



LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
FIZIKAS UN MATEMĀTIKAS FAKULTĀTE

**Aleksejs Ļihačovs**

**Lāzeru ierosinātas *in-vivo* ādas autofluorescences un remisijas  
kinētika**

Promocijas darba kopsavilkums

Rīga, 2010

**Promocijas darbs izstrādāts**

Latvijas Universitātes Atomfizikas un spektroskopijas institūtā laika posmā no 2005. gada līdz 2010. gadam.

**Darba raksturs:** Zinātnisko rakstu kopa

**Darba zinātniskais vadītājs:** Prof., Dr. habil. phys. Jānis Spīgulis

**Darba recenzenti:**

**Darba aizstāvēšana:**

## Anotācija

Promocijas darbā pētītas *in-vivo* ādas autofluorescences un remisijas intensitātes atkarības no laika pie nepārtrauktas zemas jaudas lāzeru ierosmes. Izveidotas un aprobētas trīs jaunas metodikas *in-vivo* ādas bezkontakta diagnostikai - autofluorescences fotoizbalēšanas laiku noteikšanai fiksētā ādas apgabalā, šo laiku sadalījuma attēlošanai un remisijas pulsāciju detektēšanai vienlaikus pie vairākiem viļņu garumiem. Eksperimentāli noteikti raksturīgie autofluorescences fotoizbalēšanas laiki no fiksēta ādas rajona visiem sešiem ādas fototipiem. Konstatēts fotoizbalēšanas parametru specifisks virsmas sadalījums ādas patoloģijās, kā arī veselā ādā un nagā. Eksperimentāli nodemonstrēts dzīvas ādas „foto-atmiņas” efekts un novērtēts veselas ādas autofluorescences atjaunošanās laiks pēc zemas jaudas lāzera apstarojuma. Konstatētas dažādu viļņu garumu fotopletizmogrāfisko signālu raksturīgas atšķirības elpas aiztures un kontaktzondes spiediena testos. Sniegti priekšlikumi izstrādāto metožu klīniskam pielietojumam ādas neinvazīvajā diagnostikā.

Atslēgas vārdi: *in-vivo* āda, autofluorescences fotoizbalēšana, multispektrālā fotopletizmogrāfija

## Abstract

Time dependences of *in-vivo* skin autofluorescence and remission intensities under continuous low power laser irradiation have been studied in the doctoral thesis. Three novel methodologies of contactless *in-vivo* skin diagnostics – for determination of autofluorescence photobleaching rates from fixed skin area, for imaging, of distribution of these rates, and for detection of remission pulsations simultaneously at several wavelengths – have been developed and tested. The characteristic photobleaching rates of autofluorescence have been determined experimentally for all six skin photo-types. Specific surface distributions of photobleaching parameters of skin pathologies, healthy skin and skin-nail interface have been recorded. *In-vivo* skin “photo-memory” effect has been demonstrated experimentally, and autofluorescence recovery time after low power laser irradiation of healthy skin was estimated. Characteristic variations of photoplethysmographic signals at different wavelengths during breath holding and skin contact probe pressure tests have been recorded. Eventual clinical applications of the developed methods for non-invasive skin diagnostics have been discussed.

Keywords: *in-vivo* skin, autofluorescence photobleaching, multi-spectral photoplethysmography.

## Galvenie apzīmējumi

AC – PPG signāla maiņkomponente

AF – autofluorescence

DC – PPG signāla līdzkomponente

FDT – fotodinamiskā terapija

FS – fotosensibilizators

I – intensitāte

$I(xy)$  - attēla pikseļa intensitātes vērtība

$I(xy,t)$  – pikseļa intensitātes laika atkarība

$M(t)$  – laika atkarīgais attēlu masīvs

$M_i(xy,t)$  – intensitātes laika atkarīgo elementu masīvs

$M_p(\tau_{xy})$  – autofluorescences fotoizbalēšanas parametriskais masīvs

PPG – fotopletizmogrāfija

t – laiks

$\tau_1$  – autofluorescences ātras fotoizbalēšanas laika parametrs

$\tau_2$  - autofluorescences lēnas fotoizbalēšanas laika parametrs

# Saturs

Lpp.

1. Ievads.....	6
2. Ādas <i>in-vivo</i> fluorescence un remisija (pārskats)	
2.1. Ādas uzbūve un optiskās īpašības.....	7
2.2. Ādas autofluorescence .....	9
2.3. Fluorescences fotoizbalēšana.....	11
2.4. Remisijas fotopletizmogrāfija .....	13
3. Mērījumu un datu apstrādes metodika	
3.1. Ādas autofluorescences punktveida mērījumi nepārtrauktā lāzera ierosmē .....	15
3.2. Ādas autofluorescences fotoizbalēšanas parametru attēlošanas metode un iekārta .....	18
3.3. Multispektrālās remisijas fotopletizmogrāfijas metode un iekārta.....	19
4. Mērījumu rezultāti	
4.1. Ādas autofluorescences punktveida mērījumu rezultāti.....	20
4.2. Fotoizbalēšanas laiku sadalījuma attēli.....	22
4.3. Ādas „foto-atmiņas” efekts un tā izpausmes .....	24
4.4. Asins pulsāciju detektēšana dažāda dziļuma vaskulāros slāņos elpas aiztures un zondes spiediena testos .....	25
5. Rezultātu analīze un secinājumi.....	27
6. Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes .....	28
7. Promocijas darba publikāciju kopa .....	29
8. Ziņojumi starptautiskās konferencēs (tēzes) .....	30
9. Citētā literatūra .....	31

## Ievads

Ādas patoloģiju savlaicīga atklāšana un novērtēšana ir aktuāla mūsdienu klīniskās diagnostikas problēma, jo šādu patoloģiju (t.sk. nāvējošās melanomas) gadījumu skaits Eiropā un pasaulē turpina pieaugt. Pašreiz visprecīzākā metode ādas saslimstību identificēšanai ir biopsija – parauga izkniebšana no bojātās ādas rajona ar sekojošu histoloģisku analīzi. Tā ir sāpīga, destruktīva, laikietilpīga un salīdzinoši dārga metode. Mūsdienu biofotonikas pētījumos tiek attīstītas jaunas neinvazīvas „optiskās biopsijas” metodes, kas ir ātrākas un pacientam draudzīgākas. Lāzeru ierosinātas ādas autofluorescences un remisijas parametru iespējamie pielietojumi diagnostiskā šobrīd izraisa īpašu interesi.

**Darba mērķis:** Novērtēt lāzeru ierosinātas *in-vivo* ādas autofluorescences un multi-spektrālās remisijas laikā mainīgo parametru diagnostisko potenciālu.

### Darba uzdevumi:

1. Izstrādāt eksperimentālas metodikas *in-vivo* ādas parametru raksturošanai nepārtrauktā zemas jaudas ( $< 1 \text{ mW/mm}^2$ ) lāzeru ierosmē:
  - autofluorescences fotoizbalēšanas laiku mērījumiem no fiksēta ādas rajona
  - fotoizbalēšanas laiku virsmas sadalījuma parametriskai attēlošanai
  - ādas asinsrites pulsāciju vienlaicīgai detektēšanai dažāda dziļuma vaskulāros slāņos
2. Izpētīt *in-vivo* ādas autofluorescences fotoizbalēšanas efektu nepārtrauktā zemas jaudas lāzeru ierosmē pie dažādiem viļņu garumiem visiem ādas fototipiem un pigmentētām ādas patoloģijām.
3. Izpētīt *in-vivo* ādas autofluorescences īpašības dažādos laikos pēc zemas jaudas lāzeru apstarojuma.
4. Izpētīt *in-vivo* ādas remisijas signālu laika atkarības elpas aiztures un kontaktzondes spiediena testos vienlaicīgi pie dažādiem viļņu garumiem.

### Galvenie rezultāti un to novitāte

Darbā izstrādātas un eksperimentāli apbētas trīs jaunas metodikas *in-vivo* ādas parametru raksturošanai atbilstoši 1. darba uzdevumam. Pirmo reizi:

- veikti sistemātiski lāzeru ierosinātas ādas autofluorescences fotoizbalēšanas laiku mērījumi visiem ādas fototipiem un pigmentētiem veidojumiem pie trim lāzeru viļņu garumiem, nosakot sakarību starp melanīna saturu ādā un autofluorescences fotoizbalēšanas laiku;
- iegūti ādas autofluorescences fotoizbalēšanas laiku sadalījuma attēli veselai un patoloģiskai ādai pie 405nm un 532 nm ierosmes;
- eksperimentāli nodemonstrēts ādas „fotoatmiņas” efekts pēc zemas jaudas 405nm un 532nm lāzeru apstarojuma;
- realizēti ādas remisijas intensitātes mērījumi ar laika izšķiršanu vienlaikus pie vairākiem lāzeru viļņu garumiem un konstatētas šo signālu raksturīgās izmaiņas elpas aiztures un kontaktzondes spiediena testos.

Zinātnisko novitāti apliecina 4 SCI un 6 SCOPUS datu bāzēs starptautiski citētas publikācijas [I - X], kas veido aizstāvēšanai izvirzīto darbu kopu. Darba rezultāti prezentēti 10 starptautiskās konferencēs.

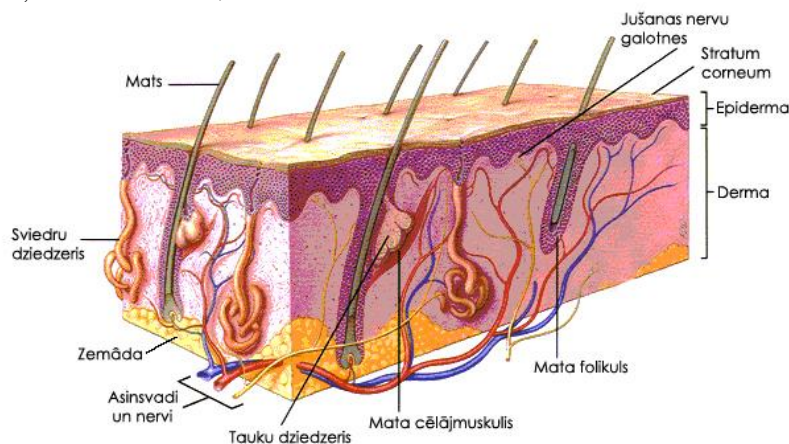
Promocijas darba kopsavilkuma 1. daļā sniegts pārskats par līdzinējiem pētījumiem darba tematikā. 2. daļā aprakstītas veikto mērījumu un datu apstrādes metodikas. 3. daļā prezentēti galvenie mērījumu rezultāti un piedāvāta to interpretācija. 4. daļā formulētas aizstāvēšanai izvirzītās tēzes un sniegtas atsauksmes uz publicētajiem darbiem. Kopsavilkuma apjoms 33 lpp., tajā ir 23 ilustrācijas un 5 tabulas, citēti 38 literatūras avoti.

## 2. Ādas *in-vivo* fluorescence un remisija (pārskats)

### 2.1 Ādas uzbūve un optiskās īpašības

Cilvēka ādai ir slāņaina struktūra, kurā izšķir trīs pamatslāņus (Att.1.):

- virspusējo epitēlija slāni – virsādu jeb epidermu;
- vidējo slāni – pamatādu jeb īsto ādu (derma);
- apakšējo dziļo slāni – zemādu;



Att.1. Ādas uzbūve [1].

Ādas epiderma sastāv no plakana daudzkārtu epitēlija. Tā dziļumā ir t.s. augšanas slānis, kurā atrodas šūnas, kuras daloties izveido jaunu slāni no cilindriskām lielu kodolu šūnām. Šo šūnu augšana notiek tikai virzienā uz ādas virsusi, tā rezultātā notiek pastāvīga epidermas atjaunošanās. Epidermas biezums tipiski ir 0.1-0.2 mm, bet tas var arī būtiski mainīties (0,03 – 1,5 mm) atkarībā no anatomiskās vietas – plānāka epiderma ir uz acu plakstiņiem, biezāka – uz plaukstām un pēdām. Epiderma sastāv no vairākiem desmitiem šūnu kārtu, kas veido piecus slāņus:

- bazālais slānis, kas saistīts ar bazālo membrānu;
- dzeloņainais slānis;

Šo abu slāņu šūnas spēj mitotiski dalīties, tādēļ bazālo un dzeloņaino slāni apvieno augšanas slānī, tā biezums ir ap 5 – 10  $\mu\text{m}$ , tas satur melanocītus un keratinocītus.

- graudainais slānis, tā biezums ap 3  $\mu\text{m}$ ;
- spīdošais slānis;
- raga slānis, ko veido daudzas kārtas zvīņām līdzīgu pārragotas šūnas. Raga slānis ir elastīgs, slikti vada siltumu. Tā biezums 8 – 15  $\mu\text{m}$ ;

Dermas biezums ir 0,5 – 3 mm, tā darbojas kā amortizētājslānis epidermai. Dermai izšķir:

- kārpiņu slāni, kas atrodas tieši zem epidermas, to veido irdeni saistaudi, kuros atrodas daudz asins kapilāru.
- tīklaino slāni, kas sastāv no blīviem saistaudiem. Šajā slānī ir kolagēna šķiedru kūlīši, kā arī elastīgās šķiedras.

Lielākā daļa kolagēna šķiedru iet divos virzienos – paralēli ādas virsmai un slīpi, tādējādi veidojas tīkls, kas dažādās ķermeņa daļās ir atšķirīgs, jo ir piemērots konkrētā ādas rajona funkcionālai slodzei. Tajās vietās, kur mēdz būt liels spiediens (plaukstas, pēdas), kolagēna šķiedru veidotajā tīklā brīvie laukumi ir plaši, bet šauri tur, kur āda bieži tiek izstiepta. Šajā slānī atrodas arī matu saknes, sviedru un tauku dziedzeri.

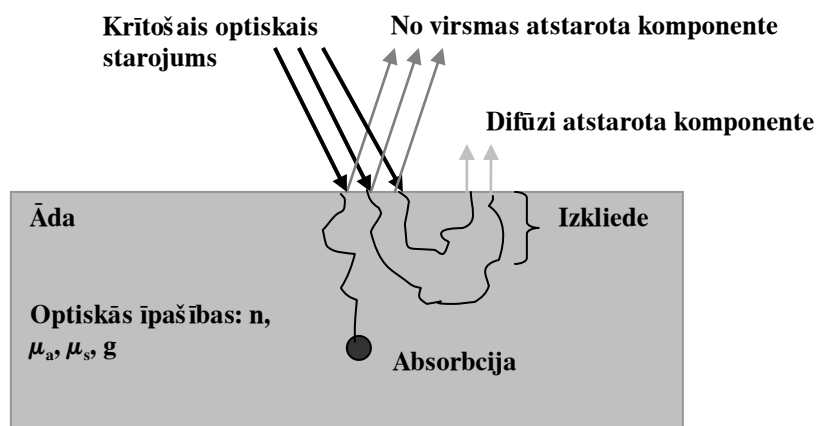
Zemādas saistaudu slānis ir pats dziļākais ādas slānis un ar dermas slāni tam krasu robežu nav, to caurauž blīvi saistaudu šķiedru kūlīši. Lielāko daļu zemādas audu veido zemādas tauku kārtā, kas darbojas kā siltumizolācijas slānis un kā rezerves barības vielu krātuve. Zemādā atrodas artērijas un vēnas, kas nodrošina asins apgādi ādas augšējiem slāņiem [1].

Ādas asins apgādi nodrošina zemādā esošās artērijas, kuru diametrs ir aptuveni 100  $\mu\text{m}$ . Ieejot dziļākajā dermas slānī tās sadalās vienu vai divas reizes, un to zari līdz vidējiem dermas slāņiem izvietojas gareniski vai slīpi

attiecībā pret ādas virsmu. Sasniedzot vidējo dermas slāni, notiek nākošā artēriju atzaru dalīšanās. Tā rezultātā vidējo dermas slāni caurvij artērijas ar diametru līdz 50  $\mu\text{m}$ , šāda diametra asinsvadi tiek saukti par arteriolām (rezistīvā asinsvadu daļa). Pēc vairākkārtējas dalīšanās, sasniedzot augšējos dermas slāņus, rezistīvo asinsvadu izmērs ir samazinājies līdz  $\sim 15 \mu\text{m}$  diametrā un tie ir kļuvuši par kapilāriem - asinsvadu sienīņu veido tikai viens endotēlijslānis [2]. Kapilāri ir izvietoti tuvu dermas robežslānim ar epidermu.

Arteriolu dalīšanās rezultātā veidojas kapilāru tīkls, kuru veidojošie 4 – 10  $\mu\text{m}$  diametra asinsvadi ieņem ādas virsmai perpendikulāru pozīciju. Normālā veselā ādā augšējo asinsvadu slāni parasti veido tikai kapilāri. Katrā augšējā dermālā slāņa kvadrātmilimetrā ir izvietotas aptuveni 60 līdz 70 kapilāru cilpas [3]. Speciāls kapilāru tīkls apņem sviedru dziedzerus, matu sīpoliņus, tauku dziedzerus un jušanas nervu galus. Arteriolu un vēnulu savienotājkanāli atrodas tajā pašā slānī, kur izvietoti ādas sviedru dziedzeri. Vēnulas lielākoties ir izvietotas paralēlāk attiecībā pret ādas virsmu, nekā arteriolas. Asinis no kapilāriem nonāk zemādas vēnu pinumā. Augšējā un vidējā dermas slānī vēnulu diametrs mainās no 40 - 60  $\mu\text{m}$ , bet dziļākos audu slāņos no 100 – 400  $\mu\text{m}$ .

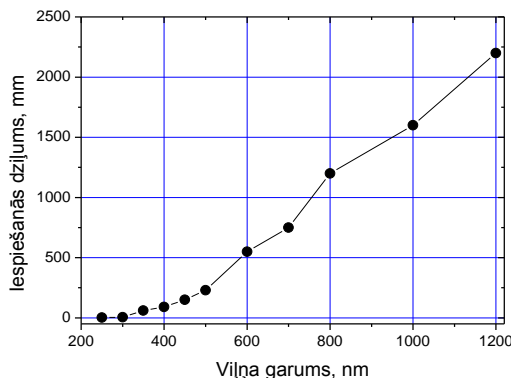
Āda ir optiski nehomogēna vide. Tā sastāv no dažādu veidu šūnām, molekulām, šķiedrām, kuras visas izvietotas neregulāri. Šajās ādas struktūrās optiskais starojums tiek gan absorbēts (Att.2), gan izkliedēts - izkliede ir saistīta ar vides refrakcijas indeksa izmaiņām, un tās veids (Releja vai Mī izkliede) atkarīgs no izkliedējošo daļiņu izmēriem.



Att.2. Optiskā starojuma mijiedarbība ar ādu.

Daudzkārtēja optiskā starojuma izkliede uz ādas dažāda veida šūnām, šūnu organelām, molekulām un šķiedrām veido starojuma difūzi atstaroto komponenti, jeb **remisiju**. Difūzi atstarota gaisma, pateicoties ādas optiskai nehomogenitātei, ir vairākkārtīgi izkliedēta.

Optiskā starojuma iespiešanās dziļums ādas audos ir atkarīgs no starojuma viļņa garuma [4]. Par vidējo starojuma iespiešanās dziļumu audos pieņemts uzskatīt dziļumu, kurā starojuma intensitāte ir samazinājusies  $e=2.71$  reizes. Att.2. sniegta aprēķinātā vidējā starojuma iespiešanās dziļuma ādā atkarība no viļņu garuma.

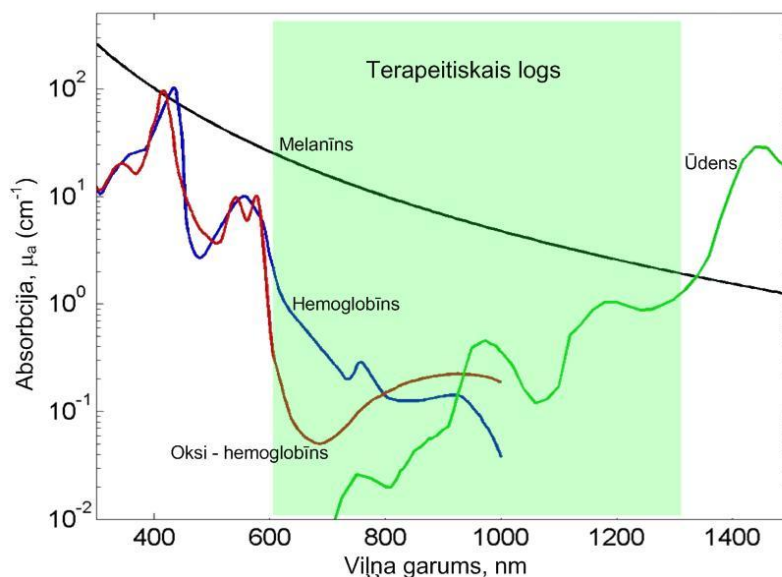


Att.3. Optiskā starojuma vidējais iespiešanās dziļums ādas audos atkarībā no starojuma viļņu garuma (aprēķinu dati [4,5]).



Pieaugot viļņu garumam virs 1300 nm, starojuma iespiešanās dziļums strauji samazinās. Vislielākais optiskā starojuma iespiešanās dziļums audos ir tā sauktajā “terapeitiskā loga” diapazonā, kas ir 600 – 1300 nm [4,5].

Katrai no ādu veidojošām audu kārtām ir atšķirīgas optiskās īpašības. Vielas, kas spēcīgi absorbē optisko starojumu ādā, sauc par hromoforām. Nozīmīgākās ādas hromoforas ir ūdens, melanīns un hemoglobīns, kuru absorbcijas spektri parādīti 3. attēlā. Asinsvadi, kuros atrodas oksihemoglobīnu un dezoksihemoglobīnu saturoši eritrocīti (sarkanie asinsķermenīši), ir novietoti dermā. Raga kārtā un epidermā ļoti spēcīgi absorbē ultravioleto starojumu – to nosaka šajos slāņos esošais melanīns.



Att.4. Absorbēcijas koeficienta atkarība no viļņu garuma galvenajiem ādas absorbentiem. Viļņu garumu diapazonā no 600 -1300 nm kopēja audu absorbēcija ir minimāla, un šo reģionu dēvē par audu terapeitisko logu [6].

## 2.2 Ādas autofluorescence

Fluorescences diagnostisko potenciālu pirmo reizi aprakstīja Stubels 1911 gadā. Stubels pētīja dzīvnieku audu dabisko fluorescenci (t.s. autofluorescenci) UV ierosmē [7]. 1924 gadā Francijas pētnieks Polikards novēroja audzēja sarkano fluorescenci, apstarojot to ar Vuda lampu. Toreiz Polikards novēroja endogenu (dabisku) porfirīnu audzēja audos [8]. Mūsdienās, attīstoties spektroskopijas un attēlošanas metodēm, audu autofluorescenci izmanto kā papildus diagnostisko instrumentu vairākās medicīnas nozarēs, t.sk. bronholoģijā, uroloģijā, ginekoloģijā, dermatoloģijā un citur [9-14].

Audu fluorescenci iedala divās kategorijās:

- Audu endogēnā fluorescenci, jeb autofluorescenci (AF)
- Audu eksogēnā fluorescenci, jeb audos mākslīgi ievadīto vielu fluorescenci.

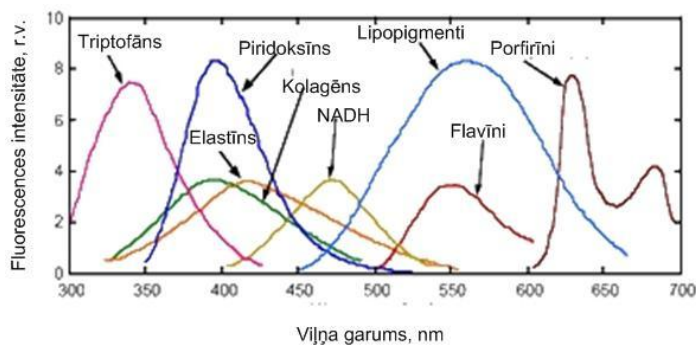
Audu AF parasti izmanto diagnostiskos nolūkos, turklāt eksogēno fluorescenci izmanto gan diagnostikā, gan terapijā. Šajā darbā galvenā uzmanība tika pievērsta ādas autofluorescenci un tās īpašībām.

Ādas autofluorescence veidojas, optiski ierosinot endogenu fluorescējošo molekulu (fluorohromu jeb fluoroforu) augstākus enerģētiskus stāvokļus, no kuriem notiek izstarojuma pāreja uz zemākiem stāvokļiem. Gandrīz visi bioloģiskie audi emitē fluorescento starojumu, ja tos ierosina ultravioletajā vai redzamajā spektra daļā. Āda satur strukturētu matricu no fluorescējošām un nefluorescējošām molekulām, un autofluorescences spektrs veidojas, pārklājoties vairāku endogenu molekulu emisijas spektriem. Ādas absorbcijas un izkliedes rezultātā AF emisijas spektrs ir plašs un nestrukturēts. Dati par galveno ādas fluorohromas (jeb fluoroforu, t.i. fluorescējošo molekulu) ierosmes un emisijas viļņu garumiem [15,16]) ir apkopoti 1. tabulā. 4. un 5. attēlos ir parādīti dažādu ādā esošo fluorohromu absorbcijas un emisijas spektri

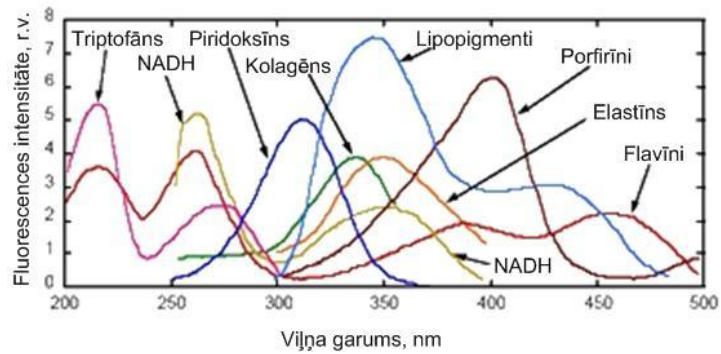
Tabula 1. Endogēno fluorohromu fluorescences īpašības.

Grupa	Nosaukums	Saīsinājums	Ierosmes viļņa garums (nm)	Emisijas viļņa garums (nm)	Kvantu izeja
Aminoskābes	Fenilalanīns	Phe	260	282	0.024
	Tirosīns	Tyr	275	303	0.2
	Triptofāns	Tryp	287	348	0.14
Proteīni	Lipofuscīns		340-395	430-460; 540	
	Kolagēns		325	400	
	Elastīns		325	400	
Nikotīnamīda Koenzīmi	Nikotīnamīda adenīna dinukletīds	NADH	340	435	0.019
	Nikotīnamīda adenīna dinukletīda fosfāts	NAD(P)H	340	460	0.019
Flavīna Koenzīmi	Flavīn adenīna dinukleotīds Flavīn adenīna dinucleotīds	FAD	450	530	0.025
	Riboflavīns (Vitamīns B2)		370	530	0.025
	Piridoksīns (Vitamīns B6)		330	420	0.02-0.15
Porfirīni	Hematoporfirīns	HpD	405, 544	610, 675	0.11-0.32
	Protoporfirīns IX	PpIX	415, 582	634	

Var pamanīt, ka absorbcijas maksimumi vairumam endogēno fluorohromu ir UV un redzamajā spektra daļā. Lielā daļā endogēno fluorohromu ir iesaistīti šūnu vielmaiņas procesos vai arī saistīti ar ādas strukturālo matricu [13]. Tos var klasificēt un sadalīt sekojošās grupās: aromātiskās aminoskābes un proteīni, piridīna nukleotīdi, flavīni un porfirīni.



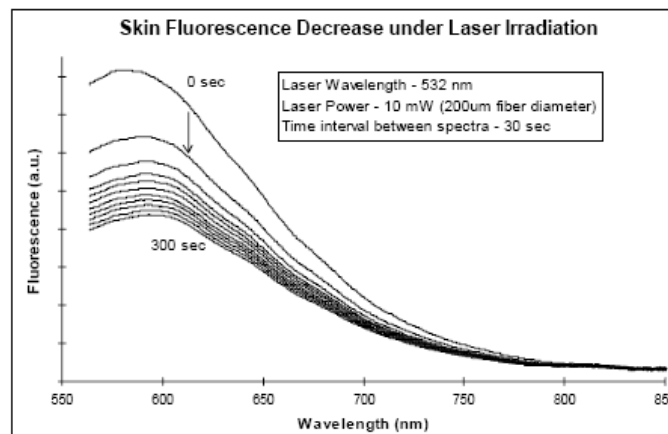
Att. 5. Endogēno fluorohromu emisijas spektri.[17]



Att. 6. Endogēno fluorohromu absorbcijas spektri.[17]

### 2.3 Fluorescences fotoizbalēšana

Fotoizbalēšana (angl. *photobleaching*) ir fluorescences intensitātes samazināšanās process ilgstošā optiskā ierosmē. Att.6 ir ilustrēta ādas AF intensitātes samazināšanās dinamika nepārtrauktā lāzera ierosmē [18].



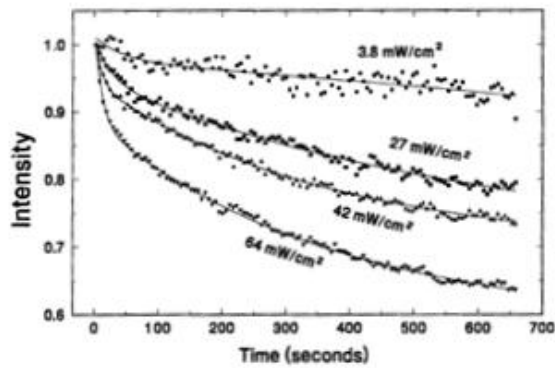
Att.7. In-vivo ādas autofluorescences spektra izmaiņu dinamika nepārtrauktā lāzera ierosmē. Ierosmes viļņa garums 532 nm, jaudas blīvums 10 mW/cm<sup>2</sup> [18].

Pirmo reizi veselas ādas in-vivo fotoizbalēšanas efektu zilajā ierosmē (442 nm) detalizēti izpētīja H. Zengs 1993. gadā [19]. Zengs pirmais piedāvāja dubult-eksponenciālo aproksimāciju AF intensitātes dilšanas procesam un ieviesa parametrus  $a$ ,  $b$ ,  $A$ ,  $\tau_1$ , un  $\tau_2$ , kuri apraksta ādas AF intensitātes  $I$  fotoizbalēšanas procesu laikā  $t$ :

$$I(t) = a \exp(-t/\tau_1) + b \exp(-t/\tau_2) + A \quad (1)$$

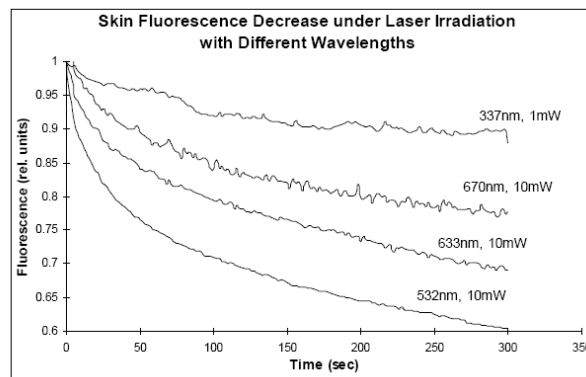
Viņš konstatēja, ka intensitātes samazināšanās notiek divās fāzēs - ātrās intensitātes samazināšanas fāzē, kuru raksturo  $\tau_1$ , un lēnās dilšanas fāzē, kuru raksturo  $\tau_2$ . Savukārt parasti eksistē arī paliekošā intensitāte, kura bezgalībā tiecas uz pastāvīgu līmeni  $A$ .

Zengs pētīja dilšanas parametru atkarību no ierosmes jaudas un konstatēja, ka fotoizbalēšana ir atkarīga no ierosmes jaudas blīvuma - jo lielāka ierosmes jauda, jo straujāk samazinās intensitāte (Att. 8) [19].



Att.8. Ādas autofluorescences dilšanas kinētika pie dažādiem ierosmes (442 nm) jaudas blīvumiem [19].

Turpmākajos gados ādas AF fotoizbalēšana ir pētīta vairākkārtīgi. Publicēti raksti, kuri apraksta AF fotoizbalēšanu plašā spektra diapazonā ultra-violetā (337 nm), violetā (405 nm), zilā (442 nm), zaļā (532 nm) un sarkanā (632 nm) lāzeru starojuma ierosmē (Att.9). Ādas AF fotoizbalēšana ir novērota gan nepārtrauktā, gan impulsa ierosmē jaudas blīvumu diapazonā 1 ... 500 mW/cm<sup>2</sup> [18-21].



Att.9 Ādas AF intensitātes dilšana pie dažādiem ierosmes viļņa garumiem [18].

Ādas fluorescences fotoizbalēšanai ir piedāvāti vairāki praktiski pielietojumi. 2000. gadā Maskavas Valsts Universitātes pētnieki piedāvāja mērķtiecīgi izmantot ādas AF fotoizbalēšanu, lai paaugstinātu fotodinamiskās terapijas (FDT) efektivitāti, tieši speciāli „izdedzinot” dabiskus ādas fluorohromus, tādējādi izslēdzot autofluorescences nevēlamo iedarbību un paaugstinot FDT efektivitāti [18,22].

2002. gadā Lundas Medicīnas lāzeru centra pētnieki piedāvāja izmantot fotoizbalēšanas metodi eksogēno fluorohromu (fotosensibilizators) kontrolei fotodinamiskās terapijas laikā. Fotosensibilizators (FS) ierosinātā stāvoklī producē singleta skābekli, kurš ir nepieciešams vēža šūnu iznīcināšanai, savukārt producētais singleta skābeklis vienlaikus iedarbojas arī uz fotosensibilizatoru un sagrauj to, kā rezultātā strauji samazinās fluorescences intensitāte un FDT efektivitāte. Fluorescences intensitātes samazināšanās liecina par aktīvo FS koncentrācijas samazināšanos. Tādējādi, kontrolējot fotosensibilizatoru fotoizbalēšanas procesu, var precīzi noteikt momentu, kad terapija vairs nav efektīva [23,24].

Ir zināma mērķtiecīga fotoizbalēšanas efekta izmantošana ādas in-vivo keratonoīdu koncentrācijas noteikšanas efektivitātes palielināšanai neinvazīvajā Ramana spektroskopijā [25]. Keratinoīdu Ramana līnijas paliek nemainīgas arī pēc fotoizbalēšanas, kad kopējais autofluorescences fons ir ievērojami samazināts [25,26].

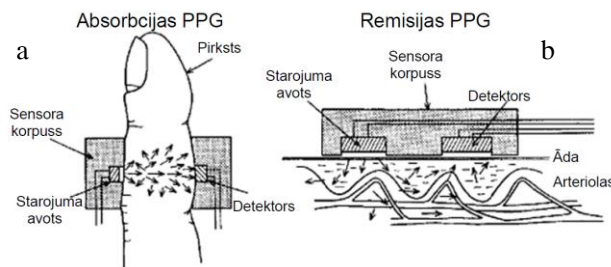
Apkopojot pieejamos literatūras datus tika konstatēts, ka laikā posmā no 1993.g līdz 2005 g. veiktajos pētījumos ādas AF fotoizbalēšanas efekta pielietojanas iespējas ādas diagnostikai nav aplūkotas. Kā arī netika piedāvāti precīzi apraksti ādā notiekošo procesu nepārtrauktā lāzera ierosmē. Turklāt literatūrā aprakstītajos pētījumos dažos gadījumos tika vairākkārt pārsniegta minimāli pieļaujama starojuma ekspozīcija kura ir pieteikta Eiropas ādas lāzera drošības standartā (<200 mW/cm<sup>2</sup>, ekspozīcijas laiks līdz 103 s., minimāli pieļaujamā doza 20.6 J) [27].

## 2.4 Remisijas fotopletizmogrāfija

Asinsvadiem izplešoties un saraujoties sirdsdarbības rezultātā, periodiski izmainās dzīvo audu kopējais asins tilpums. Tam var sekot līdzī reālā laikā, piemēram, ar pletizmogrāfijas metodi. Vārds *pletizmogrāfija* sastāv no divām daļām: (pletizmo + grāfija), kuri tulkojumā no grieķu valodas nozīmē *izstiepums + pieraksts*, savukārt promocijas darbā izmantotais termins *Fotopletizmogrāfija* (*photo-plethysmography, PPG*) jeb fotoelektriskā pletizmogrāfija nozīmē asins tilpuma izmaiņu reģistrēšanu, izmantojot optisko starojumu.

Zem ādas atrodas asinsvadu tīklojums, un pateicoties sirdsdarbībai, asinsvados pulsē asinis; sekojoši periodiskajām asins tilpuma izmaiņām, mainās arī iedarotās gaismas absorbcija zemādas audos. Izmantojot speciāli veidotus uztvērējus, kuru pamatā ir starojuma jutīgs sensors (piemēram, fotodiode), ir iespējams uztvert šī starojuma absorbcijas izmaiņas laikā, kā rezultātā veidojas fotopletizmogrāfiskais signāls. PPG signāls sastāv no divām komponentēm [28] – lēni mainīgās līdzkomponentes (DC) un laikā ātri mainīgās maiņkomponentes (AC). Līdzkomponente (DC) sastāda lielāko daļu no PPG signāla amplitūdas, tā parāda kopējo asins apjomu audos, bet ir atkarīga arī no ādas, asinsvadu un kaulu absorbcijas. Maiņkomponente sastāda 0.5 – 2 % no kopējā signāla amplitūdas. Fotopletizmogrāfiskā signāla mērīšanas metode visbiežāk tiek izmantota t.s. „terapeitiskā loga” viļņu garumu diapazonā no 600 - 1300 nm, kurā ūdenim un hemoglobīnam ir vismazākā absorbcija, lai optiskais starojums pēc iespējas dziļāk iespiestos audos un mijiedarbotos ar lielāku asinsvadu tilpumu.

Pastāv divas PPG signālu mērīšanas metodes – absorbcijas un remisijas [29]. Būtība abām metodēm ir vienāda, bet atšķirīgs ir to izpildījums. Absorbcijas PPG metodē starotājelements un starojuma uztverošais elements tiek novietoti savstarpēji pretēji (Att.10), kā rezultātā tiek reģistrētas caur audiem izplūstošā starojuma intensitātes izmaiņas. Šīs metodes trūkums ir tāds, ka to nevar pielietot ķermeņa vietās, kuru audu biezums pārsniedz vienu centimetru. Priekšrocība ir tā, ka izplatoties cauri visam audu slānim, starojums tiek labāk modulēts un iegūtais PPG signāls ir mazāk trokšņains.



Att.10. Fotopletizmogrāfiskā signāla mērīšanas metodes: a) absorbcijas, b) remisijas PPG [28].

Savukārt remisijas PPG metodē starotājelements un starojuma uztverošais elements atrodas viens otram blakus (Att.10). Izklidētais (remitētais) starojums arī izplatās cauri noteikta biezuma audu slānim, kurā notiek starojuma absorbcija periodiski mainīgā asins tilpumā. Remisijas fotopletizmogrāfijā ļoti svarīgs parametrs ir audu gaismas izkliedes spēja. Tas ir komplekss parametrs, ko veido ādas virsmas reljefa un ādas sastāvdaļu, t.sk. vaskulatūras specifiskās struktūras radītā gaismas izkliede.

Ja remisijas PPG metodi izmanto ar šauras joslas nepārtraukta starojuma gaismas avotiem (gaismas diodes, lāzeri), tad PPG signāli atspoguļo asins pulsācijas noteiktā iespiešanās dziļuma zonā, kas ir atkarīga no gaismas avota emitētā viļņa garuma (Att. 2). Visbiežāk remisijas PPG ierīcēs izmanto vienu fiksētu viļņu garumu vai spektrālo joslu, tātad aptverot viena noteikta dziļuma zemādas slāni. Iepriekš ir novēroti dažādas formas PPG signāli apstākļos, kad tas pats ādas apgabals tika secīgi pakļauts dažādu viļņu garuma starojumam; formas variācijas tika izskaidrotas ar dažādu iespiešanās dziļumu zem ādas atkarībā no starojuma viļņa garuma [4,5]. Literatūrā ir aprakstīti arī lāzera Doplera un PPG mērījumi vairāku viļņu garumu gadījumā, lai analizētu asins plūsmu dažādos asinsvadu līmeņos [30-36]. Pulsoksimetrija [37,38] ir visvairāk izplatītā PPG metode, kur divas spektrālās joslas tiek analizētas vienlaicīgi, lai salīdzinātu attiecīgo PPG impulsu amplitūdas asins skābekļa satura novērtēšanai. To visbiežāk realizē absorbcijas režīmā, jo remisijas pulsoksimetrijai ir būtisks trūkums – to grūti kalibrēt, jo optiskā ceļa garumi zem ādas pie dažādiem viļņu garumiem būtiski atšķiras. Piedevām šī metode neraksturo to, kā PPG signālu DC un AC komponentes mainās laikā, kas satur klīniski nozīmīgu informāciju par asinsvadu funkcijām, tai skaitā ādas mikrocirkulāciju.

Līdz 2005. gadam literatūrā neizdevās atrast publikācijas par remisijas PPG signālu paralēliem mērījumiem pie 3 vai vairāk viļņu garumiem, kas vienlaikus salīdzinoši atspoguļotu ādas asinsvadu pulsācijas dažāda dziļuma vaskulāros slāņos.

### 3. Mērījumu un datu apstrādes metodika

Promocijas darba izpētes objekts ir *in-vivo* ādas reakcija uz ārējo optisko starojumu. Šajā sadaļā tika aprakstītas eksperimentālas metodikas ādas AF fotoizbalēšanas un multispektrālas remisijas PPG laika mainīgo parametru izpētei un to diagnostisko potenciālu novērtēšanai.

#### Izmantoto instrumentu saraksts

##### Uztvērēji:

##### Spektrometrs

Modelis: AvaSpec 2048-2 (Avantes BV, Holande)

Fotouztvērējs: 2048 kanālu CCD matrica

Izšķiršanas spēja: 2.1 nm

Spektrālais diapazons: *Master* ieejai no 187-747 nm, *Slave* ieejai no 589-1100 nm

Aprīkots ar SMA konektora ievada spraugu

##### Digitālā fotokamera

Modelis: Canon EOS 400D, 10.1 Megapikseļi

Ātrdarbība: 3 kadri/sekundē

##### Multispektrāla attēlošanas kamera

Modelis: Nuance Ex (Cambridge Research Institute, UK)

Aprīkota ar integrēto CCD kameru (1392 x 1040 pikseli)

Filtrs: šķidro kristālu filtrs.

Spektrālais diapazons: 450-950 nm

Spektrālā izšķiršanas spēja: ~2 nm

##### Gaismas avoti:

**Lāzers 1:** DPSS cietvielu lāzers, modelis WT-532-15-SA (B&W TEK INC. ASV)

Viļņa garums: 532 nm

Darbības režīms: nepārtraukts

Maksimālā izejas jauda: 19 mW ,

Aprīkots ar fokusētu SMA adapteru

**Lāzers 2:** DPSS cietvielu lāzers, modelis EN 60825 (Vācija)

Viļņu garumi: 532 nm, 807 nm un 1064 nm

Darbības režīms: nepārtraukts

Maksimālā izejas jauda: 532 nm līnijā - 45 mW, 807 nm līnijā – 10mW, 1064 līnijā – 10mW

Aprīkots ar fokusētu SMA adapteru

**Lāzers 3:** Diožu lāzers, modelis BWB-405-40-pig (B&W TEK INC. ASV)

Viļņa garums: 405 nm

Darbības režīms: nepārtraukts

Maksimālā izejas jauda: 45 mW,

Aprīkots ar fokusētu SMA adapteru

**Lāzers 4:** Paštaisīts diožu lāzers uz (TIM201-5D/642, Ķīna) moduļa bāzes

Viļņa garums: 642 nm

Darbības režīms: nepārtraukts

Maksimālā izejas jauda: 10 mW

Aprīkots ar fokusēto SMA adapteru

**Lāzers 5:** Diožu lāzers, modelis Ceralas G2 (CeramOptec, Vācija)

Viļņa garums: 807 nm

Darbības režīms: nepārtraukts

Maksimālā izejas jauda: 500 mW

Aprīkots ar fokusētu SMA adapteru

**Jaudas mērītājs:** modelis LaserCheck (Coherent, Vācija)

**Platjoslas stikla filtri:** Ж3С6, OC14

**In-line kolimators un filtru turētājs:** modelis FH-Inline-UV/VIS-VAR (Avantes, Holande)

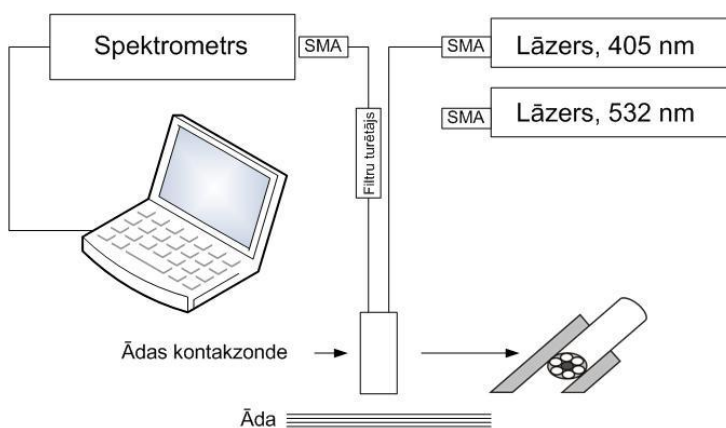
**Gaismasvadi:**

**Optisko šķiedru zonde:** modelis (FCR-7IR400-2-ME, Avantes, The Netherlands), zonde sastāv no 7x400 mm, 6 šķiedras paredzētas objekta apstarošanai, 1 šķiedra starojuma uztveršanai.

Papildus vēl tika izmantoti gaismasvads ar kvarca serdeņa diametru 600 mm un šķiedru kūlis, kurš sastāv no 6x200mm kvarca serdeņa optiskām šķiedrām.

### 3.1. Ādas autofluorescences punktveida mērījumi nepārtrauktā lāzera ierosmē

Ādas AF punktveida mērījumi tika realizēti, izmantojot eksperimentālo iekārtu, kura ir parādīta Att.11.

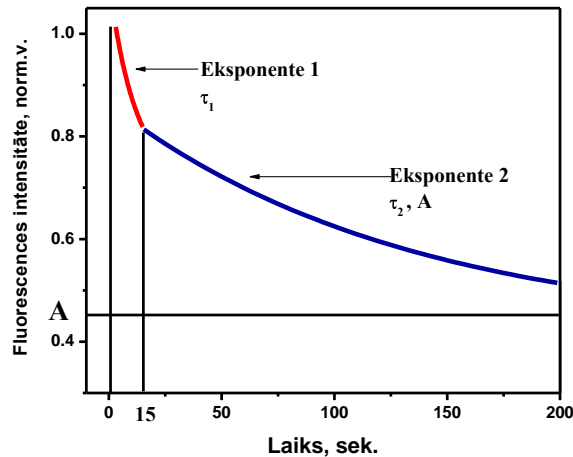


Att. 11. Ādas AF punktveida mērījumu iekārta

Iekārta sastāv no lāzeriem (405nm, 532nm) kuri aprīkoti ar SMA-tipa fokusētu izejas adapteru, optisko šķiedru Y-veida zondes starojuma pievadīšanai un fluorescentā signāla uztveršanai (nr), platjoslas stikla filtru ierosmes starojuma viļņa garuma atdalīšanai, spektrometra un datora. Optisko šķiedru zondes kontaktuzgalis ir novietots 45 grādu leņķī 3 mm attālumā no ādas virsmas.

#### 3.1.1. AF fotoizbalēšanas parametru noteikšanas metode

1. Uzņem ādas (ādas patoloģijas) lāzera ierosinātas AF spektrus ar atkārtotības periodu 1 sekunde, ierosmi ar lāzeru veicot nepārtraukti 3 minūtes.
2. Iegūtos AF spektrus normē pēc AF intensitātes maksimuma (405 nm ierosmē AF spektra maksimums pie 500 nm, 532 nm ierosmē pie 600 nm).
3. Nosaka AF spektra maksimuma intensitātes izmaiņu laikā. AF ierosinātai ar 532 nm lāzerstarojumu atbilst maksimuma punkts pie viļņa garuma 600 nm, ierosinātai ar 405 nm lāzerstarojumu atbilst maksimuma punkts pie viļņa garuma 480 nm.



Att.12. AF intensitātes samazināšanas aproksimācija.

4. AF intensitātes samazināšanos laikā aproksimē ar divām eksponentēm, jo AF intensitātes samazināšanās notiek divās fāzēs : ātrās intensitātes samazināšanas fāzē (kritums tipiski no 0 – 15 sekundēm) un lēnās intensitātes samazināšanas fāzē (kritums tipiski no 15 – 180 sekundēm).
    - AF intensitātes kritumu no 0-15sek. aproksimē ar dilstošu eksponenti 1 (Att.12):  

$$I(t_1) = a \exp(-t/\tau_1) + A_1$$
    - Intensitātes kritumu no 15-180 sek. aproksimē ar dilstošo eksponenti 2 (Att.12):  

$$I(t_2) = b \exp(-t/\tau_2) + A_2$$
  5. Rezultātā iegūst četrus parametrus, kuri raksturo AF fotoizbalēšanas procesu:
    - $\tau_1$  – ātras fotoizbalēšanas parametrs
    - $\tau_2$  – lēnas fotoizbalēšanas parametrs
    - $A_1$  – intensitātes vērtība, zemāk par kuru intensitāte nenokrīt.
    - $A_2$  – intensitātes vērtība, zemāk par kuru intensitāte nenokrīt. Tā kā konstanti  $A_1$  neievēro, tad  $A_2$  ir turpmāk teksta ir apzīmēts ar A un tiek nosaukts par *fona komponenti*.
- AF spektru apstrāde tika veikta, izmantojot *Origin 7.5* programmpaketi.

### 3.1.2. Ādas AF fotoizbalēšanas mērījumi dažādiem ādas fototipiem un ādas patoloģijām

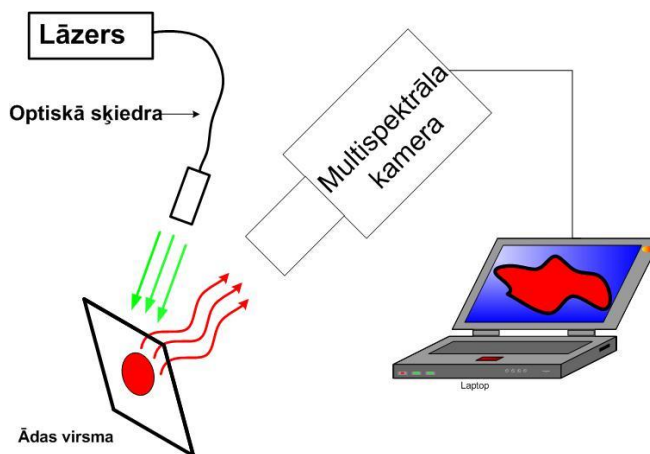
Izmantojot AF punktteida mērījumu iekārtu un fotoizbalēšanas parametru noteikšanas metodiku, tika veikts pētījums, kurā apsekoti 17 brīvprātīgie vecumā no 18 – 30 g. Pētījumā iesaistītie brīvprātīgie pārstāvēja visus sešus ādas fototipus un dažāda tipa labdabīgas ādas patoloģijas (dermatologa apstiprināts). Mērījumos tika iekļauti visu sešu ādas tipu pārstāvji - 3 cilvēki ar I ādas tipu, 6 cilvēki ar II ādas tipu, 4 cilvēki ar III ādas tipu, 2 cilvēki ar IV ādas tipu, 1 cilvēks ar V ādas tipu un 1 cilvēks ar VI ādas tipu. Ādas AF fotoizbalēšanas parametrus noteica pie divām lāzera ierosmēm (405 nm un 532 nm) ar jaudas blīvumu uz ādas virsmas  $\sim 70$  mW/cm<sup>2</sup>. Mērījumi tika veikti no kreisās rokas apakšdelma ādas. Patoloģiju gadījumā mērījumi tika veikti uz patoloģijas un uz veselas ādas 2 cm attālumā no patoloģijas.



### 3.1.3. Ādas AF atjaunošanās kinētikas noteikšana pēc zemas jaudas lāzera apstarošanas

Ādas AF atjaunošanās kinētikas noteikšanai pēc zemas jaudas lāzera apstarošanas tika izmantota autofluorescences punktveida mērījumu iekārta (Att.11.). Veselā ādā tika izvēlēti 10 apaļi apgabali 4 mm diametrā, šie apgabali 3 minūšu laikā tika iepriekš apstaroti ar  $\sim 85 \text{ mW/cm}^2$  532 nm lāzerstarojumu, reģistrējot AF intensitāti sākumā un apstarojuma beigās. Tā kā nepārtrauktā apstarojuma laikā AF intensitāte samazinās, apstarošanas sākumā intensitāte ir augstāka, nekā pēc 3 minūšu apstarošanas. Ierosme un AF reģistrācija notiek 3 mm attālumā no ādas virsmas. AF atjaunošanās kinētikas aprēķinos tiek izmantota maksimālā AF vērtība pie 600 nm. Tādējādi ādā iegūti 10 apgabali ar pazeminātām AF intensitātes vērtībām. Kontrol laikā katrā no desmit apgabaliem atkal tika ierosināta AF ar tādu pašu jaudas blīvumu, kāds tika izmantots iepriekšējā apstarošanā. Tā kā katra AF ierosme izraisa fotoizbalēšanas procesu, kontrolmērījumi tikai veikti tikai vienu reizi katrā izvēlētajā ādas apgabalā. Izmeklējumā piedalījās trīs brīvprātīgie un iegūtie rezultāti tika aritmētiski vidējoti.

### 3.1.4. Ādas AF ilgtermiņa izmaiņu attēlošanas metode un iekārta

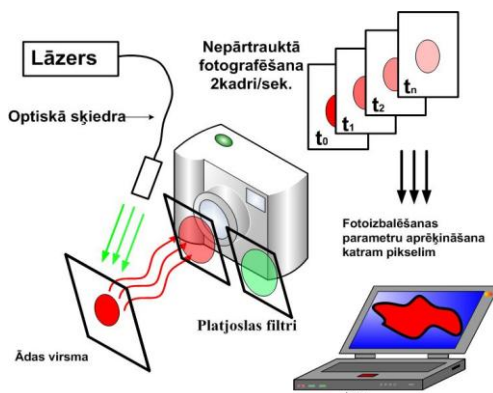


Att.13. Multispektrālas attēlošanas iekārtas shēma.

AF ilgtermiņa izmaiņu vizualizācijai tika izmantota multispektrālā attēlošanas iekārta, kura ir parādīta Att.13. Iekārta sastāv no lāzera (532 nm vai 405 nm), gaismasvada starojuma pievadam pie ādas virsmas, multispektrālās attēlošanas kameras un datora. Mērījumu laikā multispektrālā kamera atradās 20 cm attālumā no ādas virsmas.

Ādas virsmā tika izvēlēti apgabali ar laukumu  $4 \text{ cm}^2$ , un uz šiem apgabaliem tika uzlikta maska no lāzerstarojuma necaurlaidīga materiāla. 405 nm ierosmes gadījumā maska tika izpildīta krustveida atveres veidā, 532 nm ierosmes gadījumā - necaurspīdīga krusta veidā. Turpmāk katru ādas apgabalu 2 minūtes apstaroja ar lāzerstarojumu ar jaudas blīvumu  $35 \text{ mW/cm}^2$ . Rezultātā ieguvām divus ādas apgabalus, vienu apstarotu ar 405 nm, otro ar 532 nm. Tālāk no ādas virsmas tika noņemts ekranējošais materiāls un pēc 24 stundām šos ādas apgabalus atkal apstarojām un ieguvām AF attēlus. AF attēlu iegūšanai izmantots kameras šķidro kristālu filtrs, kurš tika iestādīts atbilstoši AF spektra maksimumiem - ar caurlaidību 500-520 nm AF reģistrācijai 405 nm ierosmē, un 600-620 nm AF reģistrācijai 532 nm ierosmē.

### 3.2. Ādas autofluorescences fotoizbalēšanas parametru attēlošanas metode un iekārta



Att.14. Ādas AF fotoizbalēšanas parametru attēlošanas iekārta.

Ādas AF fotoizbalēšanas parametru attēlošanas iekārta (Att.14) sastāv no lāzera (405 nm vai, 532 nm), gaismasvada starojuma pievadam pie ādas virsmas, platjoslas stikla filtra (filtrs Ж3С6 ierosmei ar 405 nm, filtrs OC14 ierosmei ar 532 nm) ierosinātas fluorescences filtrēšanai, digitālās Canon fotokameras un datora.

Metodes būtība:

Ādas virsmu ( $\sim 4 \text{ cm}^2$ ) apstaro ar nepārtrauktu lāzera starojumu ar jaudas blīvumu  $\sim 10 \text{ mW/cm}^2$  un vienlaicīgi ar apstarošanu uzņem ādas ierosinātās AF attēlu sēriju ar ātrumu 2 kadri/sekundē.  $\tau_1$  parametra noteikšanai apstarošana un reģistrācija ilgst 20-30 sekundes,  $\tau_2$  parametra noteikšanai  $\sim 3$  minūtes. Apstarošanas un reģistrācijas ilgums tika izvēlēts saskaņā ar iepriekšējo punktteida mērījumu rezultātu apstrādes algoritmu (3.1.1.). Reģistrācijas gaitā iegūst attēlu kopu, kur katram attēlam atbilst noteikts uzņemšanas laiks.

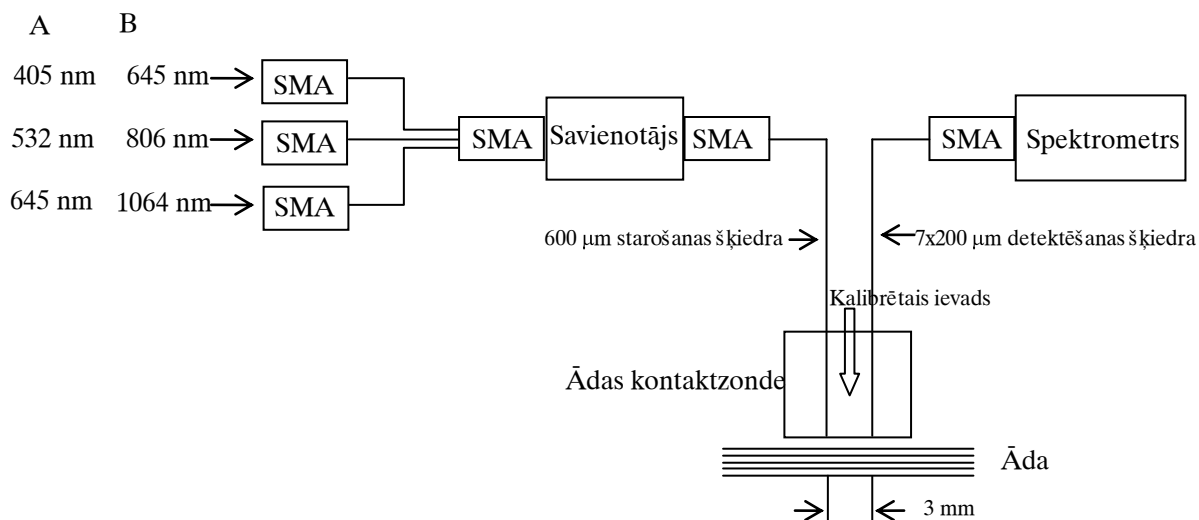
Turpmāk, lai iegūtu AF fotoizbalēšanas parametru attēlu, tika pielietota sekojoša datu apstrāde:

1. Periodiska spektrāli izfiltrēto AF attēlu fotografēšana noteiktā laika periodā  $t$ .
2. Laika atkarīgo attēlu masīva izveide  $M(t)$
3. Masīva  $M(t)$  elementiem nosaka intensitātes atkarību no laika  $I(xy,t)$  un izveido intensitātes laika atkarīgo masīvu  $M_i(xy,t)$
4. Katram masīva  $M_i(xy,t)$  elementam intensitātes laika atkarību aproksimē ar funkciju:  

$$I(xy,t) = a \exp(-t/\tau_{xy}) + A$$
, un nosaka parametru  $\tau_{xy}$  katram masīva  $M_i(xy,t)$  elementam.
5. Izveido parametrisko masīvu  $M_p(\tau_{xy})$
6. Attēla izveide, kurš reprezentē AF fotoizbalēšanas parametru  $\tau_{xy}$  virsmas sadalījumu ar atbilstošam krāsām.

Apstrādes algoritms realizēts MatLab programmas vidē. Izstrādātās metodes galvenā būtība ir četrdimensiju masīva izveide, kurš satur divas dimensijas pikseļa koordinātēm  $(x,y)$ , pikseļa AF intensitātes vērtību rindu un attēla numuru, jeb laiku. Lai izslēgtu kustību radītās kļūdas, visi attēli tika nostabilizēti pēc atbalsta punkta noteiktā vietā uz ādas, tādējādi pikseļu koordinātes nobīde nepārsniedza  $7 \pm 3$  pikseļus.

### 3.3. Multispektrālās remisijas fotopletizmogrāfijas metode un iekārta



Att.15. Multispektrālās remisijas fotopletizmogrāfijas iekārtas shēma.

Mērījumu iekārtas shēma parādīta Att.15. Triju dažādu lāzeru starojums caur savienotāju (optisko kolimatoru) tika ievadīts vienā optiskajā šķiedrā un caur to novadīts uz ādas kontaktzondi. Trīs milimetru attālumā novietotais uztverošo šķiedru kūlis ( $7 \times 200 \mu\text{m}$ ) pievienots spektrometram AvaSpec 2048-2, kas darbojas reāla laika mērīšanas režīmā ar datu nolasiņas frekvenci 20 Hz. Izmantojot spektrometru un datu apstrādes programmu iegūstam trīsdimensiju datu masīvu, no kurām divas dimensijas ir intensitātes atkarība no viļņa garuma (spektrs), bet trešā dimensija ir spektra uzņemšanas laiks.

Divkanālu spektrometrs ir piemērots paralēlu PPG signālu mērīšanai, ja starojuma avota spektrālais blīvums pārsniedz noteiktas robežvērtības. Šajā gadījumā, ņemot vērā detektora ierobežoto jutību katram pikselim, robeža ir 10 skaitījumi/nW ar integrācijas laiku 1 ms darba režīmā ar dažiem viļņa garumiem (aprēķināts saskaņā ar ražotāja datiem). Visas šķiedru optikas sastāvdaļas tika ražotas SIA Z-Light (Līvānos).

Kontaktzonde tika piestiprināta pie ādas virsmas, izmantojot abpusēju līmlenti; spiediens uz ādu tika variēts, uz kontaktzondes novietojot kalibrētus atsvarus (20, 70, 130, 230 vai 430 g). Mērījumiem tika izvēlēti divi trīs viļņu garumu lāzerstarojuma komplekti, kas atbilst abu divkanālu spektrometra ieeju spektrālajam diapazonam: (i) redzamais starojums 405, 532, un 645 nm MASTER ieejai, un (ii) sarkanais un infrasarkanais (NIR) starojums 645, 807, un 1064 nm SLAVE ieejai. Tika izmantoti divi BWTek, Inc. komerciālie lāzēri (405nm lāzers BWB-405-40-PIG-200-0.22-SMA un divu viļņu garumu (532 un 1064nm) lāzers BWT-532-15-SMA), kā arī divi pašu laboratorijā sagatavoti diožu lāzēri (645 un 807 nm). Visi lāzēri tika aprīkoti ar standarta SMA savienotājiem efektīvai sasaistei ar optisko šķiedru; stabilizēti barošanas bloki un termoregulācija garantēja lāzēru izejas jaudas stabilitāti 5% robežās. Starojuma jauda kontaktzondes izejā svārstījās no 3 mW pie 1064 nm līdz 16 mW pie 405 nm.

#### 3.3.1. Elpas aiztures un spiediena testi

Multispektrālās remisijas PPG signāli tika mērīti no desmit brīvprātīgo (atslābinātā sēdus stāvoklī) pirkstu galiem; katra mērījuma veikšana ar fiksētu lāzēra viļņu garumu komplektu ilga aptuveni 2 min. Dažiem brīvprātīgajiem mērījuma veikšanas laikā tika palūgts aizmurt elpu uz 30 s, pēc tam dziļi ieelpojot. Šie mērījumi tika veikti, lai vienlaicīgi pie vairākiem viļņu garumiem (dažāds iespiešanās dziļums ādā) fiksētu fizioloģisko procesu raksturlielnes un ietekmi uz PPG signālu. Spiediena iedarbības pētījumi ādas-kontaktzondes mijiedarbībā tika veikti trīs secīgās ~1 minūtes mērījumu sērijās - ar katru no pieciem atsvariem un abām lāzēru trīs viļņu garumu kombinācijām; tādējādi mērījumu sērijas ilgums vienam brīvprātīgajam bija aptuveni 35-40 min.

## 4. Mērījumu rezultāti

### 4.1. Ādas autofluorescences punktveida mērījumu rezultāti

#### 4.1.1. Veselas ādas AF fotoizbalēšanas parametru mērījumi dažādiem ādas fototipiem

Tab.2. ir apkopoti vidējie sešu fototipu veselas ādas fotoizbalēšanas parametri 405 nm lāzera ierosmē. Visiem sešiem ādas tipiem AF ātrās fotoizbalēšanas parametra  $\tau_1$  vērtības izrādījās laika intervālā 3-7 sek. Savukārt lēnās fotoizbalēšanas parametra  $\tau_2$  vērtības iegūtas intervālā 48-120 sek. Fona komponente  $A$  visiem ādas tipiem ir robežās no 0.23 līdz 0.6. Īpašas tendences parametru vērtībām mainīties līdz ar ādas melanīna satura pieaugumu netika novērotas.

Tab.2. Veselas ādas fotoizbalēšanas parametri.  
Ierosmes viļņa garums 405 nm, jaudas blīvums  $\sim 70 \text{ mW/cm}^2$ , relatīvā kļūda  $\sim 15\%$ .

No.	Ādas fototips	$\tau_1$ , s	$\tau_2$ , s	A
1	1	3	120	0.35
2	1	4	90	0.45
3	1	4	110	0.43
4	2	7	40	0.50
5	2	5	70	0.23
6	2	6	86	0.37
7	2	5	78	0.33
8	2	4	105	0.42
9	2	3	112	0.38
10	3	2	48	0.24
11	3	5	87	0.47
12	3	6	92	0.52
13	3	4	97	0.39
14	4	6	90	0.56
15	4	6	90	0.56
16	5	7	85	0.50
17	6	6	90	0.60

Tab. 3. apkopoti sešu fototipu veselas ādas AF fotoizbalēšanas parametri 532 nm lāzera ierosmē. I-V ādas tipiem ātrās fotoizbalēšanas parametra  $\tau_1$  vērtības izrādījās robežās no 2 līdz 7 sekundēm, būtiski neatšķiroties no situācijas 405 nm ierosmē. Lēnās fotoizbalēšanas parametra  $\tau_2$  vērtības I-V ādas tipiem bija visumā lielākas, intervālā 67-264 sek., bet fona komponente līdzīga. I-V ādas tipiem ir robežās no 0.29 līdz 0.53. Interesantākais rezultāts bija tāds, ka VI ādas tipam pie 532 nm ierosmes AF fotoizbalēšana mērījumu kļūdu robežās vispār netika konstatēta, atšķirībā no 405 nm ierosmes.

Tab.3. Veselas ādas AF fotoizbalēšanas parametri 532 nm lāzera ierosmē, jaudas blīvums ~ 70 mW/cm<sup>2</sup>, relatīvā kļūda ~ 15%.

No.	Ādas fototips	$\tau_1$ , s	$\tau_2$ , s	A
1	1	4	75	0.40
2	1			
3	1	5	80	0.44
4	2	7	140	0.52
5	2	4	141	0.35
6	2	3	105	0.43
7	2	6	120	0.47
8	2	3	67	0.36
9	2	2	170	0.53
10	3	4	264	0.40
11	3	5	145	0.37
12	3	4	136	0.41
13	3	6	142	0.52
14	4	5	85	0.29
15	4	7	135	0.51
16	5	5	105	0.38
17	6	$\infty$	$\infty$	1

#### 4.1.2. AF fotoizbalēšanas parametri veselai ādai un ādas patoloģijām.

Tabula. 4. AF fotoizbalēšanas parametru salīdzinājums dažādām ādas patoloģijām. Hemangiomas gadījuma ir II ādas tips, nēvusu gadījuma III ādas tips. Ierosme ar 532 nm lāzerstarojumu, jaudas blīvums 242 mW/cm<sup>2</sup>. AF joslas maksimums 600 nm. Aproximācijas relatīvā kļūda 15%.

Diagnoze	$\tau_1$ , s		p/v	$\tau_2$ , s		p/v	A, norm.v.		p/v
	pat.	veselā		pat.	veselā		pat.	veselā	
532 nm ierosme	pat.	veselā		pat.	veselā		pat.	veselā	
Hiperpigmentēts nēvuss	$\infty$	5	$\infty$	$\infty$	85	$\infty$	1	0.29	<b>3.4</b>
Vidēji pigmentēts nēvuss	17	5	<b>3.4</b>	100	85	<b>1.2</b>	0.30	0.29	<b>1.0</b>
Hemangioma	20	4	<b>5.0</b>	127	130	<b>1.0</b>	0.24	0.28	<b>0.9</b>

Tabulā 4 ir parādīti AF fotoizbalēšanas raksturlielumi normālai ādai un trim ādas patoloģijām 532 nm lāzera ierosmē:  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  – fotoizbalēšanas parametri, A- fona komponente, p/v – vērtību attiecība patoloģijai un veselai ādai. AF fotoizbalēšanu var raksturot visām patoloģijām un normālai ādai. Ādai ātrās fotoizbalēšanas parametrs  $\tau_1$  ir robežās 5 – 20 s, bet lēnās fotoizbalēšanas parametrs  $\tau_2$  ir robežās 85-130 s. Parametrs  $\tau_1$  ir ievērojami lielāks vidēji pigmentētajam nēvusam un hemangiomas gadījumā – p/v ir attiecīgi 3.4 un 5.0. Izņēmums ir hiperpigmentētais nēvuss, kuram nav novērojama AF fotoizbalēšana. Vidēji pigmentētam nēvusam un hemangiomai nav novērojamas izteiktas atšķirības starp patoloģiju un veselo ādu parametram  $\tau_2$  un fona komponentei A.

Tabula. 5. AF maksimuma fotoizbalēšanas parametru salīdzinājums dažādam ādas patoloģijām. Hemangiomas gadījuma ir II ādas tips, nēvusu gadījuma III ādas tips. Ierosme ar 405 nm lāzerstarojumu, jaudas blīvums 242 mW/cm<sup>2</sup>. AF joslas maksimums 500 nm. Aproximācijas relatīvā kļūda 15%.

Diagnoze	$\tau_1$ , s		p/v	$\tau_2$ , s		p/v	A, norm.v		p/v
	pat	ves		pat	ves		pat	ves	
405 nm ierosme	pat	ves		pat	ves		pat	ves	
Hiperpigmentēts nēvuss	12	11	<b>1.0</b>	114	90	<b>1.3</b>	0.62	0.56	<b>1.1</b>
Vidēji pigmentēts nēvuss	7	13	<b>0.5</b>	162	114	<b>1.4</b>	0.45	0.31	<b>1.5</b>
Hemangioma	3	4	<b>0.8</b>	81	85	<b>1.0</b>	0.36	0.23	<b>1.7</b>

Tabulā 5 ir parādīti AF fotoizbalēšanas parametri normālai ādai un ādas patoloģijām 405 nm lāzera ierosmē:  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  – AF fotoizbalēšanas laika konstantes, p/v – parametru attiecības patoloģijai un veselai ādai. Parametrs  $\tau_1$  ir robežās 4 – 13 s, patoloģijām robežas 3 - 12 s. Normālai ādai lēni parametrs  $\tau_2$  ir robežas 81-162 s, patoloģijām robežas 85 – 114 s. Nav novērojams izteiktas atšķirības starp patoloģiju un veselo ādu parametriem  $\tau_1$ ,  $\tau_2$  – p/v ir attiecīgi no 0.8- 1.0 un 1.1 – 1.7, p/v fona komponentei A ir robežas 1.1 – 1.7.

#### Rezumējums

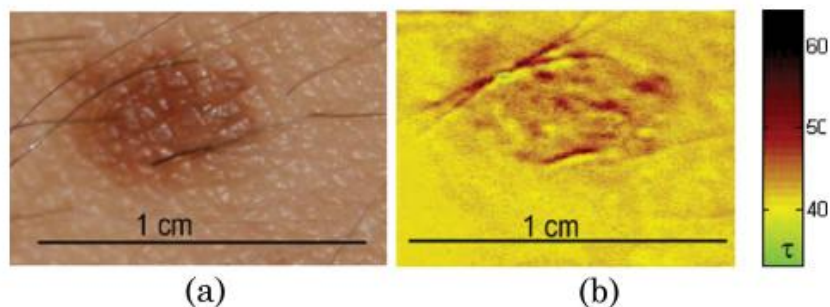
1. Iegūti eksperimentāli dati par veselas ādas AF fotoizbalēšanas parametru vērtībām visiem ādas fototipiem 405 nm un 532 nm lāzeru ierosmē.
2. Demonstrēta AF fotoizbalēšanas parametru atšķirības veselas ādas un ādas patoloģiju gadījumos 532 nm lāzera ierosmē. Konstatēts, ka paaugstināts melanīna saturs ādā (tai skaita ādas patoloģijas) bremsē fotoizbalēšanas procesu 532 nm ierosmē.

Detalizēts 5.1. nodaļā sniegto rezultātu apraksts atrodams publikācijās [V,VI,VII].

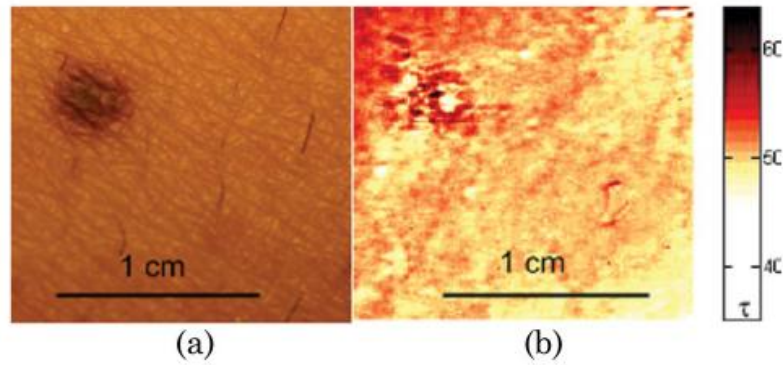
#### 4.2. Fotoizbalēšanas parametru sadalījuma attēli

Jaunizstrādātā attēlu iegūšanas tehnoloģija deva iespēju noteikt AF fotoizbalēšanas parametru vērtību sadalījumu daudz lielākam ādas laukumam (~ 4cm<sup>2</sup>).

Ja salīdzina parastās fotogrāfijas ar AF fotoizbalēšanas parametru attēliem ādas patoloģiju gadījumos, pēdējos novērojama ne vien patoloģiju formu atbilstība, bet arī detalizētāks patoloģijas struktūras atainojums. Īpaši tas attiecas uz melanīnu saturošiem pigmentētiem veidojumiem pie 532 nm lāzera ierosmes.

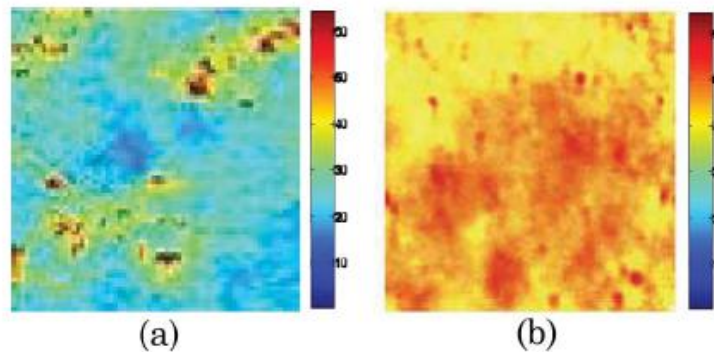


Att. 16 Vidēji pigmentētais ādas nēvus: (a) parasta fotogrāfija un (b) ātrās fotoizbalēšanas parametra  $\tau_1$  sadalījuma attēls 532 nm ierosmē. Krāsu skala reprezentē  $\tau_1$  parametru vērtības sekundēs, pareizinātas ar 10.



Att. 17. Hiperpigmentētais ādas nēvus: (a) parasta fotogrāfija un (b) ātrās fotoizbalēšanas parametra  $\tau_1$  sadalījuma attēls 532 nm lāzera ierosmē. Krāsu skala reprezentē  $\tau_1$  vērtības sekundēs, pareizinātas ar 10.

Arī veselas ādas AF fotoizbalēšanas attēli uzrādīja neregulāri izvietotus graudveidīgus paaugstinātas  $\tau_1$  vērtības apgabali (att.18.), ko var saistīt ar fluoroforu un/vai hromoforu grupām tuvu ādas virsmai.



Att.18. Ātrās fotoizbalēšanas parametra  $\tau_1$  sadalījums veselas ādas virsmas laukumā  $2 \times 2 \text{ cm}^2$ : (a) 405 nm lāzera ierosmē un (b) 532 nm lāzera ierosmē. Krāsu skala (pa labi) reprezentē  $\tau_1$  vērtības sekundēs, pareizinātas ar 10.

Darbā tika iegūti arī  $\tau_1$  sadalījuma attēli veselas ādas un naga saskares apgabalā, kā arī  $\tau_1$  un  $\tau_2$  sadalījuma attēli pigmentētu patoloģiju rajonos [II].

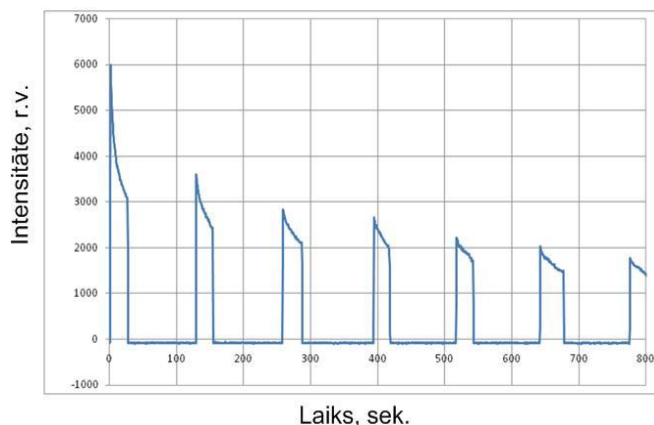
#### Rezumējums:

1. Eksperimentāli iegūti pirmie AF fotoizbalēšanas laiku parametriskie attēli veselai ādai un vairākām ādas patoloģijām, kā arī veselas ādas un naga saskares rajoniem.
2. Konstatēts specifisks fotoizbalēšanas parametru sadalījums veselas ādas virsmā un ādas patoloģijās. Melanīnu saturošu dzimumzīmju (nēvusu) gadījumos patoloģiju vietās ātrā fotoizbalēšana 532 nm ierosmē notiek lēnāk, salīdzinot ar apkārtējo veselo ādu..

Detalizēts 5.2. nodaļā sniegto rezultātu apraksts atrodams publikācijās [II, VIII].

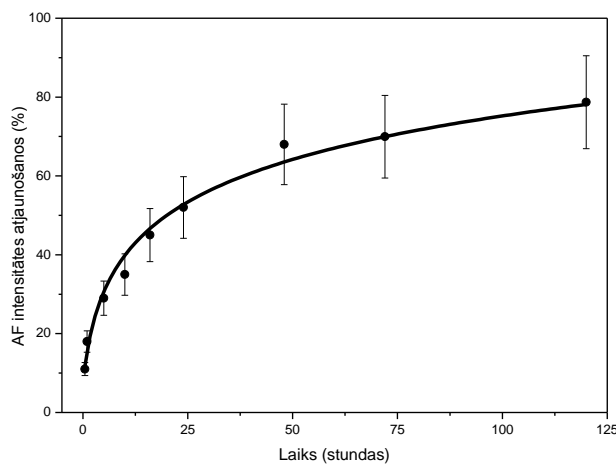
### 4.3. Ādas „foto-atmiņas” efekts un tā izpausmes

Att.19. parādītas veselas ādas AF intensitātes izmaiņas, vienu un to pašu vietu atkārtoti ierosinot ar 532 nm lāzera starojumu. Rezultāts labi ilustrē fotoizbalēšanas efekta būtību, jo apstarojuma periodos fluorescences intensitāte redzami samazinās. Vienlaikus interese izraisa fakts, ka pēc „atpūtas” starp apstarojumiem AF intensitāte neatgriežas sākotnējā līmenī, bet ir tikai nedaudz lielāka kā iepriekšējā apstarojuma izslēgšanas brīdī. Tas liecina, ka zemas jaudas ( $< 1 \text{ mW/mm}^2$ ) lāzera apstarojuma rezultātā ādā ir notikušas paliekošas pārmaiņas, ko var nosaukt par „foto-atmiņas” efektu.



Att. 19. AF intensitātes izmaiņas atkārtotās viena ādas apgabala lāzera ierosmēs. Apstarojumu ilgums 20 sek., Intervāls starp ierosmēm 2 minūtes. Jaudas blīvums  $\sim 85 \text{ mW/cm}^2$ , ierosmes viļņa garums 532 nm, reģistrācijas viļņa garums 600 nm.

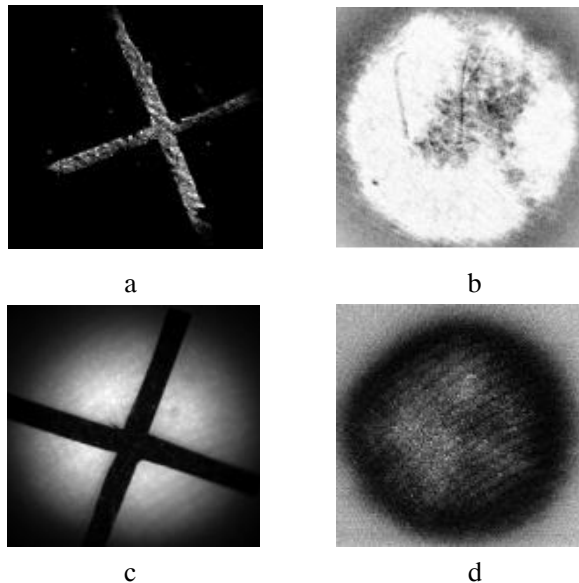
Kā liecina mērījumu rezultāti, ādas struktūras atjaunošanās pēc dažu minūšu apstarojuma ar zemas jaudas lāzera notiek ļoti lēni, vairāku dienu laikā. Att.20. prezentēta AF atjaunošanās kinētika 532 nm lāzera ierosmē. Iegūtie rezultāti rāda, ka pēc 125 relaksācijas stundām, AF intensitāte atjaunojas tikai par 80% no sākotnējās vērtības.



Att. 20. Ādas AF intensitātes atjaunošanās kinētika (vidējotie dati 3 personām). 532 nm ierosme, (jaudas blīvums  $\sim 85 \text{ mW/cm}^2$ , apstarojuma ilgums 2 minūtes) reģistrācija pie 600 nm.

Ādas „foto-atmiņas” efektu izdevās nodemonstrēt arī attēlu veidā. Att. 21 parādīti veselas ādas fluorescentie attēli eksperimentos ar krustveida maskām. Gan krustveida atveres, gan necaurspīdīga krusta gadījumos pie abiem lāzera viļņu garumiem fluorescences intensitāte no iepriekš ekranētajiem ādas apgabaliem bija augstāka, nekā no apkārtējiem iepriekš apstarotajiem ādas rajoniem.





Att. 21. Ādas AF intensitātes sadalījuma attēli eksperimentos ar krustveida maskām:  
 a – fluorescences attēls ar caurlaidīga krusta masku pie 405 nm apstarojuma, b – tā paša ādas apgabala fluorescences attēls bez maskas, kas iegūts 24 stundas pēc apstarošanas. c – fluorescences attēls ar necaurlaidīga krusta masku pie 532 nm apstarojuma, d – tā paša ādas apgabala fluorescences attēls bez maskas, kas iegūts 24 stundas pēc apstarošanas.

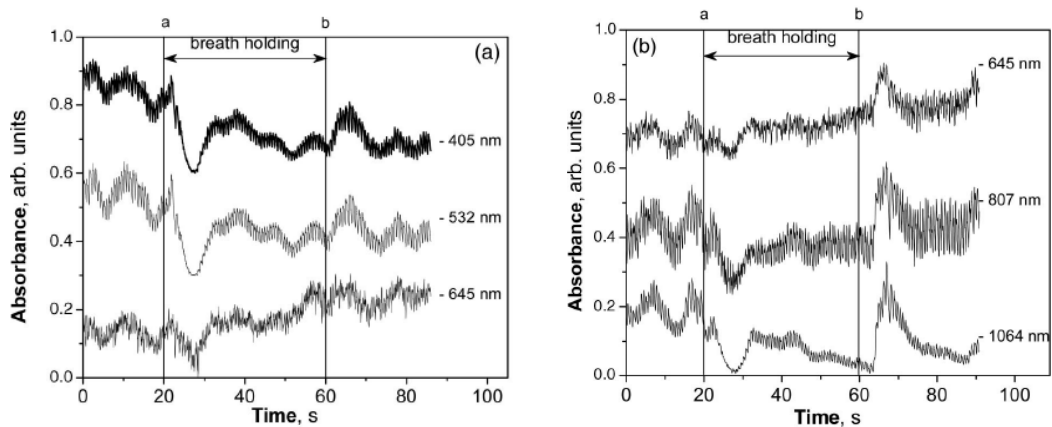
#### Rezumējums:

1. Konstatēts, ka veselas ādas AF intensitātes atjaunošanās pēc apstarojuma nenotiek uzreiz, bet ir ilgtermiņa process – tāpat ādai piemīt „foto-atmiņas” efekts.
2. Eksperimentāli nodemonstrētas *in-vivo* ādas „foto-atmiņas” efekta izpausmes gan pēc lokāla punktveida apstarojuma, gan pēc ar maskām aizsegtu ādas virsmu apstarojuma ar zemas jaudas 405 nm un 532 nm lāzeriem

Detalizēts 5.3. nodaļā sniegto rezultātu apraksts atrodams publikācijā [I].

#### 4.4. Asins pulsāciju detektēšana dažāda dziļuma vaskulāros slāņos elpas aiztures un zondes spiediena testos

##### 4.4.1. Kotaktzondes elpas aiztures testi.



Att.22. Multispektrālie PPG signāli elpas aiztures testā laikā. PPG signāli iegūti vienlaicīgi detektējot pie trīs viļņa garumiem: (a) redzamajā spektra daļā un (b) sarkanajā un tuvajā infrasarkanajā.

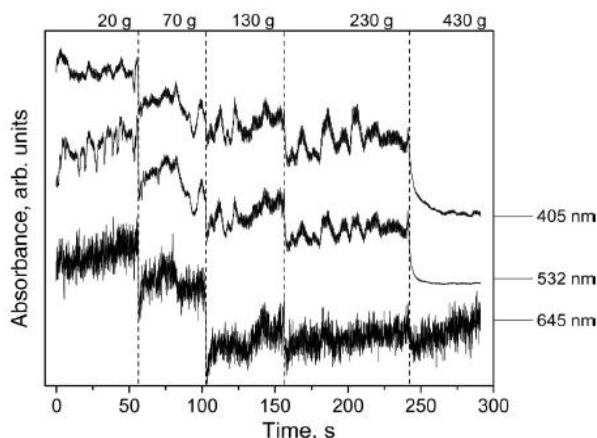
Att.22 (a). ir attēloti multispektrālie PPG signāli redzamajā un infrasarkanajā spektra diapazonā elpas aiztures testos. Visi PPG signāli tika normalizēti uz maksimālo vērtību un attēlos ir novietoti viens virs otra, lai

ērtāk varētu tos salīdzināt. Galveno informāciju šeit sniedz PPG signālu DC komponentes izmaiņu raksturs. PPG AC signālu formas testu laikā būtiski neatšķiras no izmēritajām pirms un pēc elpas aiztures.

Salīdzinot trīs redzamo lāzeru viļņu garumu signālus (Att. 22. (a)) var konstatēt gandrīz identiskas PPG signālu izmaiņas pie seklas starojuma iespiešanās (405 nm un 532 nm) elpas aiztures periodā. „Dziļāku” PPG signālu (pie 645 nm) DC komponentei galvenie maksimumi un minimumi visumā sakrīt ar pārējo divu viļņu garumu signāliem, tomēr elpas aiztures perioda otrajā pusē vērojams straujāks pieaugums.

Sarkanās-infrasarkanās spektra daļas PPG signāli ir parādīti Att.22.(b) Var konstatēt, ka PPG signāli pie 645 nm un 807 nm ir ļoti līdzīgi, abiem vērojams DC komponentes pieaugums elpas aiztures perioda beigās. Savukārt pie 1064 nm, kad vidējais iespiešanās dziļums ādā sasniedz ~ 1.7 mm, DC vērtība šajā laikā samazinās. Novērotās atšķirības norāda uz atšķirīgiem fizioloģiskiem mehānismiem ādas asinsapgādē dažāda dziļuma vaskulāros slāņos ierobežotas skābekļa apgādes apstākļos.

#### 4.4.2. Kontaktzondes spiediena testi.



Att.23. Multispektrālie PPG signāli pie trīs viļņu garumiem zondes spiediena testos.

Multispektrālo PPG signālu atbildes reakcijas uz pakāpeniski palielinātu kontaktzondes spiedienu pie trīs viļņu garumiem ir ilustrētas Att.23. Kontaktzondes spiediena palielināšana izraisīja visu reģistrēto PPG signālu DC amplitūdas samazināšanos visiem brīvprātīgajiem. Tas skaidrojams ar kopējā asins tilpuma samazināšanos zondes darbības zonā, pieaugot ārējam spiedienam. Pulsāciju (AC komponentes) izžušana 405 nm un 532 nm signālos pie 430 g slodzes liecina par virsējo ādas kapilāru pilnīgu oklūziju, kamēr dziļākos slāņos (645 nm) pulsācijas turpinās.

Tika iegūtas PPG signālu atkarības no kontaktzondes spiediena arī 645/807/1064 nm kombinācijā, kā arī salīdzinātas 10 personu individuālās PPG signālu reakcijas uz zondes spiediena izmaiņām. Šie rezultāti ir aprakstīti darbos [III, X].

#### Rezumējums:

1. Iegūti pirmie eksperimentālie dati par ādas asins pulsāciju izmaiņām dažāda dziļuma vaskulāros slāņos elpas aiztures un zondes spiediena testos, vienlaicīgi reģistrējot remisijas PPG signālus pie dažādiem lāzeru viļņu garumiem spektra diapazonā 405 nm - 1064 nm.
2. Testu laikā konstatētas fizioloģisko reakciju atšķirības dažāda dziļuma ādas vaskulārajās slāņos.

Detalizēts 5.4. nodaļā sniegto rezultātu apraksts atrodams publikācijās [III,IV,IX,X]

## 5. Rezultātu analīze un secinājumi

1. Darba rezultāti pierāda ādas autofluorescences fotoizbalēšanas parametru (īpaši „ātrās” izbalēšanas laika  $\tau_1$  pie 532 nm ierosmes) potenciālu izmantošanai klīniskajā diagnostiskā kā papildus kritēriju pigmentēto patoloģiju kvantitatīvam novērtējumam. Rezultāti liecina, ka paaugstināts melanīna saturs ādā bremzē fotoizbalēšanas procesu zaļajā (532 nm) ierosmē, savukārt violetajā (405 nm) ierosmē šāda korelācija nav tik izteikta. Tam par iemeslu varētu būt zaļā starojuma dziļāka iespiešanās ādā zem epidermas slāņa, kurā koncentrēts melanīns, līdz ar to izkliedes procesos melanīns vairāk absorbē šo starojumu un emitējošo fluoroforu ierosmes intensitāte tāpēc samazinās. Zemākai ierosmes intensitātei, kā noskaidrots agrāk [19], atbilst ilgāks fotoizbalēšanas laiks. Perspektīvā šī metodika varētu tikt izmantota ādas melanīna koncentrācijas novērtējumam, kas būtu īpaši noderīgi agrīnai melanomu diagnostikai.
2. Jaunizstrādātā AF fotoizbalēšanas parametru attēlošanas metodika devusi iespēju konstatēt, ka AF fotoizbalēšanas laika parametri nav homogēni sadalīti veselas ādas virsmā un ādas patoloģijās. Analizējot iegūtos parametriskos attēlus var secināt, ka ādas fluorohromas ar līdzīgiem AF fotoizbalēšanas parametriem grupējas nelielos ( $< 1 \times 1 \text{ mm}^2$ ) „graudos” jeb klasteros, nevis ir vienmērīgi sadalītas pa ādas virsmu. Klasteros apvienotās fluorohromas varētu būt ar līdzīgu ķīmisko sastāvu vai struktūru, bet tam ir nepieciešami turpmāki pētījumi. Tomēr piedāvātajai attēlošanas metodei nākotnē varētu būt pielietojams tieši ādas fluorohromu identificēšanai pēc AF fotoizbalēšanas laikiem.
3. Darbā konstatētais un ilustrētais ādas „foto-atmiņas” efekts, kas izpaužas kā pazemināta AF intensitāte pēc iepriekšējas apstarošanas ar zemas jaudas lāzeru, liecina par ilgtermiņa ādas fluorohromu īpašību izmaiņām. Šo izmaiņu mehānisms varētu būt līdzīgs kā ādas iedeguma mehānisms – apstarojuma rezultātā epidermā, iespējams, sākas aizsargreakcija un paaugstinās melanīna koncentrācija, kura absorbcijas rezultātā vājinās fluoroforu ierosmes intensitāte un līdz ar to arī emisijas intensitāte. Ilgstošā vairāku dienu periodā nesaņemot papildus apstarojumu, ādas struktūra atkal atjaunojas (līdzīgi, kā pamazām zūd ādas iedegums). Jebkurā gadījumā, „foto-atmiņas” efekts liecina par *in-vivo* ādas strukturālām izmaiņām ļoti vāja apstarojuma rezultātā. Ņemot vērā, ka pētījumos izmantotie lāzeru jaudas blīvumi un apstarojuma dozas bija krietni zem Eiropas ādas lāzeru drošības standarta sniegtajām „drošajām” vērtībām, šajā darbā iegūtie rezultāti varētu būt par pamatu standarta normatīvu pārskatīšanai.
4. Ādas AF fotoizbalēšanas mehānisms līdz galam pagaidām nav noskaidrots, tomēr tam ir izvirzītas vairākas hipotēzes:
  - a) Zemas jaudas lāzera starojums izraisa tiešu ādas fluorohromu (piemēram, porfirīnu) degradāciju; samazinoties emitējošo fluorohromu koncentrācijai, attiecīgi vājinās arī emisijas intensitāte.
  - b) Zemas jaudas lāzera starojums izraisa virsmas fotoķīmiskas reakcijas, piemēram, fotooksidācijas procesu ar skābekļa aktīvo formu izdalīšanos, kuri savukārt noved pie fluorohromu destrukcijas un AF intensitātes samazināšanās.
  - c) Zemas jaudas lāzera starojuma iedarbībā, līdzīgi kā UV starojuma iedarbībā, ādā papildus producējas melanīns, rezultātā absorbcija ādā pieaug un fluoroforu ierosmes efektivitāte samazinās, kas savukārt noved pie AF intensitātes krituma. Šī hipotēze daļēji korelē ar iegūtajiem rezultātiem, jo 532 nm ierosmē AF fotoizbalēšana vispār netika konstatēta VI (negroīdu) ādas fototipam un hiperpigmentātajam nēvusam.
5. Jaunizstrādātā multispektrālās remisijas PPG metodika paver iespējas izsekot fizioloģisko testu izraisītām ādas mikrocirkulācijas reakcijām vienlaikus vairākos dažāda dziļuma vaskulāros slāņos. Šādas izmaiņas attiecībā uz PPG signālu DC komponenti tika konstatētas gan elpas aiztures, gan kontaktzondes spiediena testos. Šī metodika varētu būt noderīga arī ādas diagnostikai – piemēram, nosakot ādas rekapilarizācijas laiku pēc spiediena oklūzijas vai salīdzinot dažāda dziļuma pulsācijas veselā un patoloģiskā ādā. Lai to panāktu, nepieciešams uzlabot PPG signālu reģistrācijas jūtību; matricu spektrometra iespējas šajā darbā tika izmantotas pilnībā, bet signāla/troksņa attiecība daudzos gadījumos izrādījās nepietiekama PPG signālu formas analīzei.

## 6. Aizstāvēšanai izvirzītās tēzes

1. Izstrādātas un eksperimentāli aprobētas trīs jaunas metodikas *in-vivo* ādas parametru raksturošanai nepārtrauktā zemjaudas lāzeru ierosmē – (i) autofluorescences fotoizbalēšanas laiku integrāliem mērījumiem no fiksēta ādas rajona, (ii) fotoizbalēšanas laiku virsmas sadalījuma parametriskai attēlošanai un (iii) vienlaicīgai ādas asinsrites pulsāciju detektēšanai dažāda dziļuma vaskulāros slāņos.
2. Veikti sistemātiski *in-vivo* ādas autofluorescences fotoizbalēšanas efekta pētījumi nepārtrauktā zemas jaudas lāzeru ierosmē pie dažādiem viļņu garumiem (405 nm, 532 nm) visiem sešiem ādas fototipiem. Konstatēta fotoizbalēšanas laika  $\tau_1$  saistība ar melanīna koncentrāciju ādā. Pierādīts, ka paaugstināts melanīna saturs ādā (t.sk. pigmentētās ādas patoloģijās) palēnina fotoizbalēšanas procesu.
3. Izstrādāta un aprobēta oriģināla ādas autofluorescences fotoizbalēšanas parametru  $\tau_1$  un  $\tau_2$  attēlošanas metodika. Konstatēts šo parametru specifisks sadalījums gan ādas patoloģijās, gan uz veselas ādas un naga virsmas.
4. Eksperimentāli pierādīts dzīvas ādas „foto-atmiņas” efekts pēc nepārtraukta zemas jaudas ( $< 1 \text{ mW/mm}^2$ ) lāzeru 405 nm un 532 nm apstarojuma. Efekts izpaužas kā pazeminātas intensitātes autofluorescence no iepriekš apstarotiem dzīvas ādas apgabaliem. Apstarotas ādas fluorescences īpašības atjaunojas lēni, vairāku dienu garumā.
5. Iegūti pirmie salīdzinošie dati par dažāda dziļuma asinsvadu pulsācijām, tās detektējot vienlaicīgi ar multispektrālās fotopletizmografijas metodi. Konstatētas dažādu viļņu garumu PPG signālu raksturīgas atšķirības elpas aiztures un kontaktzondes spiediena testos.

## 7. Promocijas darba publikāciju kopa

- I. A. Lihachev, J. Lesins, D. Jakovels, J. Spigulis. *Low power cw-laser signatures on human skin*. Quantum Electronics, Vol. 12, Dec. 2010 (in press).
- II. J. Spigulis, A. Lihachev, and R. Erts. *Imaging of laser-excited tissue autofluorescence bleaching rates*, Applied Optics, Vol. 48, Issue 10, 2009, pp. D163-D168.
- III. J. Spigulis, L. Gailite, A. Lihachev, R. Erts. *Simultaneous recording of skin blood pulsations at different vascular depths by multi-wavelength photoplethysmography*, Applied Optics, Vol. 46, Issue 10, 2007, pp. 1754-1759.
- IV. L. Gailite, J. Spigulis, A. Lihachev. *Multilaser photoplethysmography technique*, Lasers in Medical Science, Vol. 23, 2007, pp. 189-193.
- V. A. Lihachev, J. Spigulis. *Skin autofluorescence fading at 405/532 nm laser excitation*, IEEE Xplore, 10.1109/NO, 2007, 63-65.
- VI. A. Lihachev, J. Spigulis. *Skin autofluorescence: intensity fading at 405 nm and 532 nm laser excitation*, Latvian Journal of Physics and Technical Sciences, No. 2(II), 2006, pp. 116-120.
- VII. I. Kuzmina, A. Lihachev, L. Gailite, J. Spigulis. *Compact multi-functional skin spectrometry set-up*, Proc. SPIE, Vol. 6596, 2007, pp. 6596OT1-6596OT6.
- VIII. J. Spigulis, A. Lihachev, L. Gailite, R. Erts. *Novel laser technologies for human skin in-vivo assessment*, Proc. SPIE, Vol. 7022, 2008, pp. 70220N-70220N-6.
- IX. J. Spigulis, L. Gailite, A. Lihachev. *Multi-wavelength photoplethysmography for simultaneous recording of skin blood pulsations at different vascular depths*, Proc. SPIE, Vol. 6430, 2007, pp. 64301I-1 - 64301I-6.
- X. J. Spigulis, L. Gailite, A. Lihachev. *Contact probe pressure effects in skin multi-wavelength photoplethysmography*, Proc. SPIE, Vol. 6628, 2007, pp. 66281F-1 – 66281F-8.

## 8. Ziņojumi starptautiskās konferencēs (tēzes)

1. Kuzmina, L. Gailite, A. Lihachev, J. Spigulis. *Diffuse reflectance spectroscopy of skin pathologies*, Abstr. 13th Nordic-Baltic Conf. on Biomed. Eng. Med. Phys, Umea (SE), pp. 184-185, 2005.
2. J. Spigulis, L. Gailite, A. Lihachev. *Multi-spectral reflection photoplethysmography: potential for skin microcirculation assessment*, OSA 2006 Biomedical Optics conf., Fort Lauderdale (USA), 2006.
3. A. Lihachev, J. Spigulis. *Skin autofluorescence fading at 405/532 nm laser excitation*, Abstr. 3rd Int. Conf. NO-2006, Bergen (NO), p.143, 2006.
4. I. Kuzmina, A. Lihachev, L. Gailite, J. Spigulis. *Compact multi-functional skin spectrometry set*, Abstr. Int. Conf. AOMD-5, Vilnius (LT), p. 55, 2006.
5. J. Spigulis, A. Lihachev, L. Gailite, R. Ertis. *Novel laser technologies for human skin in-vivo assessment*. Abstr, Int. Conf. ALT-2007, Levi (FIN), p. 95, 2007.
6. A. Lihachev, J. Spigulis. *The fluorescence fading effect of human skin and inanimate materials during continuous laser irradiation*, Abstr. Int. Conf. LALS-2007, Moscow (RU), p. 32, 2007.
7. A. Lihachev, U. Rubins, R. Ertis, J. Spigulis. *Imaging of the laser-excited skin fluorescence fading*, Abstr. Int. Conf. SFM-07, Saratov (RU) p. 43, 2007.
8. A. Lihachev, J. Spigulis. *Imaging of laser-excited skin autofluorescence fading rate*, Abstr, 14th Nordic-Baltic Conf. Biomed. Eng. Med. Phys., Riga (LV), p. 97, 2008.
9. A. Lihachev, R. Ertis, U. Rubins, J. Spigulis. *Method and device for imaging of fluorescence fading*, Abstr. 6th Int. Conf. AOMD-2008, Riga (LV), p. 91, 2008.
10. A. Lihachev, J. Lesins, D. Jakovels, J. Spigulis. *Low power cw-laser signatures on human skin*, Abstr. Int. Conf. LALS-2010, Oulu (FIN), p. 223, 2010.

## 9. Citētā literatūra

1. P. Apinis. *Cilvēks. Anatomija, fizioloģija, pataloģijas pamati*, Rīga, Nacionālais Medicīnas apgāds & Apgāds Jāņa sēta, 1998, lpp. 429-501.
2. H. Golster. *Regulation of microvascular blood flow*, PhD Thesis, Linköping University, 2001, pp. 9-50.
3. G. Lindberg. *Photoplethysmography*, PhD Thesis, Linköping University, 1991, pp. 9-22, 86-92.
4. J. Allen, A. Murray. *Modelling the relationship between peripheral blood pressure and blood volume pulses using linear and neural network system identification techniques*, Physiological Measurement, Vol. 20, 1999, pp. 287-301.
5. R. Anderson, J. Parrish. *The Optics of Human Skin*, Journal of Investigative Dermatology, 1981, pp. 13-18.
6. J. Boulnois. *Photophysical processes in recent medical laser developments*, Laser Medical Science, Vol. 1, 1986, pp. 47-66.
7. H. Stübel. *Die Fluoreszenz tierischer Gewebe in ultraviolettem Licht*, Pflügers Arch Physiol, Vol 142(1), 1911, pp. 1-14.
8. A. Policard. *Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinees a la lumiere de Wood*, Comptes Rendus Des Seances de la Societe de Biologie et de Ses Filiales, Vol. 91, 1924, pp. 1423-1424.
9. R. L. Lipson, J. H. Pratt, E. J. Baldes and M. B. Dockerty. *Hematoporphyrine Derivative for Detection of Cervical Cancer*, Obstetrics and Gynecology, Vol. 24, 1964, pp. 78-84.
10. M. J. Gray, R. Lipson, J. V. Maeck, L. Parker and D. Romeyn. *Use of hematoporphyrin derivative in detection and management of cervical cancer*, Obstetrics and Gynecology, Vol. 99(6), 1967, pp. 766-771.
11. H. B. Gregorie, Jr., E. O. Horger, J. L. Ward, J. F. Green, T. Richards, H. C. Robertson, Jr. and T. B. Stevenson. *Hematoporphyrin-derivative fluorescence in malignant neoplasms*, Annals of Surgery, Vol. 167(6), 1968, pp. 820-828.
12. R. L. Lipson, E. J. Baldes and M. J. Gray. *Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer*, Cancer Vol. 20(12), 1967, pp. 2255-2257.
13. J. R. Leonard and W. L. Beck. *Hematoporphyrin fluorescence: an aid in diagnosis of malignant neoplasms*, Laryngoscope Vol. 81(3), 1971, pp. 365-372.
14. G. Wagnières, A. McWilliams and S. Lam. *Lung cancer imaging with fluorescence endoscopy*, in Handbook of Biomedical Fluorescence, M.-A. Mycek and B. W. Pogue, Marcel Dekker, Inc, 2003, pp. 361-396.
15. R. Alfano, D. Tata, J. Cordero, P. Tomashefsky, F. Longo and M. Alfano. *Laser induced fluorescence spectroscopy from native cancerous and normal tissue*, Quantum Electronics, Vol. 20(12), 1984, pp. 1507-1511.
16. V. Tuchin. *Handbook of Optical Biomedical Diagnostic*, SPIE-The international Society for Optical Engineering P.O. Box10, 2002, 709-877.
17. G. Wagnieres, W. Star, B. Wilson. *In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications*, Photochemistry and Photobiology, Vol. 68(5), 1998 pp. 603-632.
18. A. A. Strattonnikov, V. S. Polikarpov, and V. B. Loschenov. *Photobleaching of endogenous fluorochroms in tissues in vivo during laser irradiation*, Proc. SPIE, Vol. 4241, 2001, pp. 13-24.
19. H. Zeng, C. E. MacAulay, B. Palcic, and D. I. McLean. *Laser induced changes in autofluorescence of in-vivo skin*, Proc. SPIE, Vol. 1882, 1993, pp. 278-290.
20. D. Yova, V. Hovhannisyann and T. Theodossiou. *Laser Induced Photobleaching of Collagen*, Medical & Biological Engineering & Computing, Vol. 37, 1999, 304-305.
21. E. V. Salomatina and A.B. Pravdin. *Fluorescence dynamics of human epidermis (ex vivo) and skin (in vivo)*, Proc. SPIE, Vol. 5068, 2003, pp. 405-410.
22. A.B. Рябова, A.A. Стратонников, В.Б. Лошенов. *Лазерно-спектроскопический метод оценки эффективности фотосенсибилизаторов в биологических средах*, Квантовая Электроника, Том 36, № 6, 2006, с. 562-568.
23. T. Johansson, M. S. Thompson, M. Stenberg, C. Klinteberg, S. Andersson-Engels, S. Svanberg, and K. Svanberg. *Feasibility Study of a System for Combined Light Dosimetry and Interstitial Photodynamic Treatment of Massive Tumors*, Applied Optics, Vol. 41, Issue 7, 2002, pp. 1462-1468.
24. M. S. Thompson, A. Johansson, T. Johansson, S. Andersson-Engels, S. Svanberg, N. Bendsoe, and K. Svanberg. *Clinical system for interstitial photodynamic therapy with combined on-line dosimetry measurements*, Applied Optics, Vol. 44, Issue 19, 2005, pp. 4023-4031.
25. M.E. Darvin, N.N. Brandt, J. Lademann. *Photobleaching as a method of increasing the accuracy in measuring carotenoid concentration in human skin by Raman spectroscopy*, Optics and Spectroscopy, Vol. 109(2), 2010 pp. 205-210.
26. Тучин В.В. *Оптическая биомедицинская диагностика*, Москва: Физматлит, Т. 2., 2007, с. 77.
27. Safety of laser products –Part 1: Equipment classification and requirements, 2007, IEC 60825-1.

28. H. Ugnell and P. Å. Öberg. *Time variable photoplethysmographic signal: its dependence on light wavelength and sample volume*, Proc. SPIE, Vol. 2331, 1995, pp. 89–97.
29. R. Anderson, J. Parrish. *Optical properties of human skin*, Journal of Investigative Dermatology, 1981, Vol. 77, pp. 13-19.
30. E. Kohen, R. Santus, and J. G. Hirschberg. *Photobiology*, Academic, 1995, p. 308.
31. A. Johansson. *Photoplethysmography in multiparameter monitoring of cardiorespiratory function*, Ph.D. thesis, Linköping University, 2000, pp. 23.
32. L. G. Lindberg and P. Å. Öberg. *Photoplethysmography. Part 2. Influence of light source wavelength*, Medical & Biological Engineering & Computing, Vol. 29, 1991, pp. 48–54.
33. J. R. Hales, R. G. Roberts, R. A. Westerman, F. R. Stephens, and A. A. Fawcett. *Evidence for skin microvascular compartmentalization by laser-Doppler and photoplethysmographic techniques*, International Journal of Microcirculation-Clinical and Experimental, Vol. 12, 1993, pp. 99–104.
34. M. Sandberg, T. Lundeberg, L. G. Lindberg, and B. Gerdle. *Effects of acupuncture on skin and muscle blood flow in healthy subjects*, European Journal of Applied Physiology, Vol. 90, 2003, pp. 114–119.
35. J. Kraitl, H. Ewald and H. Gehring. *An optical device to measure blood components by a photoplethysmographic method*, Journal of Optics A: Pure and Applied Optics, Vol. 7, 2005, p.318.
36. J. Allen. *Photoplethysmography and its application in clinical physiological measurement*, Physiological Measurements, Vol. 28, 2007, pp. 28:R1-R39.
37. Y. Mendelson. *Pulse oximetry: theory and applications for noninvasive monitoring*, Clinical Chemistry, Vol. 38, 1992, pp. 1601-1607.
38. S. Fantini, M. A. Franceschini, J. S. Maier, S. A. Walker, B. Barbieri, and E. Gratton. *Frequency-domain multichannel optical detector for noninvasive tissue spectroscopy and oximetry*, Optical Engineering, Vol. 34, 1995, pp. 32-42.



## Pateicības

Ļoti, ļoti liela pateicība profesoram Jānim Spīgulim par promocijas darba vadīšanu, atbalstu, iedvesmu un milzīgo palīdzību visos darbā etapos.

Liela pateicība Renāram Ertam un Uldim Rubīnam par palīdzību programmatūras izstrādē.

Liela pateicība Jānim Lesiņam par palīdzību eksperimentu veikšanā un datu apstrādē.

Paldies Ilonai Kuzminai, Lāsmai Gailītei, Dainim Jakovēlam un Lāsmai Asarei par palīdzību eksperimentu veikšanā un datu apstrādē.

Paldies visiem LU Atomfizikas un spektroskopijas institūta darbiniekiem par atbalstu.

Paldies maniem vecākiem un radiniekiem par atbalstu.

Šis darbs ir izstrādāts ar Latvijas Universitātes (projekts „Sirdsdarbības un asinsrites optiskā monitoringa metodes un ierīces”), Latvijas zinātnes padomes (projekts „Optiskās metodes bioprocesu ‘in vivo’ kontrolei”), Valsts pētījumu programmas (projekts “Modernu funkcionālu materiālu mikroelektronikai, nanoelektronikai, fotonikai, biomedicīnai un konstruktīvo kompozītu, kā arī atbilstošo tehnoloģiju izstrāde”), Eiropas reģionālās attīstības fonda (projekts, „Informācijas tehnoloģijas asinsrites un sirdsdarbības kontrolei”) un Eiropas sociālā fonda (projekti „Doktorantu un jauno zinātnieku pētniecības darba atbalsts Latvijas Universitātē un „Atbalsts doktora studijām Latvijas Universitātē”) finansiālo atbalstu.

