 % specifiškumu ir 73 % tikslumu vertinant mikroskopo kontrolėje. Tuo tarpu intraoperaciniu spektrofluorimetriniu būdu žiurkių galvos smegenų piktybinės gliomos identifikuotos su 83 % jautrumu, 84 % specifiškumu ir 87 % tikslumu. Abiejų metodų jautrumas, specifiškumas ir tikslumas skaičiuoti „auksiniu standartu“ (šimtaprocentinis patikimumas) laikant morfologinio tyrimo išvadas. Šie tyrimo duomenys įrodo, kad spektrofluorimetrinio metodo tikslumas (teisingų diagnozių skaičius) yra didesnis nei tais atvejais, kai diagnozė nustatoma mikroskopo kontrolėje. Taigi, siekiant atskirti smegenų naviką ir sveiką audinį, pakanka atlikti sensibilizuotos fluorescencijos spektrų analizę ir įvertinti spektrinius pokyčius ties pirmąją PpIX fluorescencijos smaile. Statistinė duomenų analizė atlikta apskaičiuojant integrinio intensyvumo vertes, vertinant normuotų sveikų smegenų audinių ir glijos naviko fluorescencijos spektrų vidurkių integrinius intensyvumus, gautus suintegravus plotą po pirmąją PpIX smaile. Gauti fluorescencijos intensyvumo pokyčiai parodė, kad dėl selektyvaus PpIX kaupimosi eksperimentiniame galvos smegenų navike spektrofluorimetrinis metodas yra tikslesnis būdas gliomai atpažinti. Gautus parametrus sunku palyginti su spaudoje skelbiamais, kadangi daugelis mokslinių grupių naudoja skirtingas eksperimentines sąlygas bei skirtingus analizės būdus. Intraoperacinė fluorescencinė navikinių darinių išplitimo ribų lokalizacija bei naviko pašalinimas dažniausiai atliekami remiantis fluorescencijos vaizdu [19,13] ir vizualiai įvertinant besiskiriančių audinių segmentus. Tačiau infiltruojamos naviko sritys paprastai pasižymi daug silpnesne fluorescencija. Siekiant kiekybiškai įvertinti sukaupto PpIX kiekį proliferuojančio naviko audinyje ir naviko infiltravimo į sveikus audinius srityje patogiu pasinaudoti taškine fluorescencijos spektrų registravimo sistema. Darbe palyginome du metodus – vizualinį vertinimą mikroskopu, bei spektrofluorimetrinio metodo duomenis – fluorescencijos integrinio intensyvumo,

apskaičiuoto integruojant plotą po spektrine kreive 620 – 660 nm spektrinėje srityje, vertės pokytis. Įvertinti kiekybiniai parametrai rodo, kad spektrofluorimetrija yra daug tikslesnis būdas gliomos atpažinimui bei galėtų būti papildoma efektyvi priemonė lokaliai gliomų chirurginei diagnostikai. Nors nedaugelis autorių nagrinėja spektrinių skirtumų savitumus, tačiau mes akivaizdžiai parodėme, kad šis būdas yra veiksmingas ir pakankamai tikslus gliomos identifikavimui pasitelkiant optinius metodus.

Kombinuotas fluorescencijos spektrų bei vaizdų taikymas kartu įgalintų objektyviau įvertinti naudojamo sensibilizatoriaus individualius kaupimosi efektyvumo rodiklius (inkubacijos trukmę ir sukaupto PpIX kiekį). Tokie duomenys būtų itin naudingi apibrėžiant individualias vaisto dozes, sensibilizatoriaus kaupimosi ypatumus priklausomai nuo individo ar naviko tipo bei tikslesniam naviko paribinės - infiltracinės srities identifikavimui. Kadangi pagrindinis veiksnys, neigiamai veikiantis gliomos pašalinimo pasitelkiant fluorescencijos vaizdinimą rezultatus, yra nedideli navikinių ląstelių segmentai po naviko masės pašalinimo chirurginiu būdu, siūloma ir fotodinaminė terapija, kaip pagalbinis metodas siekiant sunaikinti navikinių ląstelių likučius, išsisejusius navikui gretimuose sveikų smegenų audiniuose [63-65]. Šiuo atveju, taškinė spektrofluorimetrinė sistema suteiks reikiamos informacijos paribinės srities identifikavimui bei PpIX kiekiui įvertinti, o tuo pačiu galėtų būti panaudojama sekti fotodinaminės terapijos vyksmui ir jos sukeliama poveikio kontrolei.

Atlikta glijos navikų fluorescencijos vaizdinės informacijos analizė įgalino tiksliau išskirti stipriau fluorescuojančias, naviko pažeistas sritis greta esančių sveikų smegenų audinių, bei galėtų būti tinkamu rodikliu audinių biopsijoms vėlesniam morfologiniam tyrimui. Akivaizdu, jog esant neabejotinam navikui, kuomet naviko ląstelingumas nedidelėje srityje yra pakankamai didelis, stebimas daug geresnis fluorescencijos intensyvumo kontrastas, kas leidžia aiškiau apibrėžti naviko paviršiaus kontūrą (lokalizaciją) vadovaujantis fluorescencijos vaizdu. Tačiau tikrosios išplitimo ribos visgi lieka neaiškios. Fluorescencijos vaizdų analizė leidžia išsyk įvertinti glijos naviko išplitimo sritį dideliame sveikų audinių apžvalgos plote vadovaujantis fluorescencijos intensyvumo kontrastu, tačiau

spektroskopiniu požiūriu suteikia mažiau naudingos informacijos ir vertinimo patikimumui būtina atlikti morfologinius tyrimus.

Atsižvelgiant į iškeltą šio darbo tikslą, galime teigti, kad fluorimetrinių metodų dėka galime ne tik atpažinti glijos naviką, bet ir tiksliau lokalizuoti piktybinį darinį gretimuose sveikuose audiniuose, nurodant įtartinas smegenų audinio sritis audinių biopsijoms. Taškinė PpIX fluorescencijos spektrinių savitumų paieškos sistema yra itin veiksmingas ir tikslus būdas aptikti navikinių darinį bei, tikėtina, taps pagrindine alternatyvia priemone galvos smegenų navikų išplitimo ribų nustatymui klinikiniam taikymams. Fluorescencijos vaizdinimo sistema taip pat yra tinkama priemonė lokalizuoti naviko židinius, tačiau būtina tam tikra duomenų analizės metodika, kuri padėtų tiksliau atvaizduoti abejotino audinio srities savitumus.

Šiai dienai yra atlikti ne tik eksperimentiniai ikiklinikiniai tyrimai [66], bet ir vykdomi jau III fazės klinikiniai tyrimai piktybinės gliomos šalinimui fluorescencijos vaizdo kontrolėje [67-68]. Autorių duomenimis, pagrindiniai faktoriai įtakojantys išgyvenamumą po gliomos rezekcijos fluorescencijos vaizdo pagalba yra nedideli navikinių ląstelių segmentai, kurie lieka nepastebėti, bei ribotas mėlynos šviesos prasiskverbimo gylis (< 0.5 mm) [69]. Kaip alternatyvi papildoma priemonė siūloma fotodinaminė terapija po naviko masės pašalinimo padidinant intervencijos agresyvumą [67,70-71], arba padidinti registruojamų fluorescencijos vaizdų kontrastingumą: pasitelkiant jautresnes CCD kameras, naudoti keletą žadinančių/emisijos bangos ilgių analizę tikslesnei vaizdinei informacijai gauti operacijos metu [72].

Apibendrinimas – 5-ALA indukuoto PpIX fluorescencijos taikymas klinikoje

Nepaisant chirurginio naviko pašalinimo, radioterapijos ir chemoterapijos, vidutinė išgyvenamumo trukmė, pacientų, kenčiančių nuo galvos smegenų gliomos, vis dar neviršija 15 mėnesių. Dėl infiltracinio galvos smegenų gliomų augimo bei panašumo į aplinkinį sveiką smegenų audinį, radikalus naviko pašalinimas išlieka esminiu veiksniu, turinčiu įtakos paciento gyvenimo trukmei. Net ir tais atvejais, kai naviko šalinimas atliekamas pasitelkiant neuronavigacines priemones (magnetinį branduolių rezonansą, kompiuterinę tomografiją), tik mažiau nei 20 proc. atvejų pasiekiamas pilnutinis naviko pašalinimas [73]. Pagrindinė problema, su kuria susiduria neurochirurgas, - sunku tiksliai nustatyti naviko išplitimo ribas operacijos metu. Taigi, inovatyvių, efektyvių ir saugių metodų gliomos diagnostikai poreikis yra akivaizdus.

Fluorimetriniai metodai suteikia svarbios informacijos apie audinio sandarą, morfologiją ir biochemiją įvairiu aspektu, todėl neatsitiktinai yra itin patrauklūs ir plačiai taikomi daugelyje praktinės medicinos sričių. Nors kiekvienai metodikai paprastai taikomi skirtingi algoritmai kiekybinių pokyčių paieškai (parenkant charakteringiausias tiek žadinimo, tiek ir emisijos bangos ilgius), naviko identifikavimui ar jo išplitimo ribų vaizdinimui aplinkiniuose sveikuose audiniuose, tačiau fluorimetrinių metodų jautrumas biologinio objekto būsenai, jų įvairiapusiškumas bei adaptyvumas yra pagrindiniai kriterijai apsprendžiantys jų patrauklumą ir tinkamumą klinikai. Kombinuojant esamas metodikas kartu su optinėmis galima pasiekti daug geresnių rezultatų, padidinti chirurgo galimybes audinių klasifikacijai, sukaupti papildomos informacijos apie skirtingų glijos navikų PpIX kaupimo savitumus, bei kontroliuoti ir vaizdinti navikinio darinio ribas in vivo, net ir tais atvejais, kai spektriniai skirtumai yra nežymūs.

Pirmasis klinikinis taikymas 5-ALA indukuoto PpIX pacientams, kenčiantiems nuo piktybinio galvos smegenų naviko – gliomos, buvo paskelbtas 1998 m. Stummer ir bendraautorių [13]. Būtent šių tyrėjų grupė pasiūlė patobulintus standartiniam chirurginiam mikroskopui, papildomai įdiegiant fluorescencijos vaizdinimo sistemą (tai įgyvendino Carl Zeiss kompanija), siekiant pagerinti pacientų išgyvenamumą bei suteikti chirurgui galimybę tiksliau

lokalizuoti navikinį darinį šalinimo metu. Panaudojant 20 mg/kg 5-ALA dozę (medikamentinis preparatas - Gliolanas), yra indukuojamas pakankamas PpIX kiekis, kuris selektyviai kaupiasi galvos smegenų navike ir remiantis fluorescencijos vaizdu įgalina atpažinti navikinį darinį [74]. Pilnutinis naviko pašalinimas pasitelkiant fluorescencinį vaizdą siekia iki 65 proc. atvejų, lyginant su 20 proc. pasiekiamu operuojant įprastu būdu (baltoje mikroskopo šviesoje).

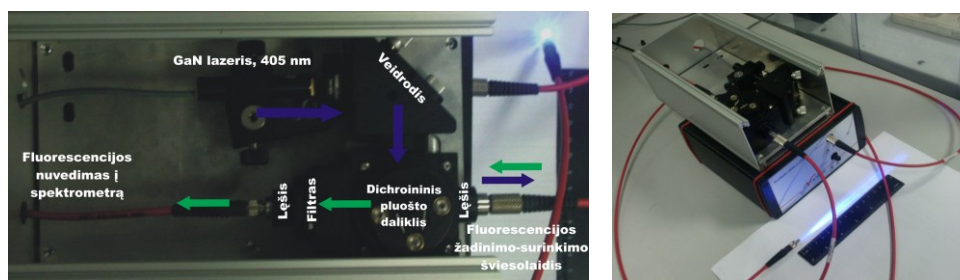
Galvos smegenų naviko fluorescencija nėra homogeniška: naviko centrinė dalis – nekrotinis audinys, paprastai nefluorescuoja arba labai fluorescuoja nežymiai, tačiau aplink jį esanti gyvybinga - sparčiai proliferuojančių ląstelių - navikinio audinio sritis pasižymi gana intensyvia fluorescencija, kuri ima slopti einant giliau į sveikų smegenų audinių pusę. Būtent ši blyškesnė fluorescencija atspindi naviko infiltratyvų augimą – navikinių ląstelių tankis kraštuose stipriai sumažėja ir nepalieka aiškios ribos su sveiku smegenų audiniu. Atlikti klinikiniai tyrimai patvirtino, kad būtina pašalinti ir tas blyškiai fluorescuojančias sritis siekiant pagerinti pacientų išgyvenamumą. Tačiau tai nėra paprastas uždavinys operuojančiam chirurgui. Pagrindiniai veiksniai, įtakojančys fluorescencijos vaizdinimo informaciją, yra mikroskopo objektyvo atstumas iki operacinio lauko, nepakankamai intensyvus mėlynos šviesos srautas (ribojama mikroskopo optikos), šėšėlių susidarymas dėl paviršiaus reljefo netolygumų, kraujavimas bei mikroskopo objektyvo orientavimas įvairiais kampais. Todėl lengviausia atpažinti ir pašalinti intensyviausiai fluorescuojančią navikinio darinio sritį, tačiau blyškesnė sritis gali lengvai likti nepastebėta. Fluorescencijos vaizdo panaudojimas galvos smegenų navikų šalinimui vis dar intensyvių tyrimų eigoje.

Visgi daugelio eksperimentinių ir klinikinių tyrimų rezultate buvo įsitikinta, kad vien tik fluorescencijos vaizdo nepakanka ir būtinos papildomos priemonės glijos naviko ribų kontrolei operacijos metu. Mažų naviko infiltracijos židinių aptikimui yra siūlomas šviesolaidinis zondas, kuris suteiktų papildomos informacijos audinių spektrinių savitumų analizei. Mobilus, mažų matmenų, rankoje laikoma šviesolaidinė sistema, panaudojant puslaidininkinį 405 nm bangos ilgio lazerį, leistų selektyviai sužadinti PpIX, identifikuoti skirtingus galvos smegenų audinių spektrinius savitumus bei daug tiksliau lokalizuoti naviko išplitimo ribas, o

tuo pačiu padidintų šalinimo radikalumą. Eljamel ir bendraautoriai [75] paskelbė 114 piktybinių galvos smegenų navikų (iš jų 39 piktybinės gliomos) tyrimo rezultatus naviko šalinimo ribų kontrolei panaudojant šviesolaidinę sistemą. Žadinant 405 nm GaN lazeriu piktybinės gliomos buvo identifikuotos 85,7 proc. jautrumu, plaučių metastazės – 83,3 proc., o hipofizės adenoma – 87,5 proc. jautrumu. Visiškas naviko pašalinimas pasiektas 77 proc. visų navikų. Tai vienas pirmųjų klinikinių tyrimų įrodančių taškinės fluorescencijos spektrinių savitumų paieškos sistemos potencialą neurochirurgijoje.

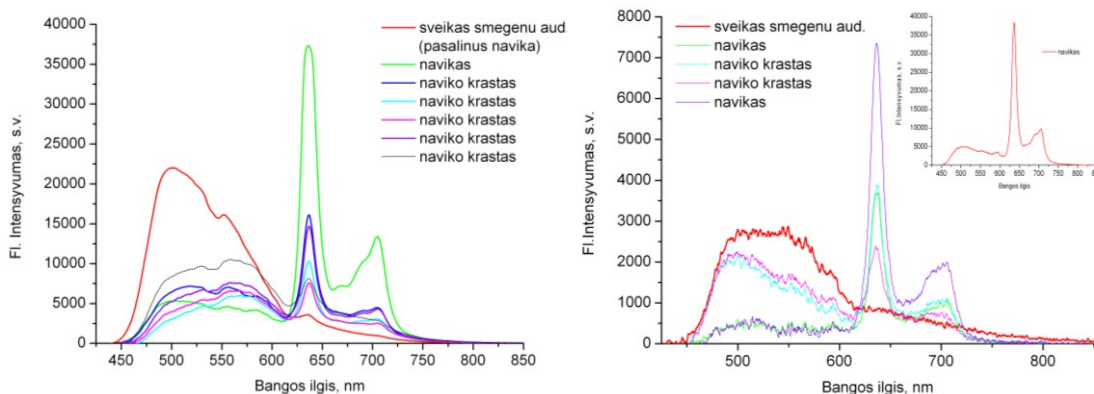
Bendradarbiaujant su Vilniaus greitosios pagalbos universitetinės ligoninės neurochirurgais (neurochirurgu A.Šitkausku) buvo atliktas ikikliniškas tyrimas panaudojant spektrofluorimetrinį metodą galvos smegenų navikų atpažinimui intraoperaciniu būdu. Šiam tikslui buvo surinkta mobili šviesolaidinio zondo sistema galvos smegenų audinių spektrinių savitumų analizei atlikti (2.29 pav.). Fluorescencijos žadinimui buvo panaudotas nuolatinės veikos GaN puslaidininkinis lazeris, spinduliuojantis 405 nm bangos ilgio spinduliuotę. Lazerio spinduliuotė aliumininiu veidrodžiu nukreipiama į fluorescencijos žadinimo – surinkimo mazgą, nuo dichroinio pluošto daliklio atsispindėjusi žadinančioji spinduliuotė lęšiu surenkama į žadinimo – surinkimo šviesolaidį (suvedimo efektyvumas apie 75 proc. (šviesolaidžio išėjime gaunama apie 12 mW), skaidulos skersmuo – 600 μm, ilgis 2 m). Fluorescencijos signalas tuo pačiu šviesolaidžiu patenka atgal į fluorescencijos žadinimo – surinkimo mazgą, praeina dichroinį pluošto daliklį ir papildomą filtrą žadinimo spinduliuotei atkirsti bei lęšiu surenkama į registravimo šviesolaidį sujungtą su Avantes spektrometru.

Didesnio diametro fluorescencijos žadinimo-surinkimo šviesolaidis pasirinktas tam, kad galima būtų ne tik užregistruoti įtartiną srities spektrą nekontaktiniu būdu esant kuo mažesnei signalo kaupimo trukmei (pasirinkta 50 ms signalo kaupimo trukmė), tačiau ir atlikti vizualinę apžiūrą – akimi stebėti fluorescuojantį navikinį darinį ir taip kontroliuoti jo šalinimą.



2.29 pav. Mobilios fluorescencijos žadinimo-surinkimo sistemos schema

Šviesolaidinė fluorescencijos žadinimo – surinkimo sistema įgalino aptikti PpIX charakteringą fluorescenciją glijos navikuose operacijos metu ir tokiu būdu leido lokalizuoti jo išplitimo ribą greta esančiuose sveikuose smegenų struktūrose, o tuo pačiu padidino šalinimo radikalumą. Operacijos metu užregistruotų fluorescencijos spektrų pavyzdžiai pateikti 2.30 pav.



2.30 pav. Žmogaus galvos smegenų naviko ir greta esančių sveikų smegenų audinių fluorescencijos spektrai užregistruoti naudojant mobilią šviesolaidinę fluorescencijos žadinimo-surinkimo sistemą (20mg/kg 5-ALA dozė, Gliolanas)

Pasitelkiant taškinę fluorescencijos detekcijos sistemą, galime išsyk atlikti naviko guolio zondavimą, aptikti net ir silpnai fluorescuojančias naviko liekanas bei parinkti teisingas audinio sritis histopatologiniam tyrimui. Tokia sistema galėtų papildyti baltos šviesos chirurginius mikroskopus bei stipriai padidintų šių navikų šalinimo radikalumą, o tuo pačiu suteiktų chirurgams didesnio pasitikėjimo kontroliuojant šalinimo apimtį bei, tikėtina, padidintų pacientų išgyvenamumo trukmę. Be to, šią sistemą galima būtų nesunkiai modifikuoti įvedant antrąjį žadinimo bangos ilgį - raudoną lazerio spinduliuotę (630 nm), atitinkančią paskutiniąją PpIX sugerties smailę, kurios prasiskverbimo gylis į smegenų audinius yra didesnis nei mėlynos spinduliuotės. Tokiu būdu fluorescencijos intensyvumo

pokytis ties antrąja PpIX smaile, ties 705 nm, tarnautų kaip diagnostinis žymuo, atspindintis giliau esančių navikinių ląstelių sankaupas, arba kaip rodmuo sensibilizatoriaus blyškimo fotodinaminės terapijos poveikyje.

Akivaizdu, kad fluorescencinė spektroskopija galėtų tapti svarbia papildoma diagnostine priemone patologijos židinių identifikavimui, uždegiminių ar infekcijos pažaidų lokalizavimui in vivo praktinės medicinos reikmėms. Ji perspektyvi klinikinėse situacijose, kuomet kiti taikomi metodai yra nenaudingi identifikuojant piktybinį darinį arba jį šalinant. Klinikinių taikymų sritys ženkliai prasiplėstų, jei atsirastų galimybė išsyk išgauti histocheminės informacijos remiantis audinio fluorescencijos savitumais. Pagaliau, fluorescencinė spektroskopija gali būti panaudota neinvaziniu būdu testuoti ligos savybes, ko dabartiniai patologai negali, atlikti metabolinių vyksmų, išemijos ar net nekrozės monitoringą laike. Ši papildoma informacija galėtų praplėsti turimas žinias apie įvairių ligų etiologiją ir patogenezę bei taptų efektyvesne diagnostikos priemone ankstyvai ligų diagnozei.

2.5. Literatūra

1. I.Gudinavičienė, D.Pranyš, E.Juozaitytė, Gliomų morfologijos ir biologijos įtaka jų prognozei, *Medicina* 40(2):112-120 (2004)
2. V.Jaškevičienė, J.Šidiškis, Centrinės nervų sistemos navikai: paplitimas, klasifikacija, klinika, apskaita, *Neurologijos seminarai Vol. 1-2*: 46-54 (2002)
3. M.Ammirati, N.Vick, Y.Liav, I.Ciric, M.Mikhael, Effect of the extent of surgical resection on survival and quality of life in patients with supratentorial glioblastomas and anaplastic astrocytomas, *Neurosurg* 21:201-206 (1987)
4. M.S.Beger, G.E.Keles, G.A.Ojemann, S.Gratan, A.Deliganis, Extent of resection affects recurrence patterns with low grade gliomas, *Cancer* 74:1784 (1994)
5. G.M.Greene, P.W.Hitchow, R.L.Schelper, W.Yuy, G.N.Dyste, Diagnostic yield in CT-guided stereotaxic biopsies in gliomas, *J Neurosurg* 71:494-497 (1989)
6. P.J.Kelly, C.Daumas-Duport, D.S.Kispert, B.A.Kall, B.W.Scheithauer, J.J.Illig, Image-guided stereotaxic serial biopsies in untreated glial neoplasms, *J Neurosurg* 66:865-874 (1987)
7. U.Oppitz, D.MAessen, H.Zunterer, S.Richter, M.Flentje, 3D - recurrence-patterns of glioblastomas after CT-planned postoperative irradiation, *Radiother Oncol* 53(1):53-57 (1999)
8. K.E.Walner, J.H.Galicich, G.Krol, E.Arbit, M.G.Malkin, Patterns of failure following treatment for glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma, *Intern J Radiat Oncol Biol Phys* 16(6):1405-1409 (1989)
9. G.E.Keles, B.Anderson, M.S.Berger, The effect of extent of resection on time to tumor progression and survival in patients with glioblastoma multiforme of the cerebral hemisphere, *Surg Neurol* 52:371-379 (1999)
10. M.Kriegmair, R.Baumgartner, R.Knuechel, P.Steinbach, A.Ehsan, W.Lumper, F.Hofstadter, A.Hofstetter, Fluorescence photodetection of neoplastic urothelial lesions following intravesical instillation of 5-aminolevulinic acid, *Urology* 44:836-841 (1994)
11. M.Kriegmair, R.Baumgartner, R.Knuechel, H.Stepp, F.Hofstadter, A.Hofstetter, Detection of early bladder cancer by 5-aminolevulinic acid induced fluorescence, *J Urology* 155:105-110 (1996)
12. G.Bottiroli, A.C.Croce, D.Locatelli, R.Nano, E.Giombelli, A.Messina, E.Benericetti, Brain tissue autofluorescence: An aid for intraoperative delineation of tumor resection margins, *Cancer Detection and Prevention* 22(4):330-339 (1998)
13. W.Stummer, S.Stocker, S.Wagner, H.Stepp, C.Fritsch, C.Goetz, A. E.Goetz, R.Kiefmann, H.J.Reulen, Intraoperative detection of malignant gliomas by 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin fluorescence, *Neurosurgery* 42:519-526 (1998)
14. S.Montan, L.G.Strömblad, Spectral characterization of brain tumours utilizing laser-induced fluorescence, *Lasers Life Sci* 1:275-285 (1987)
15. S.Andersson-Engels, A.Elner, J.Johansson, S.E.Karlsson, L.G.Salford, L.G.Strömblad, K.Svanberg, S.Svanberg, Clinical recording of laser-induced fluorescence spectra for evaluation of tumour demarcation feasibility in selected clinical specialities, *Lasers in Medical Science* 6:415-424 (1991)
16. Y.G.Chung, J.A.Schwartz, C.M.Gardner, R.E.Sawaya, S.L.Jacques, Diagnostic potential of laser-induced autofluorescence emission in brain tissue, *J.Korean Med Sci* 12:135-142 (1997)
17. S.C.Garcia, M.B.Moretti, M.V.R.Garay, A.Battle, δ -Aminolevulinic acid transport through blood-brain barrier, *Gen Pharmac* 31(4):579-582 (1998)
18. W.S.Lin, A.S.Toms, M.Johnson, E.D.Jansen, A.Mahadevan-Jansen, In vivo brain tumour demarcation using optical spectroscopy, *Photochem Photobiol* 73:396-402 (2001)
19. A.Zimmermann, M.Ritsh-marte, H.Kostron, mTHPC-mediated photodynamic diagnosis of malignant brain tumours, *Photochem Photobiol* 74(4):611-616 (2001)
20. W.Stummer, A.Novotny, H.Stepp, C.Goetz, K.Bise, H.J.Reulen, Fluorescence-guided resection of glioblastoma multiforme by using 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins: a prospective study in 52 consecutive patients, *J Neurosurg* 93:1003-1013 (2000)

21. W.S.Poon, K.T.Schomacker, T.F.Deutsch, R.L.Martuza, Laser-induced fluorescence: experimental intraoperative delineation of tumor resection margins, *J Neurosurg* 76:679-686 (1992)
22. K.M.Hebeda, A.E.Saarnak, M.Olivo, H.J.C.M.Sterenborg, J.G.Wolbers, 5-Aminolevulinic acid induced endogenous porphyrin fluorescence in 9L and C6 brain tumour and in the normal rat brain, *Acta Neurochirurgica* 140:503-513 (1998)
23. S.Gupta, B.S.Dwarakanath, K.Muralidhar, V.Jain, Cellular uptake, localization and photodynamic effects of haematoporphyrin derivative in human glioma and squamous carcinoma cell lines, *J Photochem Photobiol B: Biol* 69:107-120 (2003)
24. T.Kuroiwa, Y.Kajimoto, T.Ohta, Development of a fluorescein operative microscope for use during malignant glioma surgery a technical note and preliminary report, *Surg Neurol* 50:41-49 (1998)
25. A.A.Juknat, M.L.Kotler, A.M. del C.Battle, High δ -Aminolevulinic acid uptake in rat cerebral cortex: effect on porphyrin biosynthesis, *Comp Biochem Physiol* 111C(1):143-150 (1995)
26. F.B.McGillion, G.G.Thompson, A.Goldberg, Tissue uptake of delta-aminolevulinic acid, *Biochem Pharmacol* 24:299-301 (1975)
27. M.Olivio, B.C.Wilson, Mapping ALA-induced PPIX fluorescence in normal brain and brain tumour using confocal fluorescence microscopy, *Int J Oncol* 25:37-45 (2004)
28. Grobber, P.P.De Deyn, H.Slegers, Rat C6 glioma as experimental model system for the study of glioblastoma growth and invasion, *Cell Tissue Res* 310:257-270 (2002)
29. K.Skauminas, Piktybinių galvos smegenų gliomų prognozės ir chirurginės fluorescencinės diagnostikos galimybės, Daktaro disertacija, Kaunas 2003
30. G.A.Wagnieres, W.M.Star, B.C.Wilson, In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications, *Photochem Photobiol* 68:603-632 (1998)
31. G.Bottiroli, A.C.Croce, D.Locatelli, R.Marchesini, E.Piguoli, S.Tomatis, C.Cuzzoni, S.Di Palma, M.Dalfante, P.Spinelli, Natural fluorescence of normal and neoplastic colon: a comprehensive „ex vivo“ study, *Lasers Surg Med* 16:48-60 (1995)
32. M.M.H.El-Sharabay, A.M.El-Wassel, M.M.Hafez, S.A.Salim, Porphyrin metabolism in some malignant diseases, *Br J Cancer* 65:409-412 (1992)
33. R.Rotomskis, G.Streckytė, Fluorescencinė navikų diagnostika, *Medicina* 40(12):1219-1230 (2004)
34. A.Croce, S.Fiorani, D.Locatelli, R.Nano, M.Ceroni, F.Tancioni, E.Giombelli, E.Benericetti, G.Bottiroli, Diagnostic potential of autofluorescence for an assisted intraoperative delineation of glioblastoma resection margins, *Photochem Photobiol* 77(3):309-318 (2003)
35. W.H.Yong, P.V.Butte, B.K.Pikul, J.A.Jo, Q.Fang, T.Papaioannou, K.L.Black, L.Marcu, Distinction of brain tissue, low grade and high grade glioma with time-resolved fluorescence spectroscopy, *Front Biosci* 11:1255-1263 (2006)
36. A.Saraswathy MPhil, R.S.Jayasree, K.V.B.MPhil, A.K.Gupta, V.P.Mahadevan Pillai, Optimum wavelength for the differentiation of brain tumor tissue using autofluorescence spectroscopy, *Photomed Laser Surg* 27(3):425-433 (2009)
37. J.-M.Camadro, N.G.Ibrahim, R.D.Levere, Kinetic studies of human liver ferrochelatase. Role of endogenous metals, *J Biol Chem* 259:5678-5682 (1984)
38. D.Hart, S.Piomelli, Simultaneous quantitation of zinc protoporphyrin and free protoporphyrin in erythrocytes by acetone extraction, *Clin Chem* 27:220-222 (1981)
39. R.F.Labbe, A.Dewanji, K.McLaughlin, Observations on the zinc protoporphyrin/heme ratio in whole blood, *Clin Chem* 45:146-148 (1999)
40. G.Bottiroli, F.Docchio, R.Ramponi, C.Asacchi, R.Supino, A 580 nm emission in haematoporphyrin-derivative solution and in treated cells, *Lasers Med Sci* 1:33-39 (1986)
41. A.Andreoni, R.Cubuddu, Properties of the blue-shifted emission of hematoporphyrin and related derivatives in aqueous solution, *Chem Phys Lett* 100(6):503-507 (1983)
42. P.Juzenas, V.Iani, S.Bagdonas, R.Rotomskis, J.Moan, Fluorescence spectroscopy of normal mouse skin exposed to 5-aminolevulinic acid and red light, *J Photochem Photobiol B: Biol* 61:78-86 (2001)

43. M.R.Moore, The biochemistry of heme synthesis in porphyria and in the porphyrinurias, *Clinics in Dermatology* 16:203-223 (1998)
44. K.Konig, A.Kienle, W.-H.B.R.Kaufmann, A.Ruck, T.M.R.Steiner, Photodynamic tumor therapy and on-line fluorescence spectroscopy after ALA administration using 633 nm light as therapeutic and fluorescence excitation radiation, *Opt Engineer* 33(9):2945-2952 (1994)
45. G.Weagle, P.E.Paterson, J.Kennedy, R.Pottier, The nature of the chromophore responsible for naturally occurring fluorescence in mouse skin, *J Photochem Photobiol B* 2(3):313-320 (1988)
46. J.Hugo, J.Krijt, M.Vokurka, V.Janousek, Secretory response to light in rat harderian gland: possible photoprotective role of harderian porphyrin, *Gen Physiol Biophys* 6:401-404 (1987)
47. L.Wetterberg, E.Geller, A.Yuwiller, Harderian gland: an extraretinal photoreceptor influencing the pineal gland in neonatal rats? *Science* 167:884-885 (1970)
48. J.M.Tomio, M.Grinstein, Porphyrin biosynthesis 5. Biosynthesis of protoporphyrin IX in Harderian Glands, *Europ J Biochem* 6:80-83 (1968)
49. E.R.dos Reis, E.M.D.Nicola, J.H.Nicola, Harderian gland of Wistar rats revised as a protoporphyrin IX producer, *Braz J Morphol Sci* 22(1):43-51 (2005)
50. M.Nagai, T.Nagai, M.Yamamoto, K.Goto, T.R.Bishop, N.Hayashi, H.Kondo, Y.Seyama, K.Kano, H.Fujita, S.Sassa, Novel regulation of δ -aminolevulinic acid synthase in the rat harderian gland, *Biochem Pharmacol* 53:643-650 (1997)
51. <http://www.emedicine.com/derm/topic473.htm> (2006-11-02 20:05 val.) M.B.Poh-Fitzpatrick, Erythropoietic protoporphyria (2006)
52. W.Dietel, K.Bolsen, E.Dickson, C.Fritsch, R.Pottier, R.Wendenburg, Formation of water-soluble porphyrins and protoporphyrin IX in 5-aminolevulinic-acid-incubated carcinoma cells, *J Photochem Photobiol B: Biol* 33:225-231 (1996)
53. B.K.T.Moesta, B.Ebert, T.Handke, D.Nolte, C.Nowak, W.E.Haensch, T.J.Dougherty, H.Rinneberg, P.M.Schlag, Protoporphyrin IX occurs naturally in colorectal cancers and their metastases, *Cancer Res* 61:991-999 (2001)
54. S.L.Gibson, D.J.Cupriks, J.J.Havens, M.L.Nguyen, R.Hilf, A regulatory role for porphobilinogen deaminase (PBGD) in δ -aminolevulinic acid (δ -ALA)-induced photosensitization?, *Br J Cancer* 77:235-243 (1998)
55. C.Fritsch, C.Abels, A.E.Goetz, W.Stahl, K.Bolsen, T.Rzicka, G.Goerz, H.Sies, Porphyrins preferentially accumulate in a melanoma following intravenous injection of 5-aminolevulinic acid, *Biol Chem* 378:51-57 (1997)
56. H.Fukuda, S.Paredes, A.M.Battle, Tumor-localizing properties of porphyrins. In vivo studies using free and liposome encapsulated aminolevulinic acid, *Comp Biochem Physiol B* 102:433-436 (1992)
57. W.Stummer, S.Stocker, A.Novotny, A.Heimann, O.Sauer, O.Kempfski, N.Plesnila, J.Wietzorrek, H.J.Reulen, In vivo and in vitro porphyrin accumulation by C6 glioma cells after exposure to 5-aminolevulinic acid, *J Photochem Photobiol B: Biol* 45:160-169 (1998)
58. L.Wyld, M.W.Reed, N.J.Brown, The influence of hypoxia and pH on aminolevulinic acid-induced photodynamic therapy in bladder cancer cells in vitro, *Br J Cancer* 77(10):1621-1627 (1998)
59. W.Stummer, C.Gotz, A.Hassan, A.Heimann, O.Kempfski, Kinetics of photofrin II in perifocal brain edema, *Neurosurg* 33(6):1075-1082 (1993)
60. S.Utsuki, N.Miyoshi, H.Oka, Y.Miyajima, S.Shimizu, S.Suzuki, K.Fujii, Fluorescence-guided resection of metastatic brain tumors using 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX: pathological study, *Brain Tumor Pathol* 24(2):53-55 (2007)
61. J.C.Tsai, M.C.Kao, Y.Y.Hsiao, Fluorespectral study of the rat brain and glioma in vivo, *Lasers Surg Med* 13:321-331 (1993)
62. F.Duffner, R.Ritz, D.Freudenstein, M.Weller, K.Dietz, J.Wessels, Specific intensity imaging for glioblastoma and neural cell cultures with 5-aminolevulinic acid-derived protoporphyrin IX, *J Neuro-Oncology* 71:107-111 (2005)

63. W.Stummer, A.Hassan, O.Kempski, C.Goetz, Photodynamic therapy within edematous brain tissue: considerations on sensitizer dose and time point of laser irradiation, *J Photochem Photobiol B: Biol* 36:179-181 (1996)
64. H.Kostron, A.Obwegeser, R.Jakober, Photodynamic therapy in neurosurgery: a review, *J Photochem Photobiol B: Biol* 36:157-168 (1996)
65. B.Olzowy, C.S.Hundt, S.Stocker, K.Bise, H.J.Reulen, W.Stummer, Photoirradiation therapy of experimental malignant glioma with 5-aminolevulinic acid, *J Neurosurg* 97(4):970-976 (2002)
66. A.Bogaards, A.Varma, S.P.Collens, A.Lin, A.Giles, V.X.D.Yang, J.M.Bilbao, L.D.Lilge, P.J.Muller, B.C.Wilson, Increased brain tumor resection using fluorescence image guidance in a preclinical model, *Lasers Surg Med* 35:181-190 (2004)
67. M.S.Eljamel, C.Goodman, H.Moseley, ALA and photofrin fluorescence-guided resection and repetitive PDT in glioblastoma multiforme: a single centre phase III randomised controlled trial, *Laser Med Sci* DOI 10.1007/s10103-007-0494-2 (2007)
68. W.Stummer, U.Pichlmeier, T.Meinel, O.D.Wiestler, F.Zanella, H.-J. Reulen, Fluorescence-guided surgery with 5-aminolevulinic acid for resection of malignant glioma: a randomised controlled multicentre phase III trial, *Lancet Oncol* 7:392-401 (2006)
69. V.X.Yang, P.J.Muller, P.Herman, B.C.Wilson, A multispectral fluorescence imaging system: design and initial clinical tests in intra-operative photofrin-photodynamic therapy of brain tumours, *Lasers Surg Med* 32(3):224-232 (2003)
70. S.J.Madsen, E.A.Petersen, S.Spetalen, S.W.Carper, S.A.Ziegler, H.Hirschberg, Photodynamic therapy of newly implanted glioma cells in rat brain, *Lasers Surg Med* 38(5):540-548 (2006)
71. J.Beck, F.W.Kreth, W.Beyer, J.H.Mehrkens, A.Obermeier, H.Stepp, W.Stummer, R.Baumgartner, Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX, *Lasers Surg Med* 39(5):386-393 (2007)
72. H.J.Sterenborg, A.E.Saarnak, R.Frank, M.Motamedi, Evaluation of spectral correction techniques for fluorescence measurements on pigmented lesions in vivo, *J Photochem Photobiol B* 35(3):159-165 (1996)
73. F.K.Albert, M.Forsting, K.Sartor, H.P.Adams, S.Kunze, Early postoperative magnetic resonance imaging after resection of malignant glioma: objective evaluation of residual tumor and its influence on regrowth and prognosis, *Neurosurg* 34:45-60 (1994)
74. J.Ch.Tonn, W.Stummer, Fluorescence-guided resection of malignant gliomas using 5-aminolevulinic acid: practical use, risks and pitfalls, *Clinical Neurosurg* 55:20-26 (2008)
75. M.S.Eljamel, Which intracranial lesions would be suitable for 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence – guided identification, localization, or resection? A prospective study of 114 consecutive intracranial lesions, *Clinical Neurosurg* 56:93-97 (2009)

3

Hipodinaminio streso paveiktų kraujagyslių sienelės fluorescencijos tyrimas

3.1. Įvadas

Sergamumas širdies ir kraujagyslių ligomis yra viena aktualiausių šių dienų problemų. Mokslininkų ir medikų dėmesys nukreiptas į ankstyvą - pradinę aterosklerozės diagnostiką ir galimybes sustabdyti šį procesą. Aterosklerozė – tai lėtinė arterijų sienelės liga, pasireiškianti per struktūrinius (lipidų kaupimasis, lygiųjų raumenų ląstelių proliferacija bei kolageno, elastino skaidulų ir proteoglikanų gamyba intimoje) bei funkcinis (susilpnėjusi vazodilatacija ir antitrombinis aktyvumas) pakitimus [1]. Endotelis – pagrindinis ypač aktyvus kraujagyslės sienelės funkcijos reguliavimo organas. Endotelio ląstelių pažeidimas siejamas su svarbiausiais aterosklerozės rizikos veiksniais, kurių poveikį galima paaiškinti traktuojant aterosklerozę kaip reakciją į pažeidimą [2]. Nežymus poveikis arterijoms sąlygoja tik endotelio funkcinis sutrikimus. Tačiau esant ilgalaikiams poveikiams atsiranda negrįžtami pakitimai, dėl ko padidėja sienelės pralaidumas kraujo plazmos komponentams bei lipidams. Palapsniui dėl specifinių biocheminių pokyčių intimoje atsiranda struktūriniai kraujagyslės sienelės pokyčiai. Dabartiniu metu yra visa eilė metodų, leidžiančių įvertinti

3 skyrius Kraujagyslių sienelės savosios fluorescencijos tyrimas

kraujagyslių struktūrą ir funkciją [3]. Tačiau, siekiant dar ankstyvesnės struktūrinių pakitimų diagnostikos, būtų aktualūs tyrimo metodai, kurie įgalintų atpažinti pradinius biocheminių procesų pakitimus bei pritaikyti tinkamas profilaktines priemones dar neišsivysčius struktūriniams kraujagyslių pakitimams. Šiuo metu nėra plačiau žinomų neinvazinių metodų, kurie leistų stebėti biocheminius procesus kraujagyslėse in vivo.

Remiantis Pasaulinės sveikatos organizacijos duomenimis [4], fizinio aktyvumo sumažėjimas yra tiesiogiai susijęs su sergamumu širdies ir kraujagyslių ligomis [5-6]. Nejudrumas gali sukelti įvairių bioelementų kiekybinius pokyčius, kurie dalyvauja daugelyje metabolinių procesų [7-8]. Nustatyta, kad užsitęsęs nuolatinis stresas sąlygoja bioenergijos stygių bei fermentų aktyvumo sumažėjimą [9]. Ilgalaikis hipodinaminis stresas gali sąlygoti ne tik biocheminius ar fiziologinius pakitimus, bet ir inicijuoti struktūrinius endotelio pakitimus. Tyrimų eigoje nustatyta, kad hipodinaminis stresas sukelia mikroelementų kiekybinius pokyčius, kurie yra svarbūs įvairių fiziologinių patologinių ir biocheminių procesų katalizatoriai, aktyviai dalyvaujantys medžiagų apykaitoje [10]. 48 parų hipodinaminis stresas sukelia mikroelementų (cinko, mangano ir vario) ir cholesterolio kiekio kitimą, dėl to ultrastruktūroje stebime kraujagyslės endotelio ląstelių dezintegraciją, endotelio paviršiaus vingiuotumą, vidinės elastinės membranos fragmentaciją, lipidų kaupimąsi po endotelium [11-12]. Pavyzdžiui, vario sumažėjimas neigiamai veikia jungiamojo audinio būklę – sutrikdo kolageno, ypač elastino biosintezę. Nustatyta, kad hipodinaminis stresas sukelia aortos intimos struktūrinius pakitimus, todėl galėtų būti naudojamas kaip eksperimentinis modelis ankstyvųjų kraujagyslės sienelės pažeidimų diagnostikai. Mūsų duomenimis, šiai dienai spaudoje nėra jokių mokslinių darbų nagrinėjančių fizinio aktyvumo sumažėjimo sąlygotų pakitimų atpažinimą spektrofluorimetrinių metodų pagalba.

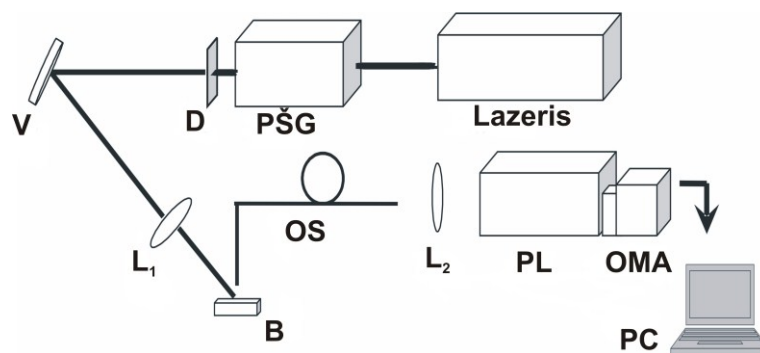
Šiame skyriuje nagrinėjamo darbo tikslas - įvertinti galimybę atpažinti fizinio aktyvumo suvaržymo sąlygotus kraujagyslės sienelės struktūrinius pakitimus širdies aortos bei periferinių arterijų bandiniuose spektrofluorimetriniu būdu, bei nustatyti optimalius žadinimo/emisijos bangos ilgus struktūrinių pažeidimų identifikavimui.

3.2. Medžiagos ir metodai

Ekspirimentiniai tyrimai atlikti bendradarbiaujant su Kauno medicinos universiteto Kardiologijos instituto moksliniais bendradarbiais.

3.2.1. Ekspirimentinė spektrofluorimetrinė sistema

Atrankaus žadinimo savosios fluorescencijos registravimo ekspirimentinė schema pateikta 3.1. pav. Fluorescencijos žadinimui buvo naudojama pikosekundinė lazerinė sistema – sinchronizuotų modų Nd:stiklo lazerio „Twinkle“ (Light Conversion Ltd.) antrąja harmonika (527 nm) kaupinamas optinis parametrinis šviesos generatorius „Topas“ (Light Conversion Ltd.). Fluorescencijos spektrų registravimui naudojamas plokščio lauko polichromatorius (S380 Solar TII, Ltd) bei optinis daugiakanalis analizatorius OMA IV (EG&G Instruments Corp.). Optinio parametrinio šviesos generatoriaus išėjime buvo generuojami tolydžiai derinamo bangos ilgio 1 ps trukmės ir 20 Hz pasikartojimo dažnio impulsai, kurių vidutinė energija siekė nuo 35 – 50 μ J. PŠG išėjime turėdavome dvi bangas – signalinę ir skirtuminę. Signalinės bangos atskyrimui nuo skirtuminės panaudojome filtrą (dalis ekspirimentinių matavimų atlikta naudojant įvairių filtrų rinkinius skirtuminės bangos nuslopinimui bei signalinei bangai išskirti (340 nm – UFS 2; 350-380 nm – SZS11 ir UFS2; 385-420 – SZS21 ir SS4) ir fluorescencijai atskirti nuo išsklaidytos žadinančios spinduliuotės (370-405 nm – ZS11; 410-420 nm – ZS12)). Skirtingo bangos ilgio impulsų energijos matavimai buvo atliekami su „Ophir“ energijos matuokliu.



3.1. pav. Atrankaus žadinimo fluorescencijos spektrų registravimo sistemos schema. Nd: stiklo lazeris, PŠG – optinis parametrinis generatorius, D – filtras, V - veidrodis, L₁ – kvarcinis lęšis, B – bandinys, OS – optinė skaidula, L₂ – objektyvas, PL – plokščio lauko polichromatorius, OMA -IV– optinis daugiakanalis analizatorius, PC - kompiuteris

3 skyrius Kraujagyslių sienelės savosios fluorescencijos tyrimas

Parametriniu šviesos keitikliu žadinančios spinduliuotės bangos ilgis buvo keičiamas 320 – 420 nm spektrinėje srityje (kas 5 nm) atitinkančioje pagrindinių audinio struktūrinių baltymų – elastino ir kolageno – sugerties maksimumą. Žadinančios šviesos pluoštelis (signalinė banga) veidrodžiu M buvo nukreipiamas į kvarcinį lęšį L₁ ir fokusuojamas į bandinio paviršių (~ 1 mm² dėmę). Bandinio fluorescencija buvo surenkama optine skaidula įtvirtinta statmenai bandinio paviršiui (1-2 mm atstumu) ir objektyvu L₂ nukreipiama į polichromatoriaus plyšį taip, kad plyšio plokštumoje buvo gaunamas tikras apverstas fluorescuojančio bandinio vaizdas. Polichromatoriaus išėjimo plokštumoje suformuoti fluorescencijos spektrai buvo registruojami optinio daugiakanalio analizatoriaus OMA-IV pagalba. Jo pagrindas yra CCD kamera, sudaryta iš 256 eilučių, kurių kiekvienoje yra 1024 šviesai jautrių elementų. Šis analizatorius buvo atšaldomas skystu azotu iki –120 °C temperatūros, atšaldymas reikalingas sumažinti CCD kameros savuosius triukšmus bei užtikrinti pakankamą spektrinei analizei santyki signalas/triukšmas.

Registravimo sistemos aparatinės funkcijos įvertinimui buvo išmatuotas baltos šviesos šaltinio (halogeninė-kaitrinė lempa) spektras kalibruotu spektromentru QE65000 (OceanOptics Inc.) ir mūsų naudota registracijos sistema - plokščio lauko polichromatoriaus ir optinio daugiakanalio analizatoriaus (OMA-IV). Išmatuoti eksperimentiniai fluorescencijos spektrai buvo padauginami iš įvertintos sistemos aparatinės funkcijos.

Savosios fluorescencijos spektrų registravimui kraujagyslių bandiniai buvo perpjaunami išilgai kraujagyslės bei padedami ant nefluorescuojančio padėkliuko taip, kad vidinė kraujagyslės pusė (intima) būtų apšviečiama žadinančios spinduliuotės. Stumdant padėkliuką (horizontalioje plokštumoje) buvo registruojami fluorescencijos spektrai iš skirtingų audinio paviršiaus sričių. Kiekvieno bandinio atveju buvo pasirinkta nuo 5 (periferinėms arterijoms) iki 10 (aorta) skirtingų audinio taškų, kuriuose užregistruoti fluorescencijos spektrai. Fluorescencijos spektrų registravimo metu bandiniai papildomai buvo suvilgomi Ringerio tirpalu. Kiekvienas fluorescencijos spektras užregistruotas naudojant 9 s signalo kaupinimo trukmę.

3.2.2. Eksperimentinis ankstyvųjų kraujagyslės sienelės struktūrinių pakitimų modelis

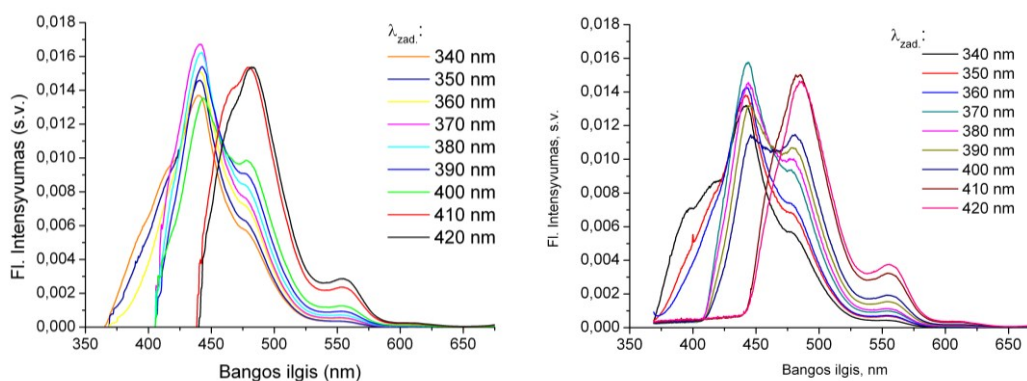
Eksperimentiniai tyrimai atlikti remiantis Lietuvos Respublikos Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos liedimu (Nr.0064) atlikti laboratorinius bandymus su gyvūnais.

Remiantis B.M.Fiodorovo metodu [9], šinšilos veislės triušiams (svoris apie 2,5-3 kg) buvo sukeltas 48 parų trukmės hipodinaminis stresas imobilizuojant gyvūną į ribotų matmenų metalinį narvelį. Tuo tarpu kontroliniai triušiai (svoris apie 2,5-3 kg) buvo laikomi įprastomis vivariumo sąlygomis. Pasibaigus imobilizacijos laikui, eksperimentiniai gyvūnai buvo anestezuojami tiopentaliu (35 mg/kg, intraveniškai). Chirurginiu būdu buvo paimami hipodinaminio streso paveiktų ir kontrolinių triušių krūtinės aortų (4 -5 cm nuo širdies, n= 10) ir centrinės ausies arterijų (n=3) segmentai bei fiksuojami modifikuotame Ringerio tirpale, kad išlaikytų pirminį būvį, drėgmės balansą ir elastingumą. Du kraujagyslių segmentai (~ 2 cm ilgio – centrinei ausies arterijai ir ~ 3 cm – krūtinės aortai) buvo paimami iš vieno gyvūno – vienas spektroskopiniams tyrimams, o kitas ultrastruktūros tyrimams.

3.3. Pagrindiniai rezultatai

Vieni pagrindinių endogeninių fluoroforų, atspindinčių kraujagyslės sienelės pakitimų laipsnį remiantis savąja fluorescencija, yra struktūriniai baltymai – elastinas ir kolagenas bei įvairūs lipopigmentai. Siekiant spektroskopiškai identifikuoti hipodinaminio streso sąlygotus struktūrinius pakitimus arterijos vidinėje sienelėje bei identifikuoti spektrines sritis, atitinkančias didžiausius fluorescencijos spektrų pokyčius, lyginant su sveika kraujagyslės senele, buvo atlikti savosios fluorescencijos spektrų matavimai ex vivo taikant atrankų žadinimą. Struktūrinių baltymų žadinimui buvo naudojama parametrinio šviesos generatoriaus spinduliuotė, derinama 320-420 nm spektriniame intervale.

Tiriant hipodinaminio streso paveiktų ir sveikų aortos mėginių savąją fluorescenciją, nustatyta, kad atskyrų tos pačios grupės (kontrolinės arba streso paveiktos) individų fluorescencijos spektrai turi nedidelių formos skirtumų. Norint išryškinti hipodinaminio streso įtakotus pakitimus kraujagyslės intimoje buvo vertinami jų vidurkiai. Užregistruotus širdies aortos vidinės sienelės savosios fluorescencijos spektrus sunormavus į vienetinį plotą išryškėjo jų formos skirtumai (3.2. pav.). Be to, keičiant žadinimo bangos ilgį, kito ir registruojamo fluorescencijos spektro forma.



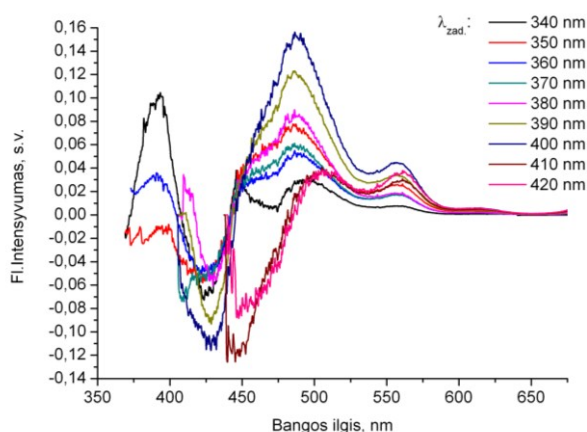
3.2 pav. Kairėje: normuoti sveikos aortos vidinės sienelės fluorescencijos spektrų vidurkiai žadinant skirtingo bangos ilgio impulsais. Dešinėje: normuoti (į vienetinį plotą) hipodinaminio streso paveiktų aortos vidinės sienelės fluorescencijos spektrų vidurkiai žadinant skirtingo bangos ilgio impulsais (spektrai sunormuoti į vienetinį plotą po kreive)

Tiek sveikų, tiek pažeistų aortos vidinės sienelės fluorescencijos spektrams būdinga smailė ties 440 nm, kuri išlieka dominuojančia žadinant 340 - 400 nm bangos ilgio spinduliuote. Keičiant žadinančios spinduliuotės bangos ilgį, fluorescencijos spektruose ima ryškėti dvi smailės: smailė ties 480 nm, kuri tampa

3 skyrius Kraujagyslių sienelės savosios fluorescencijos tyrimas

dominuojančia žadinant ilgesnių bangos ilgių srityje (410 – 420 nm) ir smailė ties 550 nm. Spektriniai skirtumai ties 540 nm yra sąlygoti hemoglobino rearbsorbcijos, kaip ir nežymi įduba ties 420 nm. Hipodinaminio streso paveiktų aortos bandinių savosios fluorescencijos spektre stebimi spektro formos skirtumai trumpabangėje srityje ties 390 nm žadinant 340 nm bangos ilgio impulsais, tuo tarpu sveikos aortos vidinės sienelės spektre šioje srityje matome tik nežymiai praplatėjusį šlaitą.

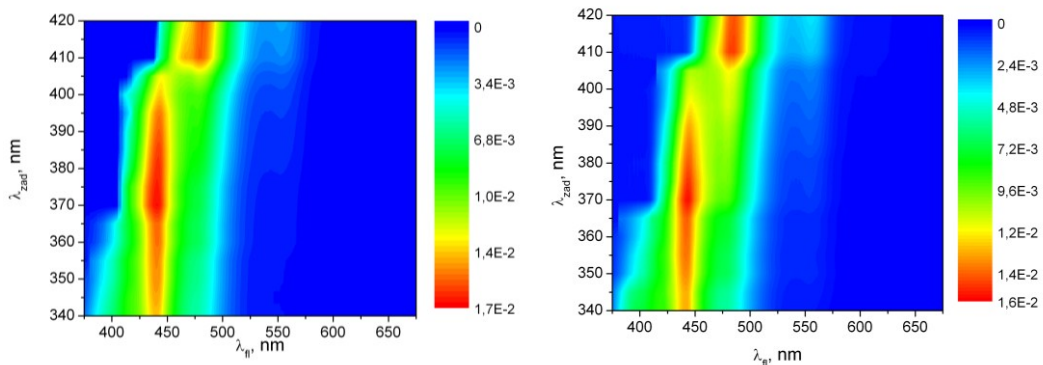
Siekiant identifikuoti pagrindinius fluorescencijos bangos ilgius, žyminčius didžiausius skirtumus tarp sveikos ir hipodinaminio streso paveiktos aortos vidinės sienelės, buvo apskaičiuoti skirtuminiai visų tirtų bandinių spektrai bei atlikta jų lyginamoji analizė. Gauti skirtuminiai hipodinaminio streso paveiktų ir sveikų širdies aortos vidinės sienelės fluorescencijos spektrai pateikti 3.3 pav. Šių spektrų šeimoje galime išskirti penkis charakteringiausias emisijos bangos ilgius atitinkančius aortos fluorescencijos spektrinius pokyčius dėl hipodinaminio streso. Trys pagrindinės spektrinės smailės ties 390 nm (žadinant 340 nm ir 360 nm), 480 nm ir 550 nm yra priskiriamos hipodinaminio streso paveiktiems aortos bandiniams, tuo tarpu sveikoms aortoms charakteringa smailė ties 440 nm ir neišraiškinga smailė ties 410 nm. Įdubos ties 420 nm ir 540 nm yra sąlygotos hemoglobino sugerties. Didžiausi skirtumai hipodinaminio streso pažeistos aortos vidinės sienelės fluorescencijos spektre ties 480 nm gaunami žadinant 390 – 400 nm bangos ilgio spinduliuote. Apskaičiuojant fluorescencijos intensyvumų santykį ties šiais charakteringaisiais emisijos bangos ilgiais galime sudaryti sveikos ir hipodinaminio streso pažeistos sienelės atskyrimo algoritmą, atspindintį sienelės biocheminę sudėtį – tam tikrų savųjų fluoroforų atsako pokytį dėl pažeidos.



3.3 pav. Skirtuminiai aortos vidinių sienelių fluorescencijos spektrų vidurkiai gauti iš hipodinaminio streso paveiktų aortos mėginių atėmus sveikos aortos fluorescencijos spektrą esant skirtingiems žadinimo bangos ilgio impulsams

3 skyrius Kraujagyslių sienelės savosios fluorescencijos tyrimas

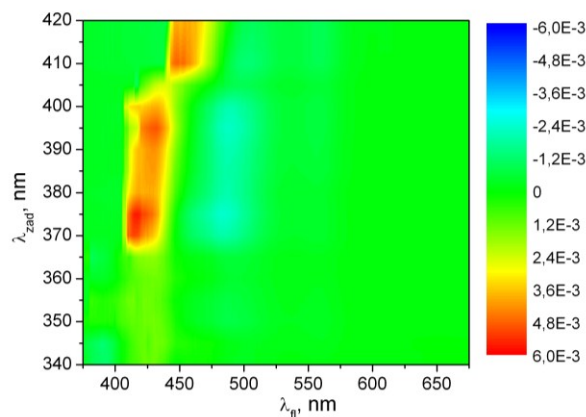
Keičiant žadinimo bangos ilgį keičiasi ne tik fluorescencijos spektro forma, tačiau taip pat kinta ir santykinis fluorescencijos intensyvumas. Tiek sveikų, tiek pažeistų aortos vidinės sienelės fluorescencijos intensyvumas didžiausias žadinant 370 nm bangos ilgiu (3.4 pav.). Didėjant žadinančios spinduliuotės bangos ilgiui fluorescencijos intensyvumas didėja, pasiekia maksimumą ties 370 nm ir vėl krenta.



3.4 pav. Kairėje: sveikos aortos vidinės sienelės fluorescencijos žadinimo-emisijos matrica. Dešinėje: hipodinaminio streso pažeistos aortos vidinės sienelės fluorescencijos žadinimo-emisijos matrica (spektrai sunormuoti į vienetinį plotą)

Nustatyta, kad hipodinaminio streso paveiktų aortos bandinių fluorescencijos intensyvumas tik nežymiai mažesnis lyginant su sveikų aortų sienele. Todėl fluorescencijos spektro formos skirtumai suteikia daugiau naudingos informacijos pažaidos identifikavimui.

Siekiant apibrėžti fluorescencijos intensyvumo bei formos skirtumus tarp hipodinaminio streso paveiktų ir sveikų aortos bandinių buvo apskaičiuota skirtuminė žadinimo-emisijos matrica (3.5 pav.).

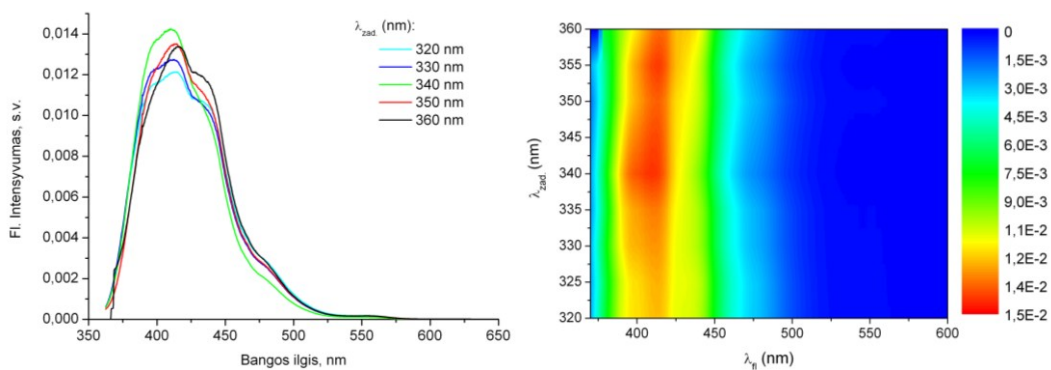


3.5. pav. Skirtuminė žadinimo emisijos matrica (ŽEM). (spektrai normuoti į vienetinį plotą; matrica gauta iš sveikos kraujagyslės ŽEM atėmus hipodinaminio streso paveiktos kraujagyslės ŽEM)

3 skyrius Kraujagyslių sienelės savosios fluorescencijos tyrimas

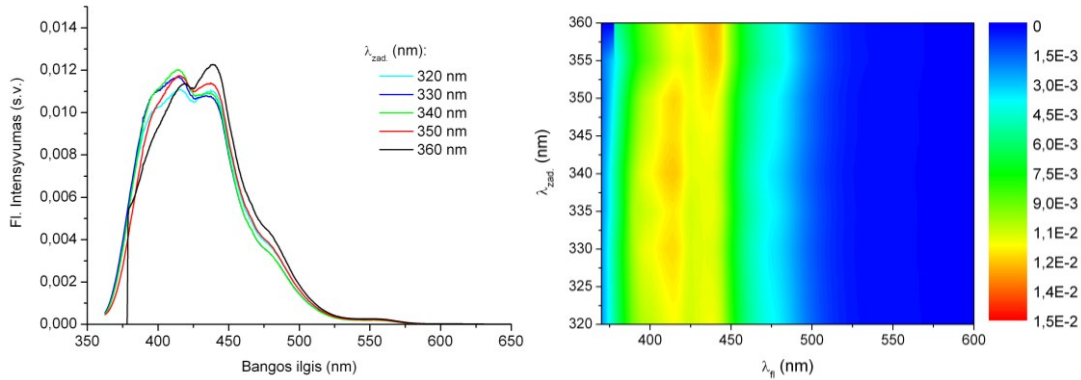
Kaip matyti, skirtuminėje matricoje išryškėja dvi sritys: teigiama santykinio intensyvumo verčių sritis apibrėžianti fluorescencijos spektro formos skirtumus ties 440 nm – šioje spektro srityje fluorescuoja struktūriniai baltymai, tuo tarpu neigiama sritis apibrėžia spektro skirtumus ties 480 nm – dėl lipidų įtakos ir nežymiai ties 390 nm dėl struktūrinių baltymų santykinio kiekio pokyčio. Didžiausi skirtumai matomi žadinant 370 – 410 nm bangos ilgio spinduliuote.

Kadangi egzistuoja funkcinis ryšys tarp vainikinių arterijų ir periferinių arterijų, pastarųjų pažaidų tyrimai gali duoti itin svarbios informacijos vertinant didžiųjų organizmo kraujagyslių būklę. Tiriant periferinių kraujagyslių savąją fluorescenciją, nustatyta, kad sveikų ir hipodinaminio streso paveiktų kraujagyslių spektrai skiriasi. 3.6 ir 3.7 paveikluose pateikti normuotų sveikų ir pažeistų periferinių arterijų vidinės sienelės savosios fluorescencijos spektrų vidurkiai žadinant skirtingo bangos ilgio impulsais. Keičiant žadinančios spinduliuotės bangos ilgį nuo 320 nm iki 360 nm sveikų arterijų spektre dominuoja smailė ties 410 nm, kuri ryškėja didinant žadinančios spinduliuotės bangos ilgį. Nežymūs spektriniai iškreipymai ties 420 nm yra sąlygoti hemoglobino reabsorbcijos, kurio įtaka spektro formai matoma ir pažeistos kraujagyslės fluorescencijos spektruose.



3.6. pav. Kairėje: sveikos centrinės arterijos vidinės sienelės fluorescencijos spektrų vidurkiai žadinant skirtingo bangos ilgio impulsais. Dešinėje: sveikos centrinės arterijos vidinės sienelės fluorescencijos žadinimo-emisijos matrica. (Spektrai sunormuoti į vienetinį plotą)

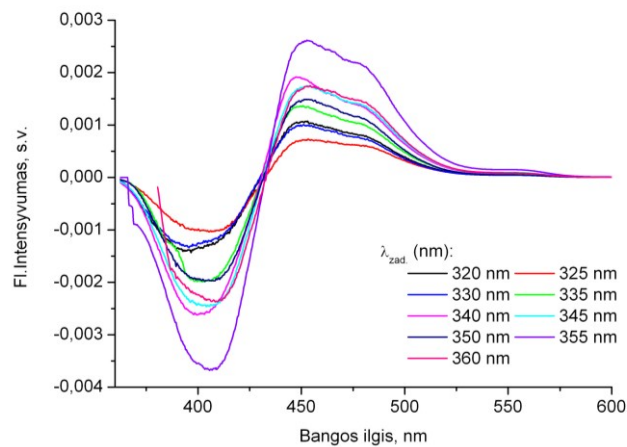
Hipodinaminio streso paveiktų periferinių arterijų vidinės sienelės fluorescencijos forma turi savitą braižą lyginant su sveika arterijos sienele. Keičiant žadinimo bangos ilgį ima ryškėti fluorescencijos smailė ties 440 nm tuo tarpu smailė ties 410 nm nyksta.



3.7. pav. Kairėje: hipodinaminio streso pažeistos centrinės arterijos vidinės sienelės fluorescencijos spektrų vidurkiai žadinant skirtingo bangos ilgio impulsais. Dešinėje: hipodinaminio streso pažeistos centrinės arterijos vidinės sienelės fluorescencijos žadinimo-emisijos matrica (spektrai sunormuoti į vienetinį plotą)

Pažymėtina, kad žadinant 340 nm spinduliuotės bangos ilgiu, kuris atitinka struktūrinių baltymų sugerties maksimumą, fluorescencijos smailės ties 410 nm santykinis intensyvumas sumažėja maždaug 1,3 karto pažaidos atveju.

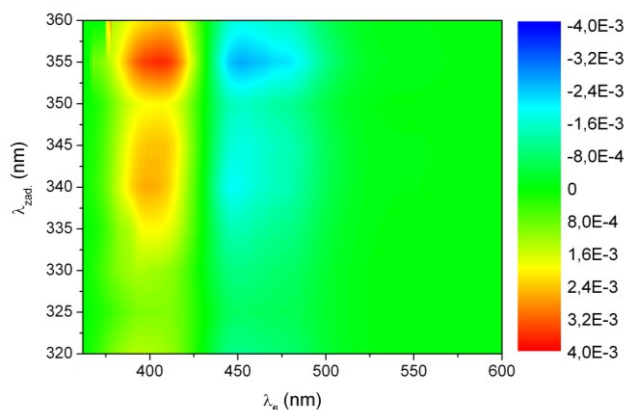
Apskaičiavus skirtuminius fluorescencijos spektrus, iš vidutinio hipodinaminio streso paveiktos periferinės arterijos vidinės sienelės fluorescencijos spektro atėmus vidutinį sveikos arterijos sienelės fluorescencijos spektrą, buvo gauta periferinėms arterijoms būdingų spektrų šeima. Kaip matyti iš 3.8 paveikslėlio, hipodinaminio streso paveiktoms periferinių arterijų sienelėms charakteringa plati fluorescencijos juosta ilgesnių bangos ilgių srityje – 450–500 nm. Tuo tarpu sveikai sieniei būdinga fluorescencijos smailė trumpesnių bangos ilgių srityje – ties 410 nm.



3.8. pav. Skirtuminiai hipodinaminio streso paveiktų ir sveikų centrinės ausies arterijos vidinių sienelių fluorescencijos spektrai žadinant skirtingo bangos ilgio impulsais

3 skyrius Kraujagyslių sienelės savosios fluorescencijos tyrimas

Apskaičiavus skirtuminę žadinimo-emisijos matricą, nustatyta, kad didžiausi skirtumai stebimi žadinant 340 ir 360 nm spinduliuotės bangos ilgiu.



3.9. pav. Skirtuminė žadinimo emisijos matrica. Spektrai normuoti į vienetinį plotą; matrica gauta iš sveikos kraujagyslės ŽEM atėmus hipodinaminio streso paveiktos kraujagyslės ŽEM

Pažymėtina, kad lyginant aortos ir periferinių kraujagyslių savosios fluorescencijos spektrus, matome ženklus formos skirtumus. Periferinių kraujagyslių spektre dominuoja smailė ties 410 nm, bei keičiant žadinimo bangos ilgį ima dominuoti smailė ties 440 nm, tuo tarpu aortos atveju – dominuoja smailė ties 440 nm (žadinant 340-360 nm spinduliuote) bei spektro formos pokytis ilgabangėje spektro srityje, ties 480 nm. Spektro formos pokyčiai ties 390 nm stebėti tik aortos kraujagyslių savosios fluorescencijos spektre žadinant 340 – 360 nm spinduliuotės bangos ilgiais. Šie spektriniai savitumai greičiausiai yra susiję su skirtinga šių tirtų kraujagyslių struktūra, bei skirtingu endogeninių fluoroforų pasiskirstymu bei jų kitimu pažaidos atveju.

Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad hipodinaminis stresas sąlygoja struktūrinius pakitimus kraujagyslių sienelėse, dėl ko pakinta tam tikrų endogeninių fluoroforų santykinis kiekis, o tuo pačiu stebime spektrinius skirtumus vidinės sienelės savojoje fluorescencijoje. Tiek aortos, tiek ir periferinių arterijų atveju, skirtuminių spektrų analizės būdu galime nustatyti pagrindinius charakteringiausias fluorescencijos bangos ilgius, kurie yra informatyvūs vertinant sienelės biocheminę sudėtį ar jos pirminius pakitimus dėl hipodinaminio streso. Tuo tarpu skirtuminis fluorescencijos intensyvumų žemėlapis leidžia išsyk identifikuoti tuos žadinimo bangos ilgius, kurie atspindi didžiausius santykinio fluorescencijos intensyvumo pokyčius.

3.4. Aptarimas

Ankstyviausia aterosklerozės stadija – kraujagyslės vidinio sluoksnio, t.y. kraujagyslių endotelio, funkcijos sutrikimas, susijęs su subtiliais biocheminiais pokyčiais kraujagyslės sienelėje, palaipsniui peraugančiais į struktūrinius kraujagyslės sienelės pokyčius. Norint sustabdyti progresavimą ir neleisti atsirasti ūminei ligai, pagrindinis dėmesys turi būti skiriamas ankstyvai diagnostikai ir gydymui. Remiantis spaudoje skelbtais darbais, kraujagyslių savosios fluorescencijos spektre dominuoja du pagrindiniai endogeniniai komponentai [13-15]. Tai pagrindiniai audinio struktūriniai baltymai – elastinas ir kolagenas. Kraujagyslėse elastinas pagrinde randamas vidinėje elastinėje membranoje skiriančioje endotelį ir giliau esantį lygiųjų raumenų sluoksnį. Tuo tarpu kolagenas yra pagrindinis ekstraląstelinio matrikso komponentas. Fluorescencinė medžiaga elastine yra trikarboksilo triamino piridino dariniai, kurie spektrinėmis savybėmis labai panašūs į kolageną [16].

Spaudoje paskelbta nemažai darbų, kuriuose pateikiami aterosklerotinių pažaidų specifinių skirtumų duomenys taikant fluorescencinius metodus [13,17-21]. Tyrimų metu nustatyta, kad spektro formos bei intensyvumo pokyčiai įgalina atpažinti įvairaus laipsnio struktūrines pažaidas kraujagyslės sienelėje [22-27]. Įvairūs matematiniai algoritmai, remiantis spektro smailių santykio skaičiavimu, ar registruojamo spektro modeliavimo, pagal žinomus endogeninių fluoroforų fluorescencijos spektrines charakteristikas, būdai buvo panaudoti siekiant padidinti pažeistų kraujagyslės sienelių atskyrimo efektyvumą [13,15,28-30]. Tačiau reikia pažymėti, kad dauguma tyrimų atlikta esant pažengusiai aterosklerozės stadijai, todėl tik dalinai išsprendžia ankstyvos diagnozės problemą.

Kraujagyslės sienelės fluorescencijos spektrą įtakoja keletas endogeninių fluoroforų su savitomis fluorescencijos charakteristikomis. Struktūriniai baltymai – elastinas ir kolagenas yra priskiriami prie pagrindinių fluorescuojančių komponentų. Tyrimų metu nustatyta, kad intimos ir medijos sluoksniuose esančių elastinių skaidulų fluorescencija dominuoja sveikose širdies arterijos ir aortos bandiniuose, tuo tarpu kolageno fluorescencija ženkliai padidėja pažeistose fibrozinėse aterosklerotinėse plokštelėse [13,15]. Be to, besiformuojant fibrozinei

3 skyrius Kraujagyslių sienelės savosios fluorescencijos tyrimas

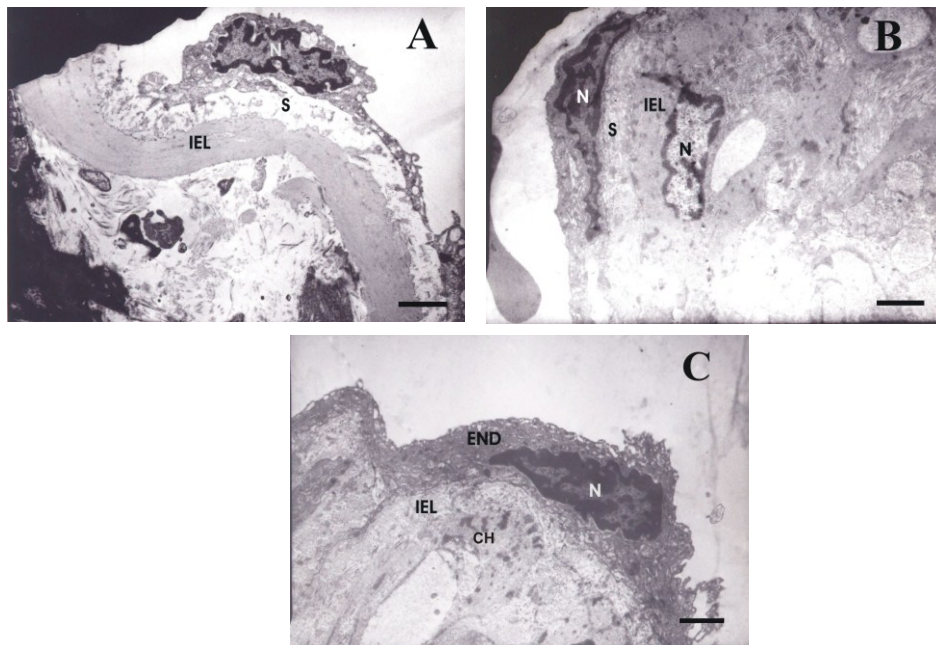
plokštei arterijos intimos sluoksnyje gali kauptis įvairūs lipidai (pvz., laisvasis ar esterinis cholesterolis), lipopigmentai (karotenoidai ir ceroidai), pakeičiantys sienelės intimos morfologines savybes, o tuo pačiu pakeičia pačios kraujagyslės sienelės fluorescencijos spektrines savybes [31-34]. Kuo labiau pažengusi aterosklerozė, tuo šių pigmentų įtaka yra didesnė ir atsispindi fluorescencijos spektro ilgabangėje srityje (> 460 nm).

Mūsų tyrimų rezultatai parodė, kad 48 parų hipodinaminis stresas sąlygoja įvairius struktūrinius pakitimus kraujagyslių sienelėje. Nustatyta, kad santykinis fluorescencijos intensyvumas trumpabangėje srityje yra didesnis sveikoje kraujagyslėje nei hipodinaminio streso pažeistoje. Stebimi spektriniai skirtumai matomai yra sąlygoti kolageno sintezės ir degradacijos balanso sutrikdymo. Autorių duomenimis, sveikos kraujagyslės fluorescencijos spektre dominuoja elastinas (fluorescencijos smailė ties 410 nm) [13,15], kuris lokalizuojasi daugiausiai intimoje ir medijoje [35] su labai nežymiu kolageno indėliu ties 390 nm. Tuo tarpu pažaidos atveju išryškėja kolageno fluorescencija. Žinoma, kad kolageno tipas I ir III yra pagrindiniai fibrilinių baltymų tipai kraujagyslių sienelėje svarbūs kraujagyslių fiziologijai [36]. Kolagenas III daugiausiai lokalizuojasi intimos dalyje. Kolageno tipų I ir III santykinio kiekio pokytis dėl sintezės ir degradacinių mechanizmų sutrikimo atspindi aterosklerozės pažaidos laipsnį [37]. Kadangi už kolageno fluorescenciją atsakingi skersiniai ryšiai (hidroksipiridinolinas), todėl manoma, kad kolageno molekulės erdvinė struktūra turi įtakos skersinių ryšių susidarymui fibrilėse [38]. Šių skersinių ryšių formavimasis turi įtakos aterosklerozės atsiradimui, o tuo pačiu pakinta ir audinio elastingumas bei, atitinkamai, pasikeičia registruojamas fluorescencijos spektras. Be to, pažaidos atveju savosios fluorescencijos spektre ryškėja lipidų įtaka – ilgabangė spektro dalis, o tai taip pat gali reikšti trumpabangės spektro dalies santykinį intensyvumo sumažėjimą. Siekiant įvertinti spektrines sritis, kuriose stebimi didžiausi skirtumai tarp sveikų ir hipodinaminio streso paveiktų kraujagyslės sienelių, buvo apskaičiuotos skirtuminės žadinimo emisijos matricos. Nustatyta, kad teigiama sritis atitinka elastino ir kolageno santykinio kiekio pokyčio sąlygotus skirtumus, tuo tarpu neigiama – lipidų.

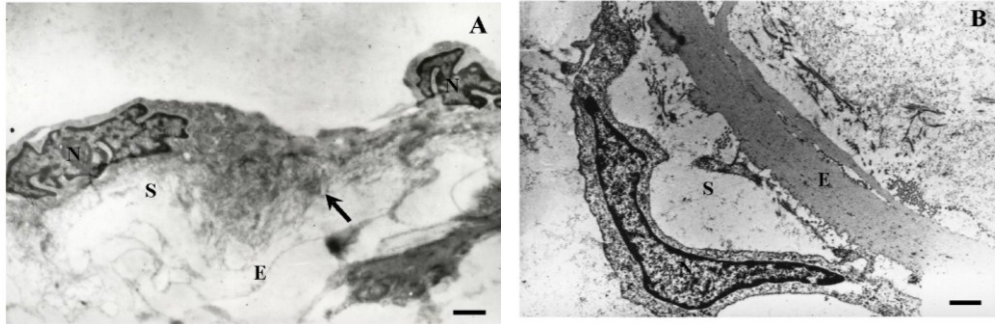
3 skyrius Kraujagyslių sienelės savosios fluorescencijos tyrimas

Atlikti ultrastruktūros tyrimai parodė, kad pažeistų kraujagyslių vidinė elastinė membrana ir subendotelinis sluoksnis yra fragmentuoti, vietomis susiaurėję, kai kur matosi cholesterolio kaupimasis (3.10, 3.11 pav.). Streso poveikyje taip pat matoma endotelio branduolių invaginacija, piknozė rodo šių ląstelių pažeidimą susijusį su bioenergetikos stygiumi (sutrikdomi ląstelės oksidaciniai - redukciniai procesai), o tai gali atsiliiepti ląstelės ultrastruktūros, integralumo palaikymui.

Sveikos kraujagyslės ultrastruktūros vaizde, matome aiškia vidinę elastinę membraną bei poendotelinį sluoksnį. Kadangi elastinas yra vienas pagrindinių vidinės elastinės membranos komponentų, tikėtina, kad stebimi fluorescencijos spektro skirtumai yra sąlygoti kolageno santykinio kiekio pokyčio dėl 48 parų hipodinaminio streso, kuris atitinkamai modifikuoja trumpabangės spektro srities smaile, ją praplėsdamas.



3.10. pav. Periferinių kraujagyslių intimos ultrastruktūra. (A) - sveika kraujagyslės sienelė; (B,C) – hipodinaminio streso pažeista kraujagyslės sienelė (N - branduolys, END – endotelis, IEL – vidinė elastinė membrana, CH – cholesterolio dalelės, S-subendotelinis sluoksnis). Skalės dydis -1 μ m



3.11. pav. Širdies aortos intimos ultrastruktūra. (A) – hipodinaminio streso pažeista kraujagyslės sienelė; (B) sveika kraujagyslės sienelė (N – branduolys, S – poendotelinis sluoksnis, E – vidinė elastinė membrana, rodyklės žymi cholesterolio kaupimąsi). Skalės dydis -1 μ m

Eksperimentinių tyrimų metu nustatyta, kad pažeistai aortos ir periferinės arterijos vidinei sienelei charakteringas platesnis spektro šlaitas į ilgabangę pusę (450-600 nm). To priežastimi galėtų būti lipidų kaupimasis pažeistoje sieneleje (3.10 pav. C). Kiti autoriai taip pat nurodo, kad kai kurie lipidai gali kauptis sieneleje vystantis aterosklerozei bei sąlygoti spektro poslinkį į ilgesnių bangų pusę [31-32,39-40]. Krūtinės aortos ultrastruktūroje matome cholesterolio inkorporaciją, ką iliustruoja ir skirtuminių spektrų formos pokyčiai ilgabangėje spektro srityje. Periferinių arterijų atveju, ilgabangės spektro srities šlaitas yra siauresnis nei aortos atveju, ir tai galimai yra susiję su tirtų arterijų morfologiniais skirtumais bei savųjų endogeninių komponentų pasiskirstymu sieneleje. Žinoma, kad sveikoje vainikinėje arterijoje santykinis elastino ir kolageno kiekis vidinėje elastinėje membranoje yra daug didesnis nei kitų mažesnių arterijų bei būdingas savitas šių fibrilinių baltymų pasiskirstymas sieneles sluoksniuose [41]. Tokiu būdu, keičiant žadinimo bangos ilgį, kinta ir storis, iš kurio surenkamas fluorescencijos signalas, bei, atitinkamai, fiksuojame didesnę ar mažesnę struktūrinių baltymų santykinio kiekio pokytį. Žadinant 337 nm bangos ilgio spinduliuote, paprastai pasiekiamas 150-200 μ m spinduliuotės prasiskverbimo gylis, kuris didėja didinant žadinimo bangos ilgį. Vadinasi, surenkama informacija ne tik iš intimos, bet ir iš vidinio – medijos, sluoksnio. Priklausomai nuo žalingo poveikio intensyvumo bei arterijos sienelės sandaros yra sutrikdomi natūralūs fibrilinių baltymų formavimo mechanizmai, pakinta skersinių ryšių skaičius, vidinė sienele tampa taikiniu įvairiems lipidams. Todėl arterijos sienelės charakterizavimui svarbus veiksnys yra žadinimo bangos ilgio parinkimas.

3 skyrius Kraujagyslių sienelės savosios fluorescencijos tyrimas

Žinoma, kad periferinės arterijos yra atsparios aterosklerozei, tačiau įvairių poveikio veiksnių sąlygoti vidinės sienelės pakitimai koreliuoja su didžiųjų organizmo arterijų sienelės būkle. Todėl jos yra puikus tyrimo objektas siekiant įvertinti atsparios kraujagyslės vieno ar kito išorinio poveikio, priskiriamo aterosklerozės rizikos faktoriui, daromą įtaką sienelės biocheminės sudėties sutrikdymui, o tuo pačiu prognozuoti didžiųjų organizmo kraujagyslių būklę. Šią dieną atliekami tyrimai, kaip padidėjęs kraujospūdis, persivalgymas ar fizinio aktyvumo stoka veikia būtent mažųjų arterijų sienelės būklę ir kaip tai atsiliepia širdies, inkstų ar tinklainės kraujagyslių būklei [42-43].

Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, kad hipodinaminis stresas įtakoja struktūrinius pakitimus tiek aortos, tiek ir periferinių arterijų vidinės sienelės sandaroje ir galėtų būti laikomas ankstyvųjų kraujagyslės sienelės pažeidimų formavimosi modeliu. Parodėme, kad fluorescencinės spektroskopijos dėka galime identifikuoti pagrindinius spektrinius skirtumus, leidžiančius atskirti hipodinaminio streso paveiktą aortą nuo sveikos aortos bei pažeistą periferinę arteriją nuo sveikos periferinės arterijos. Vidinės sienelės ultrastruktūriniai pažeidimai glaudžiai siejasi su endotelio disfunkcija, ypač su jo sutrikusiu relaksuojančiu poveikiu lygiųjų raumenų kontraktiškumui. Literatūros duomenimis ši savybė ir išryškėja ankstyvųjų aterosklerozės stadijų atveju [44].

3.5 Literatūra

1. E.Stalioraitytė, D.Pangonytė, Aterogenezė: kraujagyslių sienos vaidmuo, *Medicina* 30:541-546 (1994)
2. D.G.Harrison, Endothelial function and oxidative stress, *Clin Cardiol* 20(2):11-17 (1997)
3. A.Laucevičius, Ž.Petrulionienė, Strategies of diagnostics and treatment of vascular endothelial dysfunction and early stages of atherosclerosis, *Lithuanian J.Card.* 6(1) 257-263 (1999)
4. F.C.Bijnen, C.J.Caspersen, W.L.Mosterd, Physical inactivity as a risk for coronary heart disease: a WHO and International Society and Federation of Cardiology position statement, *Bull World Health Organ.* 72(1), 1-4 (1994)
5. V.Simko, Physical exercise and the prevention of atherosclerosis and cholesterol gall stones, *Posrtgrad Med J* 54, 270-277 (1978)
6. M.Matsuda, Effects of exercise and physical activity on prevention of atherosclerosis-special reference to arterial distensibility, *Intern J Sport and Health Scien* 4, 316-324 (2006)
7. M.Kušleikaitė, S.Stonkus, N.Paužienė, K.Daukša, S.Kušleika, R.Gailys, Changes of structure, function and concentration of bioelements in the heart depending on the intensity of hypodynamic stress, *Acta Medica Lithuanica.* 6(3), 200-204 (1999)
8. M.Chvapil, New aspects in the biological role of zinc: a stabilizer of macromolecules and biological membranes, *Life Sci.* 13(8), 1041-1049 (1973)
9. B.M.Fiodorov, Stress and system of the blood circulation, (*Medicina*, Moscow, 1991)
10. G.Civinskienė, M.Kušleikaitė, S.Stonkus, R.Lekas, Ž.Senikienė, Mikroelementų, cholesterolio ir aortos intimos struktūriniai pakitimai esant hipodinamijai, *Medicina* 39(2):92-95 (2003)
11. M.Kušleikaitė, G.Civinskienė, S.Stonkus, K.Daukša, R.Gailys, R.Abraitis, Biocheminiai, fiziologiniai, struktūriniai pokyčiai organizme esant hipodinamijai, *Medicina* 33:701-707 (1997)
12. M.Kušleikaitė, S.Stonkus, S.Kušleika, Contractility of smooth muscles and ultrastructure of their microfilaments in restriction of physical activity, *Med Sci Monit* 7(1):34-37 (2001)
13. L.I.Laifer, K.M.O'Brien, M.L.Stetz, G.R.Gindi, T.J.Garrand and L.I.Deckelbaum, Biochemical basis for the difference between normal and atherosclerotic arterial fluorescence, *Circulation.* 80, 1893-1901 (1989)
14. T.G.Papazoglou, Malignancies and atherosclerotic plaque diagnosis – is laser induced fluorescence spectroscopy the ultimate solution?, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 28, 3-11 (1995)
15. J.J.Baraga, R.P.Rava, P.Taroni, C.Kittrell, M.Fitzmaurice, M.S.Feld, Laser induced fluorescence spectroscopy of normal and atherosclerotic human aorta using 306-310 nm excitation, *Lasers Surg Med* 10:245-261 (1990)
16. D.Fujimoto, The Structure of Pyridinoline, a Collagen Crosslink, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 76(4), 1124–1129 (1977)
17. C.Kittrel, R.L.Willett, C.deI.Santos-Pacheo, N.B.Ratliff, J.R.Kramer, E.G.Malk, M.S.Feld, Diagnostic of fibrous arterial atherosclerosis using fluorescence, *Appl Opt* 24:2280-2281 (1985)
18. S.Andersson-Engels, J.Johansson, U.Sternram, K.Svanberg, S.Svanberg, Malignant tumor and atherosclerotic plaque diagnosis using laser-induced fluorescence, *IEEE J Quan Electron* 26, 2207-2217 (1990)
19. G.O.Anghelou, J.T.Arendt, M.G.Muller, A.S.Haka, I.Georgakoudi, J.T.Motz, O.R.Scepanovic, B.D.Kuban, J.Myles, F.Miller, E.A.Podrez, M.Fitzmaurice, J.R.Kramer, M.S.Feld, Intrinsic fluorescence and diffuse reflectance spectroscopy identify superficial foam cells in coronary plaques prone to erosion, *Arterioscler Thromb Vascul Biol* 26, 1594-1600 (2006)

20. C.C.Hoyt, R.R.Richards-Kortum, B.Costello, B.A.Sacks, C.Kittrell, N.B.Ratliff, J.R.Kramer, M.S.Feld, Remote biomedical spectroscopic imaging of human artery wall, *Laser Surg Med* 8, 1-9 (1988)
21. G.Filippidis, G.Zacharakis, A.Katsamouris, A.Giannoukas, T.G.Papazoglou, Single and double wavelength excitation of laser-induced fluorescence of normal and atherosclerotic peripheral vascular tissue, *J Photochem Photobiol B: Biol* 56, 163-171 (2000)
22. L.I.Deckelbaum, J.K.Lam, H.S.Cabin, K.S.Clubb, M.B.Long, Discrimination of normal and atherosclerotic aorta by laser-induced fluorescence, *Lasers Sur Med* 7:330-335 (1987)
23. S.Andersson-Engels, J.Johansson, S.Svanberg, The use of time resolved fluorescence for diagnosis of atherosclerotic plaque and malignant tumours, *Spectrochim Acta A* 46:1203-1210 (1990)
24. M.B.Leon, D.Y.Lu, L.G.Prevosti, L.G.Macy, P.D.Smith, M.Granovsky, R.F.Bonner, R.S.Balaban, Human arterial surface fluorescence: atherosclerotic plaque identification and effects of laser atheroma ablation, *J Am Coll Cardiol* 12:94-102 (1988)
25. M.Klijzer, R.R.Richards-Kortum, S.L.Jacques, M.S.Feld, Fluorescence spectroscopy of turbid media: autofluorescence of the human aorta, *Appl Opt* 28(20), 4286-4292 (1999)
26. M.Sartori, D.Weilbaeher, G.L.Valderrama, S.Kubodema, R.C.Chin, M.J.Berry, F.K.Tittel, R.Sauerbrey, P.D.Henry, Laser-induced autofluorescence of human arteries, *Circ Res* 63, 1053-1059 (1988)
27. P.S.Andersson, A.Gustafson, U.Stenram, K.Svanberg, S.Svanberg, Diagnosis of arterial atherosclerosis using laser-induced fluorescence, *Lasers Med Sci* 2, 261-266 (1987)
28. K.M. O'Brien, A.F.Gmitro, G.R.Gindi, M.L.Stetz, F.W.Cutruzzola, L.I.Laifer, L.I.Deckelbaum, Development and evaluation of spectral classification algorithms for fluorescence guided laser angioplasty, *IEEE Trans Biomed Eng* 36, 424-430 (1989)
29. R.R.Richards-Kortum, P.Rava, R.Cithren, A.Metha, M.Fitzmaurice, N.B.Ratliff, J.R.Kramer, C.Kittrell, M.S.Feld, A model for excitation of diagnostic information from laser induced fluorescence spectra of human artery wall, *Spectrochim Acta* 45A, 87-93 (1989)
30. S.Warren, K.Pope, Y.Yazdi, A.J.Welch, S.Thomsen, S.Thomsen, A.L.Johnston, M.J.Davis, R.R.Richards-Kortum, Combined ultrasound and fluorescence spectroscopy for physico-chemical imaging of atherosclerosis, *IEEE Transact Biomed Eng* 42, 121-132 (1995)
31. R.J.Verbunt, M.A.Fitzmaurice, J.R.Kramer, N.B.Ratliff, C.Kittrell, P.Taroni, R.M.Cothren, J.Baraga, M.Feld, Characterization of ultraviolet laser-induced autofluorescence of ceroid deposits and other structures in atherosclerotic plaques as a potential diagnostic for laser angioplasty, *Am. Heart J.* 123(1), 208-16 (1992)
32. L.Marcu, J.M.Maarek, W.S.Grundfest, Time-resolved laser induced fluorescence of lipids involved in development of atherosclerotic lesion lipid-rich core, *SPIE* 3250, 158-167 (1998)
33. L.Marcu, J.M.Maarek, M.Fishbein, W.Grundfest, Atherosclerotic lesions classification by time-resolved laser-induced fluorescence spectroscopy: clinical identification of lipid-rich lesions, *J Am Coll Cardiol* 33 (suppl A), 66A (1999)
34. Y.Uchida, Y.Uchida, N.Kameda, Visualization of lipid components in human coronary plaques using color fluorescence angioplasty, *Circ J* 74, 2181-2186 (2010)
35. H.C.Stary, D.H.Blankenhorn, A.B.Chandler, S.Glagov, N.Insull, M.Richardson, M.E.Rosenfeld, S.A.Schaffer, C.J.Schwartz, W.D.Wagner, A definition of the intima of human arteries and of its atherosclerosis-prone regions. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis, American Heart Association, *Circulation* 85:391-405 (1992)
36. K.Murata, T.Motayama, C.Kotaka, Collagen types in various layers of human aorta and their changes with the atherosclerotic process, *Atherosclerosis* 60, 251-262 (1986)
37. S.G.Velleman, R.J.McCormick, D.Ely, B.B.Jarrold, R.A.Patterson, Ch.B.Scott, H.Daneshvar, W.L.Bacon, Collagen characteristics and organization during the

3 skyrius Kraujagyslių sienelės savosios fluorescencijos tyrimas

- progression of cholesterol-induced atherosclerosis in Japanese quail, *Exp Biol Med* 226(4), 328-333 (2001)
38. J.M.Reiser, R.J.McCormick, R.B.Rucker, The enzymatic and nonenzymatic crosslinking of collagen and elastin, *FASEB* 6, 2439-2449 (1992)
 39. K.Arakawa, K.Isoda, T.Ito, K.Nakajima, T.Shibuya, F.Ohsuzu, Fluorescence analysis of biochemical constituents identifies atherosclerotic plaque with a thin fibrous cap, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:1002-1007 (2002)
 40. A.A.Oraevsky, S.L.Jacques, G.H.Pettit, R.A.Sauerbrey, F.K.Tittel, J.H.Nguy, P.D.Henry, XeCl laser- induced fluorescence of atherosclerotic arteries. Spectral similarities between lipid-rich lesions and peroxidized lipoproteins, *Circ. Res.* 72, 84-90 (1993)
 41. A.L.Bartorelli, M.B.Leon, Y.Almagor, L.Prevesti, J.A.Swain, C.L.McIntosh, R.F.Neville, M.D.House, R.F.Bonner, In vivo human atherosclerotic plaque recognition by laser-excited fluorescence spectroscopy, *J Am Coll Cardiol* 17:160B-168B (1991)
 42. C.De Ciuceis, E.Porteri, D.Rizzoni, N.Rizzardi, S.Paiardi, G.E.M.Boari, M.Miclini, F.Zani, M.L.Muiesan, F.Donato, M.Salvetti, M.Castellano, G.A.M.Tiberio, S.M.Giulini, E.A.Rosei, Structural alterations of subcutaneous small-resistance arteries may predict major cardiovascular events in patients with hypertension, *Am J Hypertens* 20, 846-852 (2007)
 43. A.E.Hardman, Exercise in the prevention of atherosclerotic, metabolic and hypertensive diseases: a review, *J Sport Scien* 14, 201-218 (1996)
 44. R.F.Furchgott, J.V.Zawadzki, The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine, *Nature* 288:373-376 (1980)

Išvados

Darbo tikslas - ištirti skirtingų biologinių audinių biocheminių/metabolinių procesų sąlygojamas fluorescencijos spektrines savybes, siekiant įvertinti fluorescencinių metodų panaudojimo piktybinių galvos smegenų navikų ir kraujagyslių sienelės struktūrinių pažeidimų diagnostikoje galimybes, sėkmingai įgyvendintas.

Pagrindiniai darbo rezultatai ir išvados

1. Savosios fluorescencijos tyrimai parodė, kad piktybinių galvos smegenų glijos navikų (žiurkių gliomos 101.8 linija ir žmogaus gliomos C6 linija) savosios fluorescencijos spektrams charakteringa endogeninių porfirino tipo pigmentų fluorescencija: navikų fluorescencijos spektruose dominuoja endogeninis protoporfirinas IX, tuo tarpu gyvūnų su naviku sveikų smegenų audinių spektre – vandenyje tirpūs endogeniniai porfirinai. Kadangi sveikose smegenyse endogeninis protoporfirinas IX nesikaupia, navikinių darinių lokalizavimui ir smegenų audinių diferenciacijai yra tikslinga vertinti integrinio intensyvumo santykį $I_{620 - 660}(\text{sv. aud.})/I_{620 - 660}(\text{nav.})$ apibrėžiantį endogeninio protoporfirino IX santykinio kiekio pokytį glijos naviko atveju.

2. Fluorescencijos spektrų analizė parodė, kad 5-ALA indukuotas protoporfirinas IX selektyviai kaupiasi eksperimentinėse gliomose (101.8). Nustatyta, kad stebimas optinis kontrastas tarp sveikų smegenų audinio ir naviko, gautas apskaičiavus integrinių intensyvumų vertes 620 – 660 nm spektrinėje srityje, atitinkančioje PpIX intensyviausios smailės padėtį, siekia nuo 1:1,4 iki 1:8,7, o tai įgalina panaudoti spektrofluorimetrinį metodą glijos navikų atpažinimui in vivo.
3. Atlikti integrinių fluorescencijos intensyvumų skaičiavimai parodė, kad intraoperaciniu spektrofluorimetriniu būdu žiurkių galvos smegenų piktybinės gliomos gali būti identifikuojamos 83 % jautrumu, 84 % specifiškumu ir 87 % tikslumu. Taškinė fluorescencijos spektrų registravimo sistema yra tinkama papildoma priemonė baltos šviesos chirurginiam mikroskopui, kontroliuoti naviko šalinimą operacijos metu. Pasiūlyta mobili šviesolaidinio zondo sistema klinikiniam taikymams neurochirurgijoje galvos smegenų audinių spektrinių savitumų analizei bei naviko šalinimo apimties kontrolei.
4. Galvos smegenų C6 gliomos fluorescencijos vaizdinimo eksperimentinių tyrimų metu nustatyta, kad fluorescencijos vaizdų analizė, sudarant tam tikros smegenų srities fluorescencijos intensyvumo skirstinių žemėlapius, įgalina tiksliau identifikuoti abejotino audinio sritį remiantis santykinai didesne fluorescencijos intensyvumo verte bei galėtų būti tinkamu rodikliu audinių biopsijoms paimti. Taigi nors fluorescencijos vaizdas įgalina išsąjvertinti fluorescencijos intensyvumo pokytį dideliame apžvalgos plote, tačiau spektroskopiniu požiūriu suteikia mažiau naudingos informacijos ir diagnozės patikimumui būtina atlikti morfologinius tyrimus.
5. Tiriant hipodinaminio streso paveiktų širdies aortos ir periferinių kraujagyslių sienelių savąją fluorescenciją taikant atrankų žadinimą nustatyta, kad fizinio aktyvumo stoka indukuoja aortos bei periferinių kraujagyslių struktūrinės pažaidas, dėl ko stebimi fluorescencijos spektrų formos pokyčiai lyginant su sveika kraujagyslės sienele. Lyginamoji skirtuminių fluorescencijos spektrų analizė įgalina identifikuoti žadinimo ir

emisijos bangos ilgus atspindinčius vidinės sienelės biocheminės sudėties pokyčius dėl pažaidos. Manome, kad spektrinius pokyčius mėlynoje spektro srityje sąlygoja elastino ir kolageno santykinio kiekio pokytis, tuo tarpu santykinį fluorescencijos intensyvumo padidėjimą bei spektro praplatėjimą į ilgabangę pusę sąlygoja lipidai.

6. Remiantis eksperimentinio tyrimo rezultatais, galime teigti, kad hipodinaminio streso sukelti struktūriniai pokyčiai kraujagyslių vidinėje sienelėje (intimoje) gali būti atpažinti remiantis savosios fluorescencijos spektrų analize. Kadangi egzistuoja koreliacija tarp aortos vidinės sienelės būklės ir mažesnių arterijų, todėl hipodinaminio streso sukeltų ankstyvų pažaidų atpažinimui galima būtų naudoti periferinių kraujagyslių modelį.