

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
FIZIKAS UN MATEMĀTIKAS FAKULTĀTE
FIZIKAS NODAĻA

**OPTISKĀS METODES ASINSVADU DZĪŠANAS
NOVĒRTĒJUMAM UN MONITORINGAM**

MAĢISTRA DARBS

Autors: Rita Benta

Studenta apliecības Nr.: rb11084

Darba vadītājs: Dr. Phys. Aleksejs Ļihačovs

RĪGA 2016

ANOTĀCIJA

Maģistra darba mērķis ir izpētīt artērijas ar ICG/hitozāna plāksteri fluorescences un difūzā refleksijas intensitātes spektrus iedarbības vietās ar lāzera iedarbību un bez.

Operācijām uz artērijas piemīt sava sarežģītība tādēļ, ka artērijas diametrs ir mazs, tāpēc aizsūt artērijas griezumu nav tik vienkārši. Tādēļ tika izgudrots hitozāna/ICG plāksteris, ja uz to iedarbojas ar 810 nm lāzeri, notiek plākstera adhēzija ar artēriju. Lai veiktu operāciju, ir jāizvēlas pareizā lāzera iedarbības doza uz plāksteri. Šajā nolūkā tika izpētīti autofluorescences intensitātes spektri, ICG fluorescences intensitātes spektri tuvajā infrasarkanajā diapazonā, un paraugu difūza atstarošana. Rezultātā tika konstatēts, ka autofluorescence labāk atspoguļo sakausēšana vietas ar lāzeri.

Atslēgvārdi: ICG, Hitozāns, Autofluorescence, Fluorescence, Difūza atstarošana, Artērija.

ABSTRACT

The aim of this work is to study the intensity of the fluorescence and diffusion reflection from artery with a ICG/chitosan patch with and without the laser treatment.

The medical operation on the artery is a complex process due to the small diameter of a vessel, therefore it is not so easy to connect two ends of artery. For this purpose a medical patch was developed (chitosan/ICG), which adheres to the outer surface of the artery after the irradiation with 810nm laser. Choosing the optimal dose of the laser is crucial for successful operation. Were studied autofluorescence and ICG fluorescence spectra in near infra-red part of the spectrum and diffusion reflection of patch was observed. By analysing autofluorescence images of the samples one can easily observe the laser irradiated spots.

Keywords: ICG, Chitosan, Autofluorescence, Fluorescence, Diffuse reflection, Artery.

Satura rādītājs

ANOTĀCIJA	2
ABSTRACT	3
Apzīmējuma saraksts	5
IEVADS	6
1. ANALĪTISKĀ APSKATA DAĻA	7
1.1. Audi un tās mijiedarbība ar gaismu.....	7
1.1.1. Artērijas uzbūve	7
1.1.2. Audu vienkāršots optiskais modelis.....	10
1.2. Ādas autofluorescence.....	14
1.2.1. Fluorescence.....	14
1.2.2. Autofluorescence.....	17
1.2.3. Difūza atstarošana	19
1.3. Tuvais IS	19
1.4. Asinsvadu dzišana	20
1.4.1. Hitozāns.....	20
1.4.2. Indocyanine Green (ICG).....	22
1.4.3. Plākstera sastāvdaļas, novietošana un sakausešana.....	23
2. PĒTNIECISKĀ DAĻA	26
2.1. Paraugi.....	26
2.2. Rezultātu iegūšana un izmantojamās aparatūras apraksts	27
2.2.1. Multispektrālā attēlošanas sistēma <i>Nuanc eEX</i>	27
2.2.2. ICG makro attēlošana.....	32
3. PĒTĪJUMA REZULTĀTU APSKATS	33
3.1. Autofluorescence.....	33
3.2. ICG fluorescence.....	37
3.3. Difūza atstarošana	38
3.4. ICG makro attēlošana.....	43
3.5. Autofluorescences intensitātes izmaiņas nepārtrauktās ierosmes laika.....	44
Secinājumi un rekomendācijas.....	46
Izmantotās literatūras un interneta avotu saraksts.....	47
Pielikumi	50

Apzīmējuma saraksts

ICG – indocyanine green;

μ_a – absorbcijas koeficients;

μ_s – izkliedes koeficients;

g – anizotropijas factors;

l_{tr} – fotonu noskrējiena videjais garums;

I – intensitāte;

R – atstarošanas koeficients;

μ_t – ekstinkcijas koeficients;

z – parauga biezums;

n – laušanas koeficients;

λ – viļņa garums;

$p(s, s')$ – izkliede fazu funkcija;

Ω – telpiskais leņķis;

d – slaņa biezums;

$\Phi(r)$ – izejoša starojuma sadalījuma funkcija;

E – enerģija;

h – Planka konstante;

ν – frekvence;

t – laiks;

η_F – fluorescences kvantu iznākums;

N – fotonu daudzums;

c_{ab} – absorbējošo molekulu koncentrācija;

ϵ_λ – ekstinkcijas molārais koeficients;

PBS - Nātrija fosfāta buferis.

IEVADS

Mūsdienu medicīnas tehnoloģijas balstās uz fizikas, matemātikas, ķīmijas un bioloģijas pētījumiem. Labs piemērs ir sasniegumi medicīnas tomogrāfijas jomā: piemēram, datoru rentgena tomogrāfija un magnētiskās rezonanses vizualizācija, kas ļauj iegūt anatomisku informāciju ar lielu izšķirtspēju divās un trīs dimensijās. Ievērojamas perspektīvas no iekārtu drošības, vienkāršības un drošuma, kā arī ticamas informācijas par fizioloģiskajiem procesiem iegūšanas viedokļa ir optiskajai difūzajai tomogrāfijai un optiskajai koherentajai tomogrāfijai. Vēl viens ne mazāk svarīgs faktors attiecas uz lāzertehnoloģiju attīstību un vēža un citu saslimšanu atklāšanu. Šajā metodē lāzeru izmantošana medicīniskos pētījumos ir balstīta uz plaša parādību loka izmantošanu, kas saistītas ar dažādiem gaismas mijiedarbības efektiem ar bioloģiskiem objektiem [1].

Tādiem bioaudiem kā, piemēram, ādai, acīm un artērijām piemīt īpašības optisko starojumu absorbēt, izkliedēt, atstarot u.tml. Tāpēc ar optiska starojuma iedarbības uz bioaudiem palīdzību var veikt bioaudu stāvokļa vai sastāva analīzi. Tehnoloģijas, kas balstīta uz gaismas mijiedarbību uz bioaudiem, attīstās ātri. Ar medicīnas tehnoloģijas izpēti un izstrādi nodarbojas Latvijas Universitātes Atomfizikas un Spektroskopijas Institutā, kur tika veikti tādi pētījumi, kā: melanīna, hemoglobīna, fluorescences izmaiņas u.c. Bet šajā darbā veiksīm artērijas paraugu analīzi, kurai uzklāts plāksteris, lai nodrošinātu blīvu anastomozi pēc operācijas, kas veikta uz žurkas miega artērijas. Izanalizēsīm paraugu fluorescences un difūzijas atstarošanas spektrālās īpašības, lai izprastu, vai lāzera jauda un ekspozīcija ir pareizi izvēlēta plākstera efektīvai adhēzijai ar artēriju.

Darba mērķis - izpētīt artērijas ar ICG/hitozāna plāksteri fluorescences un difūzijas atstarošanas spektrus iedarbības vietās ar lāzeri un vietās, kur lāzera iedarbības nebija.

Lai sasniegtu darba mērķi, tika uzstādīti šādi uzdevumi:

1. Izpētīt literatūru par krāsvielas indocianīnzaļā (ICG), hitozāna un artērijas optiskajām īpašībām;
2. Izveidot eksperimentālo stendu paraugu autofluorescences, ICG fluorescences un difūzās atstarošanas spektrālo īpašību izpētei un vizualizācijai;
3. Uzņemt un izanalizēt paraugu autofluorescences, ICG fluorescences un difūzās atstarošanas spektrus redzamajā un tuvajā infrasarkanajā;
4. Piedāvāt metodi vai risinājumu asinsvadu dzīšanas monitoringam izmantojot optiskās metodes.

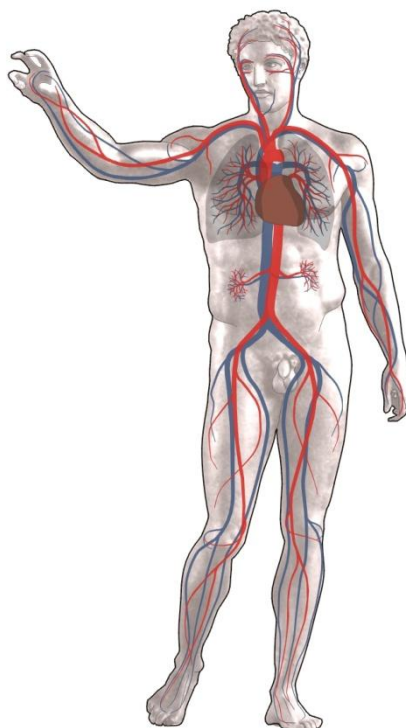
1. ANALĪTISKĀ APSKATA DAĻA

1.1. Audi un tās mijiedarbība ar gaismu

Bioaudi, tāpat kā citi audi mijiedarbojas ar optisko starojumu, tikai starojuma mijiedarbībai ar šādu vidi ir sarežģīts raksturs, jo bioaudi ir daudzslāņu vide ar dažādu skaitu komponentiem. Tai arī ir raksturīgi fiziski procesi mijiedarbībā ar optiska starojuma viļņiem kā, piemēram, atstarošanās, absorbcija un izkliede.

1.1.1. Artērijas uzbūve

Pie bioaudiem pieder arī asinsvadi. Ķermenis tiek apgādāts ar asinīm pa daudziem asinsvadiem. Asinsvadi kopā veido asinsrites sistēmu. Piemēram, 1.attēlā ir ilustrēta cilvēka asinsrites sistēma, kur ar sarkano krāsu ir apzīmētas arteriālās asinis un ar zilo- venozās.

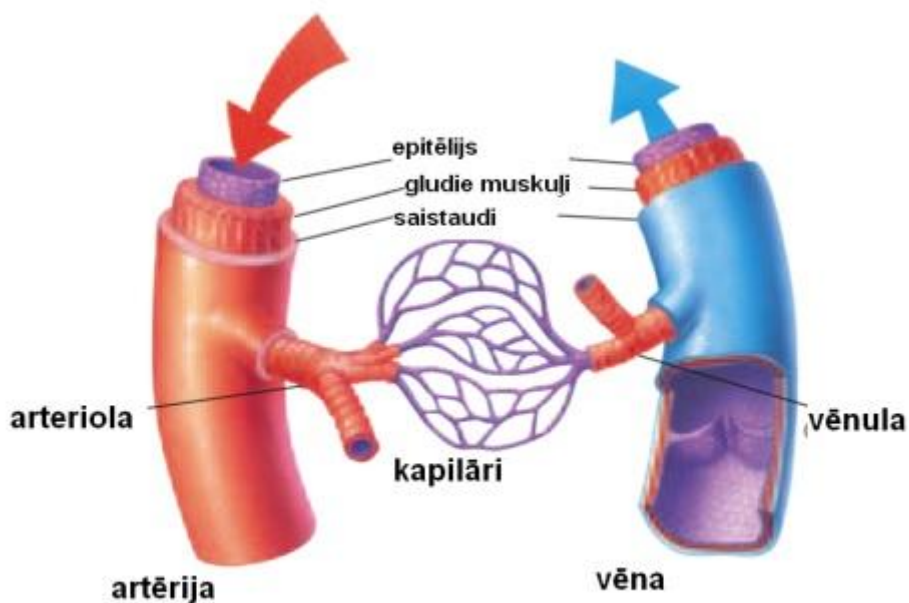


1.att. Cilvēka asinsrites sistēma[2]

Kopumā asinsvadus var iedalīt trīs pamatgrupās: artērijas, vēnas un kapilāri [3]. Visi asinsvadi sastāv no trim slāņiem (skatīt 2. un 3.att.):

- Asinsvada sienīņu **iekšējo slāni** veido endotēlija šūnas, asinsvadu virsma iekšienē ir gluda, kas atvieglo asins pārvietošanos pa tiem.
- Sienīņu **vidējais slānis** nodrošina asinsvadu izturību, tas sastāv no muskuļaudiem, elastīna un kolagēna.

- Asinsvada sieniņu **viršējo slāni** veido saistaudi, tas atdala asinsvadus no apkārtējiem audiem[4].



2.att. Asinsvadi un to uzbūve [6]

Vēnas

Vēnas ļauj asinīm satecēt atpakaļ uz sirdi. Tām ir raksturīgs augsts spiediens un nelielu vārstu klātbūtne, kuri palīdz asinīm virzīties tikai uz sirdi. Pēc tam, kad ķermeņa orgāni un ekstremitātes ir izmantojušas asinīs esošo skābekli, tās pa venozo sistēmu atgriežas uz sirdi.

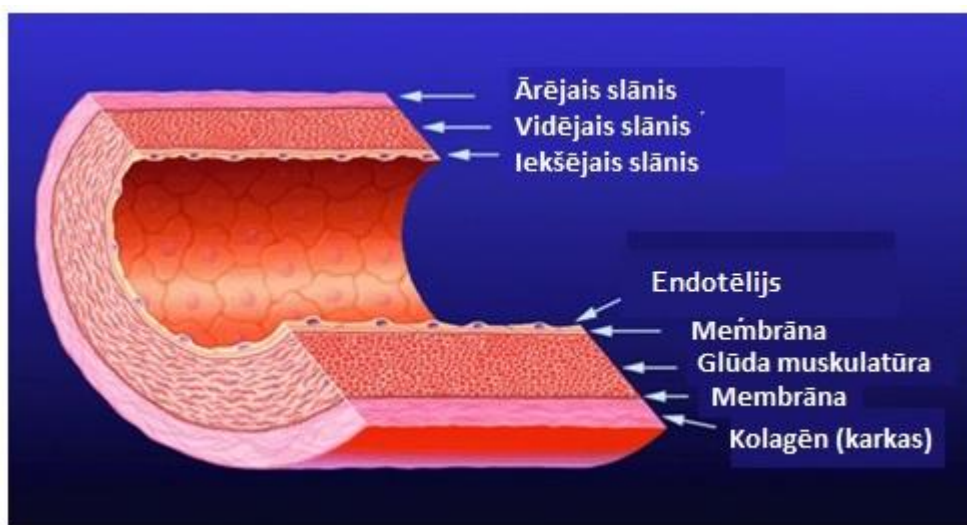
Kapilāri

Kapilāri ir vissīkākākie ķermeņa asinsvadi. Tie ir ļoti smalki, to sieniņu biezums ir tikai viena šūna. Tie ar smalku tīklu caurauž visus orgānus un audus un ļauj realizēt vielmaiņu starp audiem un asinīm. Tāpēc kapilāri ir ļoti svarīgi skābekļa un oglekļa dioksīda, kā arī barības vielu un organisma dzīvības procesu galaproduktu transportēšanas procesā [3].

Artērijas

Artērijas ir asinsvadi, kuri transportē ar skābekli bagātinātās asinis no sirds uz audiem un orgāniem. Tās ir kanāli, kas pēc būtības ir elastīgas caurulītes, kuras var paplašināties vai sašaurināties (līdz ar to palielinot vai samazinot uz orgānu nogādājamo asiņu daudzumu) nervu impulsu ietekmē atkarībā no tā, vai orgāns ir aktīvs vai atrodas miera stāvoklī. Artērijas ir elastīgas, pateicoties tam tās var izturēt augstu spiedienu[5].

Artēriju sienīgas veido trīs slāņi — ārējais, vidējais un iekšējais.



3.att. Artērijas uzbūve [5]

Ārējais slānis galvenokārt ir irdeni saistaudi, kas satur kolagēna šķiedras. Pateicoties šīm šķiedrām, tiek realizēta aizsardzības, izolējošā un fiksējošā funkcija. Artēriju ārējais apvalks ietver arī asinsvadus, kas baro šo artēriju, un nervus.

Artērijas apvalka vidējā daļa galvenokārt sastāv no elastīgām šķiedrām un gludo muskuļu šūnām. Tā ir visbiežākā un atbild par artērijas diametra izmaiņu, proti, par elastīgumu, pateicoties kam artērijas izstiepjas pie katras sirds saraušanās, kas tajās sūknē asinis, bet pēc tam sašaurinās. Šo parādību dēvē par pulsu. Rezultātā asinsrites sistēma spēj izmainīt savu ietilpību atsevišķos iecirkņos kopumā, kā arī nodrošināt vienmērīgu asins pieplūdumu.

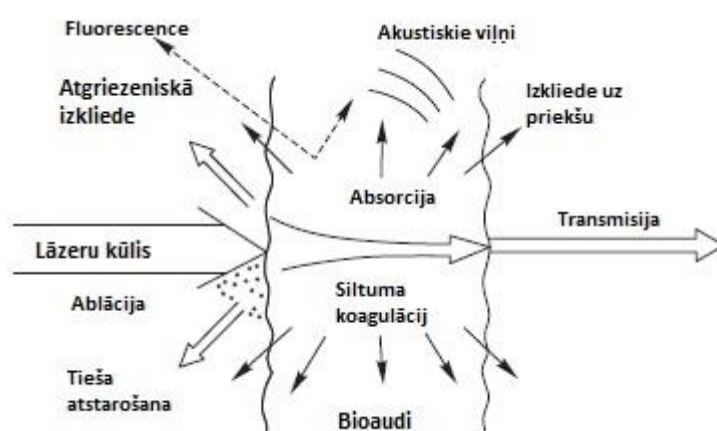
Artēriju iekšējo apvalku veido plānas plakanas endotēlija šūnas. Tajā nav savu asinsvadu, šis apvalks saņem barības vielas tieši no asinīm[5].

Artēriju sienīgas ir biežākas un izturīgākas nekā vēnām, jo asinis pa tām pārvietojas ar lielu spiedienu. Asinsspiediens ir spiediens asinsvadu iekšienē (artēriju iekšienē—arteriālais spiediens, kapilāru iekšienē—kapilārais un vēnu iekšienē - venozais) [7].

1.1.2. Audu vienkāršots optiskais modelis

Bioloģiskie audi ir optiski neviendabīgas absorbējošas vides ar lielāku vidējo laušanas rādītāju nekā gaisam, tāpēc uz robežvirsmas – bioobjekts – gaisa daļa starojuma atstarojas (Freneļa atstarošanās), bet pārējā daļa iekļūst bioaudos. Uz daudzkārtējas izkliedes un absorbcijas rēķina gaismas kūlis paplašinās un apdziest bioaudos.

Optisko starojumu bioloģiska vide var absorbēt, emitēt fluorescenci, atstarot, izkliedēt u.tml. un katrs no minētajiem procesiem nes informāciju par šīs vides mikro- un makrostruktūru, atsevišķu to sastāvdaļu kustību un formu [1].



4.att. Lāzestarojuma mijiedarbības veidi ar bioaudiem [1]

Absorbētā enerģija pārvēršas siltumā, fluorescences emisija, kā arī tērēta fotobioķīmiskajām reakcijām. Absorbcijas spektru nosaka dominējošo absorbējošo centru tips un ūdens saturs bioaudos [1].

Lāzerķirurģijā, lai veiktu sekmīgu operāciju, būtiska ir izvēlēto audu absorbējošo un izkliedējošo īpašību zināšana. Iedarbojoties ar lāzestarojumu uz stipri atstarojošām virsmām, piemēram, metāla implantiem stomatoloģijā vai ortopēdijā, svarīga loma būs laušanas rādītājam. Tā kā bioloģiskie objekti parasti ir sarežģītas un neviendabīgas struktūras, izstarojuma mijiedarbības ar bioaudiem aprakstīšanas nolūkā parasti ievieš dažādus tuvinājumus [8].

Bioloģiskie audi kā izkliedējošas vides raksturojas ar nedzidrām fiziskām sistēmām raksturīgiem efektiem. No optiskā viedokļa bioaudus (ieskaitot arī biošķidrums, proti, asinis, limfu u.c.) var iedalīt divās lielās klasēs. Pie pirmās klases var pieskaitīt stipri izkliedējošus (optiski blāvus) bioaudus, tādus kā āda, smadzenes, asinsvada sieniņas, asinis, acs cīpslene

u.t.t., kuru optiskās īpašības var tikt labi aprakstītas skalāro viļņu daudzkārtējas izkliedēšanas modeļa ietvaros nejauši-neviendabīgā vidē ar absorbciju. Pie otrās klases pieder vāji izkliedējoši (caurspīdīgi) bioaudi kā, piemēram, acs priekšējā segmenta audi (radzene, stiklveida ķermenis), kuru optiskās īpašības tiek aprakstītas vienkārtīgās (vai neliela skaita) gaismas izkliedēšanas modeļa ietvaros sakārtotas vides gadījumam ar blīvu izkliedētāju iepakojumu, kas satur absorbējošus centrus.

Starojuma izplatīšanās stipri izkliedējošās vidēs tiek labi aprakstīta starojuma pārnese teorijas ietvaros un tās dažādos tuvinājumos [9].

Starojuma pārnese teorijā jebkuru vielu un materiālu optiskās īpašības (atstarošanas, caurlaides u.t.t. koeficienti) tiek aprakstīti ar to optisko parametru starpniecību: ar absorbcijas koeficientu μ_a , izkliedes koeficientu μ_s un anizotropijas faktoru g , proti, leņķa θ , par kuru notiek fotona kustības virziena novirze no sākotnējā izplatīšanās virziena pie izkliedes akta, vidējais kosinuss. Anizotropijas faktora vērtība mainās robežās no 0 līdz 1: $g=0$ atbilst izotropās (releja) izkliedes gadījumam, $g=1$ – pilnai izklidei uz priekšu (Mi izklide uz lielām daļiņām). Izkliedētājiem, kuri veido bioloģiskos audus, šis parametrs parasti ir robežās no 0,7 līdz 0,9. Visi šie parametri (absorbcijas, izkliedes koeficienti un anizotropijas faktors) ir cieši saistīti savā starpā ar kompleksām laušanas rādītāju vērtībām un ģeometriskiem daļiņu izmēriem, kas veido pētāmo vidi.

Vāji izkliedējošu vižu gadījumā fotonu brīvā noskrējiena vidējais garums vidē tiek noteikts kā:

$$l_r = 1/(\mu_a + \mu_s) \quad (1.1)$$

Optiska starojuma izplatīšanās gadījumā stipri izkliedējošā vidē

$$l_r = 1/\sqrt{3\mu_a(\mu_a + \mu_s(1-g))} \quad (1.2)$$

[9,10].

Kolimēta (lāzera) kūļa pavājināšanās bioaudos notiek pēc eksponenciālā likuma. Izgājušās kolimētās gaismas intensitātes caur plānu audu paraugu ar ievērojamu absorbciju, salīdzinot ar izkliedi, var tikt novērtēta, pamatojoties uz Bugera-Bēra likumu:

$$I(z) = (1 - R)I_0 \exp(-\mu_t z), \quad (1.3)$$

kur R – Freneļa atstarošanas koeficients pie normālas kūļa krišanas, $R=[(n-1)/(n+1)]^2$, n – bioaudu relatīvais laušanas rādītājs; I_0 – krītošās gaismas intensitāte; $\mu_t = \mu_a + \mu_s$ – ekstinkcijas koeficients (mijiedarbības vai pavājināšanās koeficients); z – parauga biezums.

Tipisku bioaudu absorbcijas koeficientu absolūtās vērtības ir robežās 10^{-2} – 10^4 cm^{-1} . Absorbcijas koeficienti dažiem bioaudiem, izmērīti atsevišķos lāzera viļņu garumos, ir sniegti 1.1.tab.

Dažu bioaudu absorbcijas koeficienti μ_a , izmērīti atsevišķos lāzera viļņu garumos, λ [1]

Bioaudi	λ , nm	μ_a , cm^{-1}
Asinis	308	265
Cilvēka arteriālās sienīņas audi (normā)	193	10^4
	248	10^3
	308	180 ± 16
	351	$145 \pm 8,0$
	488	$32 \pm 4,4$
Cilvēka arteriālās sienīņas audi (patoloģija)	532	$30 \pm 1,8$
	308	180 ± 17
	351	116 ± 11
	488	$25 \pm 3,7$
	532	$37 \pm 4,5$

Analizējot optisko starojumu izplatību bioaudos ar daudzkārtēju izkliedi, parasti paredz vienmērīgu absorbējošo un izkliedējošo centru sadalījumus. UVA, redzamajam un tuvajam IS starojumam tipiska ir anizotropā izkliede, kura raksturojas ar savu spēcīgu vienkārtīgi izkliedētu fotonu virzību, kas, iespējams, ir saistīts ar lielu šūnu organelu kā, piemēram, mitohondriju, lizosomas, iekšējo membrānu (Goldži aparāta) klātbūtni [1].

Pietiekami stingrs nemodulētas gaismas izplatīšanās procesa izkliedējošā vidē matemātiskais apraksts var tikt veikts ar stacionārās starojuma pārnese teorijas (SPT) palīdzību. Pārnese teorija ir patiesa savā starpā pietiekami attālinātu izkliedētāju ansamblim un sekmīgi tiek pielietota, risinot vairākus praktiskus uzdevumus no bioaudu optikas. Galvenais stacionārais SPT vienādojums monohromatiskai gaismai izskatās šādi:

$$\frac{\partial I(r, s)}{\partial s} = -\mu_t I(r, s) + \frac{\mu_s}{4\pi} \cdot \int_{4\pi} I(r, s') p(s, s') d\Omega' \quad (1.4)$$

kur $I(r, s)$ - staru intensitāte punktā r virzienā s ; $p(s, s')$ - izkiedes fāzu funkcija; $d\Omega'$ - atsevišķais telpiskais leņķis virzienā s' ; $\mu_s / \mu_t \equiv \Lambda$ - atsevišķā izkliedētāja albedo.

Ja starojuma pārnese process tiek pētīts apgabālā $G \subset \mathbb{R}^3$, ∂G – apgabala robeža, tad robežas nosacījumi uz ∂G var tikt pierakstīti šādā veidā:

$$I(r, s)|_{(sn)<0} = S(r, s) + \hat{R}I(r, s)|_{(sn)>0}, \quad (1.5)$$

kur $r \in \partial G$, n – ārējā normāle pie ∂G , $S(r, s)$ - krītošās gaismas stara intensitāte, \hat{R} - atstarošanas operators. Apgabālā G esot atstarojošām vai gaismu laužošām virsmām, nosacījumiem, analogiskiem(1.5), jābūt uzdotiem katrai no tām.

Praktiski interesējoša parasti ir nevis pati funkcija $I(r,s)$, bet integrāļi no tās pa dažiem fāzu telpas apgabaliem (r,s) . Piemēram, pie bioaudu optiskās zondēšanas mērāmais lielums bieži ir izejošā starojuma sadalījuma funkcija uz vides $\Phi(r)$ virsmas

$$\Phi(r) = \int_{(sn)>0} I(r,s)(sn)d\Omega, \quad (1.6)$$

kur $r \in \partial G$. Optiskā starojuma dozimetrijas uzdevumos bioaudos šāds lielums ir pilnais apgaismojums punktā $U(r)$

$$U(r) = \int_{4\pi} I(r,s)d\Omega. \quad (1.7)$$

Fāzu funkcija $p(s,s')$ apraksta vides izkliedējošās īpašības un ir varbūtības blīvuma funkcija izkļidei s' -fotona virzienā, kurš pārvietojas virzienā s , proti, raksturo elementāro izkļides aktu. Ja izkļiede ir simetriska attiecībā pret krītošā viļņa virzienu, tas fāzu funkcija ir atkarīga tikai no leņķa θ starp virzieniem s un s' , proti

$$p(s,s') = p(\theta). \quad (1.8)$$

Pieņēmums par nejaušu izkliedētāju sadalījumu vidē, kas nozīmē telpiskās korelācijas neesamību bioaudu struktūrā, ved pie šāda normējuma

$$\int_0^\pi p(\theta)2\pi \sin \theta d\theta = 1. \quad (1.9)$$

Daudzos praktiskos gadījumos fāzu funkcija ir labi aproksimējama ar Henji-Grīnšteina postulētās funkcijas palīdzību:

$$p(\theta) = \frac{1}{4\pi} \frac{1-g^2}{(1+g^2-2g \cos \theta)^{3/2}}, \quad (1.10)$$

kur g – ir izkļides leņķa θ vidējais kosinuss:

$$g = \langle \cos \theta \rangle = \int_0^\pi p(\theta) \cos \theta 2\pi \sin \theta d\theta \quad (1.11)$$

[1, 8, 9, 10].

1.2. Ādas autofluorescence

Fluorescences izmantošanas spektrs ir ļoti plašs: ražošanā, piemēram, gaismas avotu ražošanā, kriminālistikā, hidroloģijā un ekoloģijā, bioloģijā un medicīnā, piemēram, stomatoloģijā kariesa atklāšanai un ārstēšanai [11, 12, 13].

Bioaudiem, kā jau agrāk tika teikts, ir raksturīga fluorescence, skatīt 4.att.

Konkrētu vielu fluorescences izpētes metodēm piemīt augsts jutīgums, kā arī ērts laika diapazons, jo fluorescences izstarošana notiek pēc 10^{-8} s (10 ns) pēc gaismas absorbēšanas. Pa šo laiku notiek daudz dažādi molekulāri procesi, kuri ietekmē fluorescējošā savienojuma spektrālos raksturojumus. Bez tam, fluorescences pētījumi ļauj iegūt informāciju par dzīvu sistēmu stāvokli, tās nesabojājot, un tiem nav vajadzīgs liels bioloģiskā materiāla daudzums. Ar šādām priekšrocībām fluorescences metodes ļauj vienkārši un ekonomiski atrisināt daudzus klīniskās diagnostikas, ekoloģiskās kontroles un fizikāli ķīmiskās analīzes uzdevumus un aizvien plašāk tiek pielietotas medicīniskajos un bioķīmiskajos pētījumos [18]. Bioaudu bezkontakta optiskās diagnostikas metodes ļauj, netraumējot izpētes objektu, operatīvi konstatēt patoloģiju un iegūt par to nepieciešamo informāciju.

1.2.1. Fluorescence

Līdz augstai temperatūrai sakarsētu ķermeņu spīdēšanu dēvē par sakarsētu ķermeņu izstarošanu. Tas ir līdzsvarots starojums. Visos citos gaismas izstarošanas veidus dēvē par luminiscenci, un tie ir nevienmērīgs izstarojums. Luminiscences gadījumā sistēma izstaro enerģiju, un izstarošanas ierosināšanai enerģija ir jāpievada no ārpuses. Luminiscences paveidi cits no cita atšķiras pēc ierosināšanas enerģijas avota veida [15]. Tādējādi luminiscence ir starojums, kas ir pārpalikums virs ķermeņa termiskā izstarojuma, ilgstošs laika gaitā, un ievērojami pārsniedz gaismas svārstību periodu (10^{15} s) [16].

Pirmās klasifikācijas pamatā bija likts spīdēšanas procesa ilgums, ko nosaka vidējais laika intervāls starp ierosināšanas aktu un luminiscences kvanta izlaišanas aktu. Pēc spīdēšanas ilguma visus luminiscences veidus iedalīja fluorescencē un fosforescencē. Pie fluorescences pieskaitīja starojumus, kas momentāni (laikā līdz 10^{-8} s) apdziest pēc to ierosināšanas pārtraukšanas, bet pie fosforescences - spīdēšanu, kas turpinās pamanāmu laika sprīdi (no 10^{-6} s un vairāk) pēc ierosināšanas pārtraukšanas. Šādai klasifikācijai bija tīri kvalitatīvs raksturs, un tā neļāva notikt skaidru atšķirību starp diviem norādītiem spīdēšanas veidiem. Mūsdienās terminus "fluorescence" un "fosforescence" parasti izmanto tam, lai atšķirtu luminiscenci, kas rodas pie pārējām starp vienas multiplicitātes elektroniskajiem

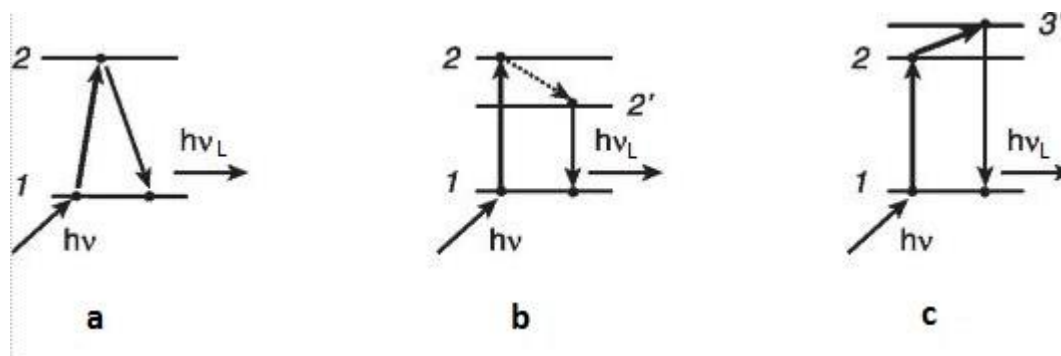
līmeņiem (piemēram, singleta-singleta pāreja), no pārejām starp dažādas multiplicitātes elektroniskajiem līmeņiem (piemēram, tripleta-singleta pāreja) [17].

Saskaņā ar kvantu ķīmijas priekšstatiem, elektroni atomos ir izvietoti enerģētiskajos līmeņos. Attālums starp enerģētiskajiem līmeņiem molekulā ir atkarīgs no tās struktūras. Apstarojot vielu ar elektromagnētisko starojumu, ir iespējama elektronu pāreja starp dažādiem enerģētiskajiem līmeņiem. Enerģijas starpība starp enerģētiskajiem līmeņiem un absorbētās gaismas svārstību frekvence savā starpā samērojas saskaņā ar vienādojumu (III Bora postulāts):

$$E_2 - E_1 = h\nu. \quad (1.12)$$

Pēc gaismas absorbcijas daļa no sistēmas iegūtās enerģijas tiek iztērēta relaksācijas rezultātā. Toties daļa var tikt izlaista noteiktas enerģijas fotona veidā [11].

Fotoluminiscence sākas no atoma vai molekulas ierosināšanas ar ārēja starojuma, kam ir noteikta frekvence ν , fonu. Rezultātā atoms pāriet no pamata enerģētiskā līmeņa (1) uz vienu no ierosinātajiem līmeņiem (2). Tālāk ir iespējami trīs turpinājumi.



5.att. Luminiscences veidi: rezonances (a), Stoksa (b) un antistoksa (c) [16]

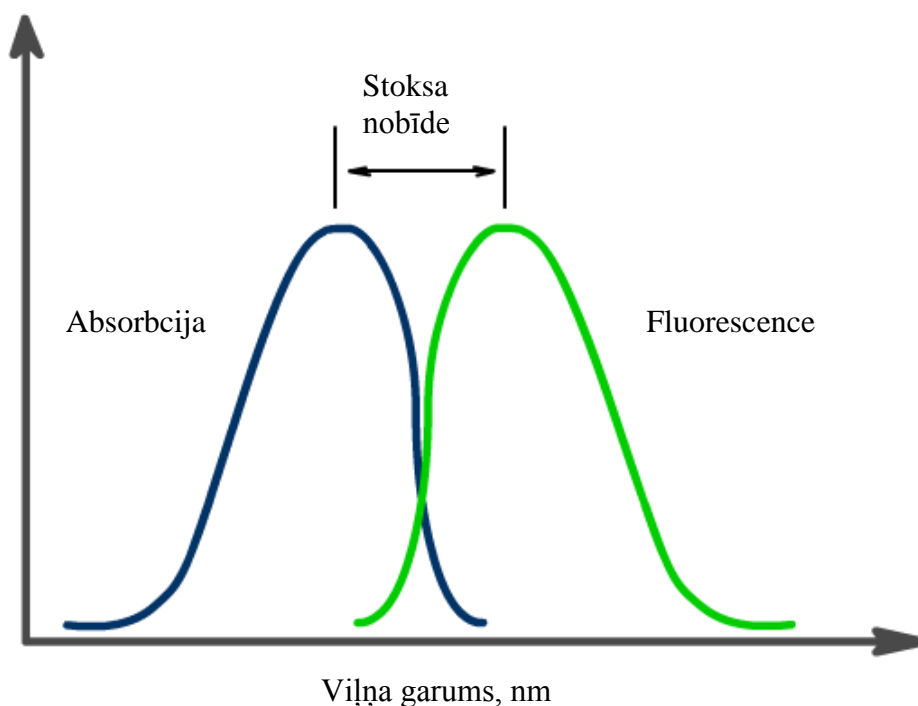
1. Atoms (molekula) atgriežas pamata līmenī, izlaižot fonu, kura frekvence ir vienāda ar absorbētā fotona frekvenci: $\nu_L = \nu$ (5.att., a). To dēvē par rezonances luminiscenci.

2. Ierosinātais atoms mijiedarbojas ar tam apkārtējiem atomiem un bez izstarošanas pāriet uz zemāku ierosinātu līmeni (2). Pēc tam tas pāriet uz pamata līmeni, izstarojot mazākas frekvences fonu: $\nu_L < \nu$ (5.att., b). To dēvē par Stoksa luminiscenci (par godu Dž.G.Stoksam).

3. Ierosinātais atoms mijiedarbojas ar tam apkārtējiem atomiem un bez izstarošanas pāriet uz augstāku ierosināto līmeni. Pēc tam tas pāriet uz pamata līmeni, izstarojot lielākas frekvences fonu: $\nu_L > \nu$ (5.att., c). To dēvē par antistoksa luminiscenci [16].

Fluorescences spektrs ir nobīdīts attiecībā pret absorbcijas spektru uz garo viļņu pusi-Stoksa nobīde (5.zīm., b). Tā cēlonis ir bezstarojuma relaksācijas procesi. Rezultātā daļa no

absorbētā fotona enerģijas tiek zaudēta, bet izstarojamajam fotonam ir mazāka enerģija un, attiecīgi lielāks viļņa garums[11].



6.att. Jēdziena “Stoksa nobīde” ilustrācija [11]

Svarīgākie vielas daļiņu fotoluminiscences raksturojumi ir to absorbcijas, luminiscences un ierosināšanas spektri.

Fluorescences intensitāte pēc ierosināšanas izbeigšanās ar laiku krītas saskaņā ar eksponenciālo likumu

$$I_t = I_0 e^{-\frac{t}{\tau}}, \quad (1.13)$$

kur I_t — spīdēšanas intensitāte laika momentā t ; I_0 — spīdēšanas intensitāte luminiscences ierosinājuma pārtraukšanas brīdī, τ — luminiscences ilgums (ierosinātā stāvokļa pastāvēšanas vidējais laiks). Pie $t = \tau$:

$$I_\tau = \frac{I_0}{e} = \frac{I_0}{2,72} \approx 0,37I_0. \quad (1.14)$$

Tādējādi pie eksponenciālās luminiscences dzišanas visa spīdēšanas procesa gaitu nosaka lielums τ [17].

Tāpat fluorescencei varam noteikt fluorescence kvantu iznākumu. Fluorescences kvantu iznākums parāda, ar kādu efektivitāti notiek šis process. Tas tiek noteikts kā izdodamo un absorbējamo fotonu skaita attiecība. Fluorescences kvantu iznākumu var aprēķināt pēc formulas

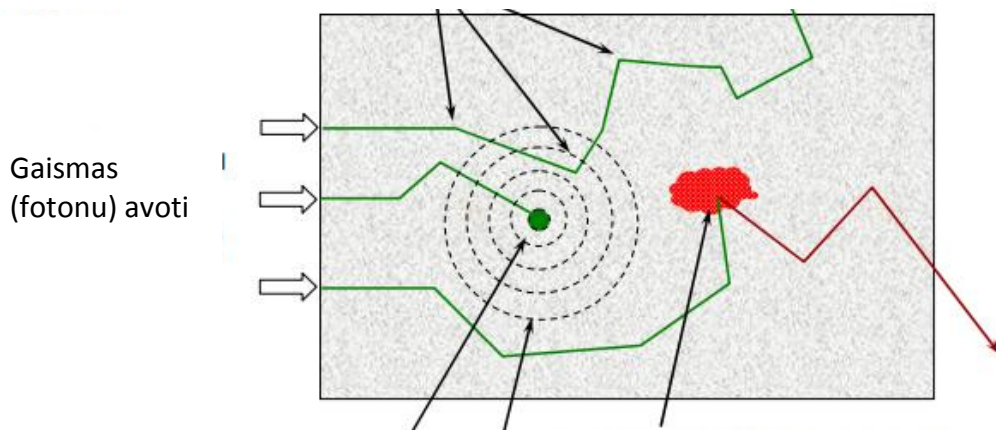
$$\eta_F = \frac{N_{em}}{N_{abs}}, \quad (1.15)$$

kur N_{em} - fluorescences rezultātā izdodamo fotonu daudzums, bet N_{abs} - kopējais absorbējamo fotonu daudzums. Jo lielāks ir fluorofora kvantu iznākums, jo intensīvāka ir tā fluorescences [11].

1.2.2. Autofluorescence

Viena no fundamentālākajām parādībām, kas rodas, optiskais starojums mijiedarbojoties ar bioloģiskajiem objektiem, ir to fluorescences — platjoslas spīdēšana garākos viļņos, salīdzinot ar ierosināšanas viļņa garumu (6.att.) [1]. 7.attēlā ir skaidri parādīta gaismas izplatīšanās bioloģiskajos audos, kur rezultātā redzam audu fluorescenci.

• Izklīde – fotons novirzās no sava sākotnējā virziena



• Absorbcija – fotons tiek absorbēts, izdalās siltums

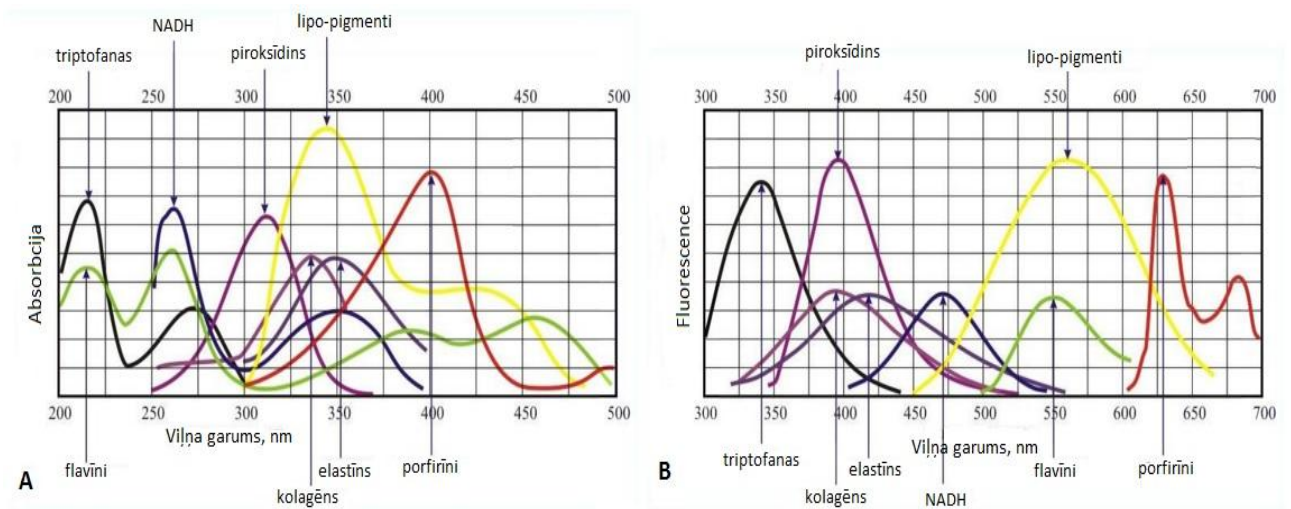
Absorbējot īsu gaismas impulsu (nanosekundes), no absorbcijas vietas izplatās ultraskaņas viļņi

Fluorescence – fotonu absorbē viela (fluorofors), un tas tiek no jauna izstarots ar citu viļņa garumu

7. att. Gaismas izplatīšanās bioloģiskajos audos [14]

Autofluorescenci nosaka dabisku fluoroforu klātbūtne vai, citiem vārdiem, autofluorescence ir paša bioloģiskā materiāla fluorescences.

Cilvēka audi satur lielu skaitu dažādu dabisku fluoroforu, pamatā no flavīnu, olbaltumvielu un porfirīnu grupas. Katram fluoroforam ir raksturīgi absorbcijas un emisijas spektri [19].



8. att. Bioloģisko audu galveno fluoroforu absorbcijas (A) un emisijas (B) spektri[19]

Gaismas absorbcija ir saistīta ar elektronu pāreju no vielas molekulas pamatstāvokļa ierosinātā stāvoklī. Rezultātā, gaisma, kas iziet cauri slānim ar biezumu d , pavājinās kā

$$I(\lambda) = I_0 \exp(-\mu_a d) = I_0 10^{-\varepsilon_\lambda c_{ab} d}, \quad (1.16)$$

kur $I(\lambda)$ - izgājušās gaismas intensitāte, I_0 - krītošās gaismas intensitāte, ε_λ - ekstinkcijas molārais koeficients, bet c_{ab} - absorbējošo molekulu koncentrācija. Izkliedējošajos paraugos absorbcijas μ_a un izklīdes μ_s koeficienti (izlaists vienādojumā (1.16)) summējas, nosakot cauri izejošās gaismas sekojošo pavājināšanos (skat. vienādojumu (1.3)).

Fluorescence rodas pēc optisko starojumu absorbcijas un ir saistīta ar elektronu pāreju no molekulas ierosinātā stāvokļa uz pamatstāvokli. Tās intensitāti dod izteiksme

$$I_F(\lambda) = I_0 \left[1 - 10^{-\varepsilon_\lambda c_{ab} d} \right] \eta_F \frac{\Omega}{4\pi}, \quad (1.17)$$

kur η_F - fluorescences kvantu iznākums, bet Ω - telpiskais leņķis, kurā tiek reģistrēts izotropais fluorescences izstarojums (uztvērēja leņķiskā apertūra). Plānu, piemēram, šūnu daudzslāņu vai biopsijas paraugu gadījumā dažu mikrometru biezumā izteiksme (1.42) var tikt attēlota šādi

$$I_F(\lambda) = I_0 \ln 10 \varepsilon_\lambda c_{ab} d \eta_F \frac{\Omega}{4\pi}. \quad (1.18)$$

Autofluorescences intensitāte ir proporcionāla absorbējošo molekulu koncentrācijai un autofluorescences kvantu iznākumam. Izklīdējošās vidēs izklīdēto un neizklīdēto fotonu noskrējiena garums parauga iekšienē ir atšķirīgs, un izteiksmēm (1.17) un (1.18) ir vajadzīga modifikācija, ņemot vērā daudzkārtējās izklīdes efektus. Tomēr praktiski viendabīgos plānos paraugos lineārā sakarība starp I_F , c_{ab} un η_F saglabājas[1].

1.2.3. Difūza atstarošana

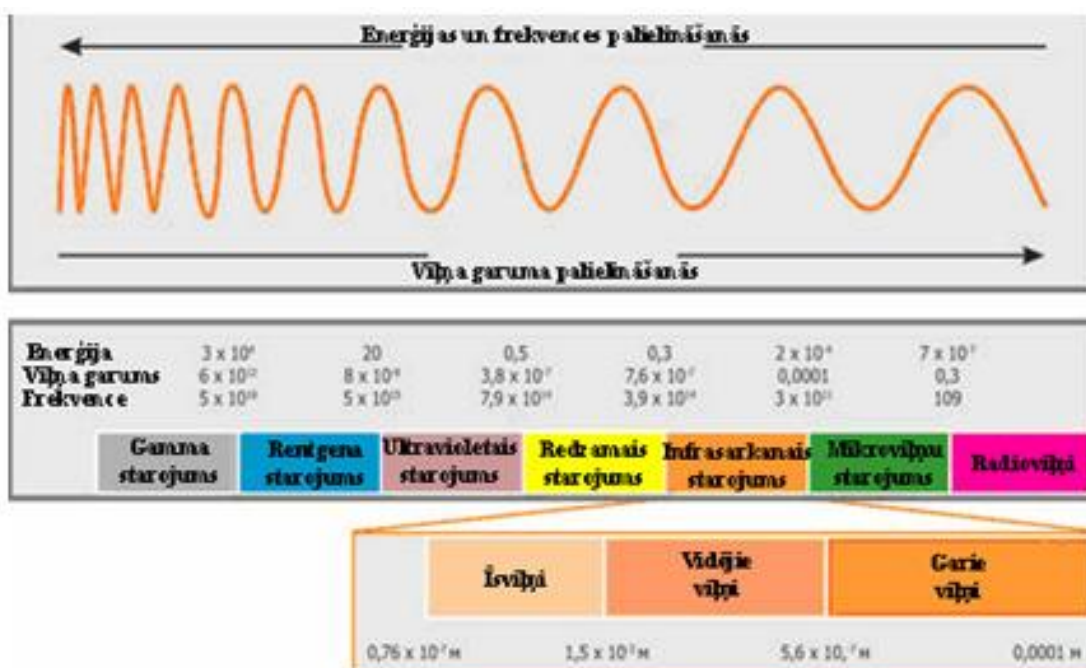
Starp optiskajām bioaudu izpētes metodēm in-vivo vislielāko attīstību ir guvušas atstarošanas un fluorescences spektroskopijas metodes. Atstarošanas spektroskopijas metodi jau pietiekami sen izmanto biomedicīnā (S.L. Jacquesetal., В.В. Кузьмин и В.П. Жаров, P.H. Andersen, J.B. Dawsonetal., N. Kolliasetal., и др.) [40].

Daži fotoni pēc daudzkārtējas izkliedes iznāk atpakaļ no audiem zem nejaušiem leņķiem, bet citi tieši atstaroti. Kopumā tā arī ir tā dēvējamā difūzi atstarots optiskais starojums. Tā ir spektrāli atkarīga.

1.3. Tuvais IS

Elektromagnētiskais starojums ir elektromagnētiskie viļņi, ko ierosina dažādi izstarojoši objekti, – uzlādētas daļiņas, atomi, molekulas, antenas u.c. Atkarībā no viļņa garuma izšķir gamma starojumu, rentgena, ultravioleto starojumu, redzamo gaismu, infrasarkanā starojumu, radioviļņus un zemfrekvences elektromagnētiskās svārstības[21]. Detalizētāk aplūkot elektromagnētiskā starojuma spektru var 9.attēla.

Elektromagnētiskos starojumus raksturo svārstību frekvence, kas rāda pilnu svārstību ciklu skaitu sekundē, vai viļņa garums, proti, attālums, kurā starojums izplatās vienas svārstības laikā (pa vienu svārstību periodu) [20].



9.att.Elektromagnētiskā starojuma spektrs [22]

Svārstību frekvence (ν), viļņa garums (λ) un izplatīšanās ātrums (c) ir saistīti savā starpā ar attiecību: $c = \nu \cdot \lambda$.

Infrasarkanais starojums ir elektromagnētiskais starojums, kas aizņem spektrālo apgabalu starp redzamās gaismas sarkano galu (ar viļņa garumu $0,74 \mu\text{m}$) un mikroviļņu starojumu ($1\text{-}2 \text{ mm}$) [20].

Spektra IR apgabalu parastu daļu trīs diapazonos [23, 24]:

- Tuvais infrasarkanais diapazons - NIR - $\lambda = 0,76\text{-}2,5 \mu\text{m}$
- Vidējais infrasarkanais diapazons - MIR - $\lambda = 2,5\text{-}50 \mu\text{m}$
- Tālais infrasarkanais diapazons - FIR - $\lambda = 50\text{-}1000 \mu\text{m}$.

1.4. Asinsvadu dzišana

Sīko asinsvadu sametināšanas nozīme pirmo reizi tika nodemonstrēta 1964.gadā, izmantojot neodīma lāzeri (Nd:YAG). Sākot no šī laika, sāka attīstīties lāzera izmantošanas metodes klīniskajā praksē bezšuvju sametināšanai. Tas ļauj daudz vairāk vienkāršot procedūru. Priekšrocības, salīdzinot ar tradicionālajām metodēm (šuves un skavas): samazinās iekaisums un reakcija uz svešķermeni, minimāla rētaudu veidošanās, dzišanas laika samazināšanās, ļauj pārvarēt grūtības darbā uz šauriem asinsvadiem, kur nav iespēju izmantot skavas vai dūrienus (šuves) [25, 26]. Vispārīgā prasība pret šuvēm, mūsu gadījumā pret plāksteri, kas tiek uzlikts uz asinsvadiem, ir pietiekamas anastomozes izturības un hermētiskuma nodrošināšana, saglabājot tās spraugas (ejas) diametru [27]. Tāpēc tika piedāvāta tāda metode kā asinsvadu sametināšana ar hitozāna/ indocianīnzaļā plākstera un lāzera palīdzību. Plāksteris kalpo brūces noslēgšanai, bet lāzers plākstera piemetināšanai pie asinsvada. Tālāk aplūkosim plākstera saturu, komponentu izvēli un tā sakausēšanu pie asinsvadiem.

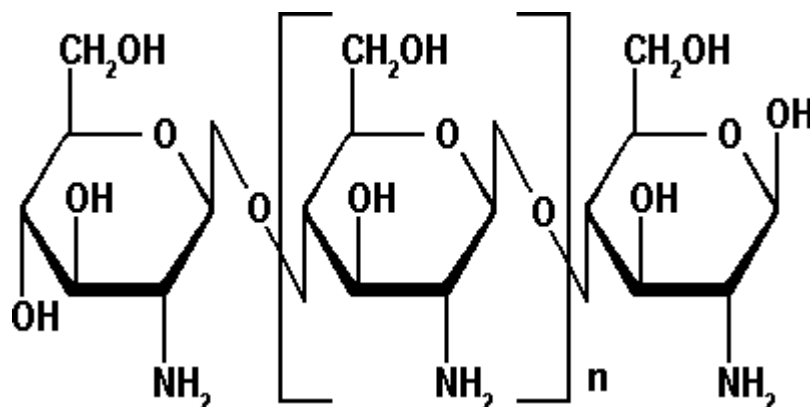
1.4.1. Hitozāns

Plāksteris, kas noslēdz brūci, sastāv no hitozāna un indocianīna (ICG). Hitozāns aizņem lielāko daļu no plākstera sastāva.

Hitozāns ir hitīna atvasinājuma produkts. Dabiskā stāvoklī hitīnu satur jūras krabju, garneļu, krilu, omāru, vēžu čaulas, kā arī tas ir zooplanktona ārējā skeletā, ieskaitot koraļļus un medūzas. Tādiem kukaiņiem kā taureņi un mārītes hitīns ir spārniņos. Rauga šūnu, sēņu un dažādu sēnīšu sienīnās arī satur šo dabas vielu.

Hitozāna iegūšana notiek, apstrādājot hitīnu ar sārma šķīdumu speciālos apstākļos. Tā rezultātā tiek atdalīts oglekļa savienojums, kas hitīnam piešķir cietību, — tiek aizvākts acils. Pilnībā aizvākt acilu nav iespējams. Hitozāna sastāva kvalitāte ir atkarīga no hitozāna elementu un neacetilētā hitīna procentuālā samēra. Jo augstāka ir acila atdalīšanas pakāpe, jo augstāks ir šī produkta funkcionālais efekts.

Pēc sava ķīmiskā sastāva hitozāns atgādina celulozi. Kā dabas polimērs tas ir absolūti drošs cilvēkam [30].

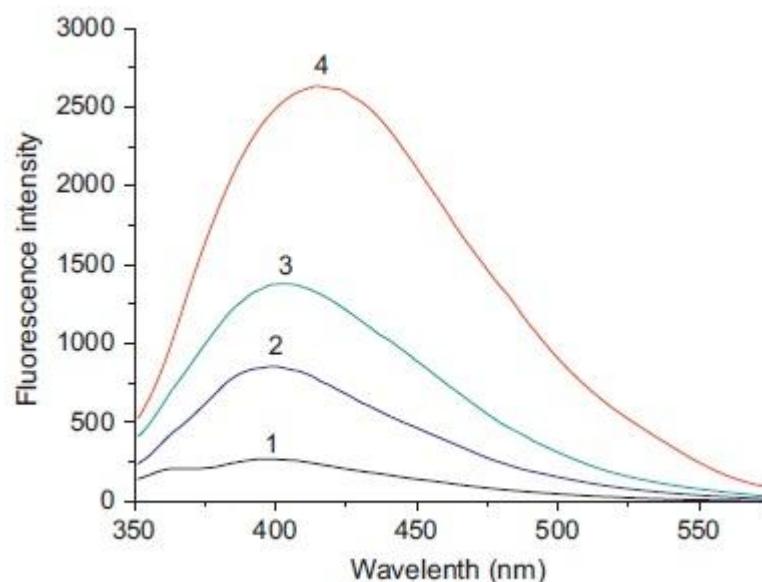


10.att.Hitozāna makromolekulas strukturālā formula[29]

Kļuva zināms, ka hitozānam piemīt sadziedēšanas īpašības, un hitozāna dziedējošo iedarbību sāka izmantot 1970.gados. Tika noskaidrots, ka hitozānam piemīt antimikrobu iedarbība, un tas sekmē audu reģenerāciju. Hitozāns aktivizē apdegumu un brūču virsmu sadzīšanu bez rētu veidošanās, jo stimulē ādas kolagēna šūnu augšanu, kas nodrošina ādas pārklājumu elastīgumu. Bez tam, uzklājot uz brūces, hitozānam piemīt asiņošanu apturoša un pretsāpju iedarbība.

Hitīna salvešu, plēvju izmantošana paātrina brūču sadzīšanu apmēram par 30%. Hitozāna sastāvdaļas struktūras un īpašību ziņā ir tuvas cilvēka organisma šūnām. Uz bojātajām virsmām uzklāta mākslīgā āda no hitozāna viegli saaug ar tām, un nav vajadzības to noņemt un lieku reizi traumēt bojāto iecirkni, jo tā ir barojoša vide ādas pašas šūnu augšanai [31].

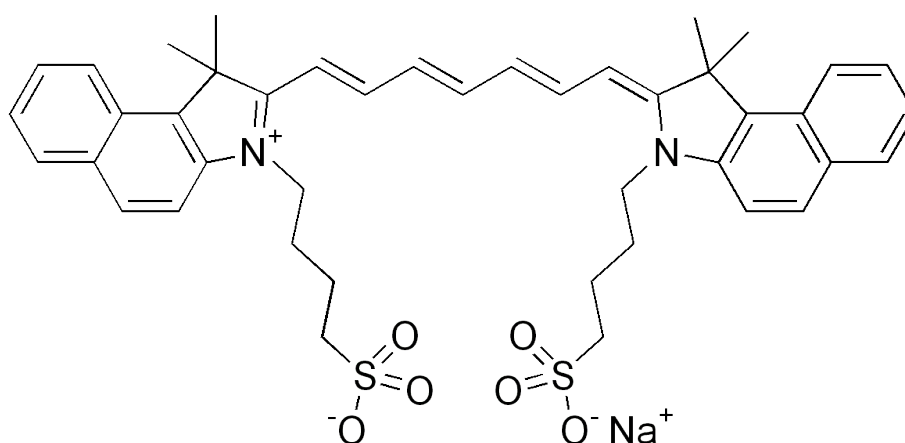
Hitozānam pēc savas dabas piemīt vāja fluorescences, jo īpaši atšķaidītā šķīdumā. Hitozāna fluorescences spektrs izpaužas diapazonā no 400 līdz 415 nm. Tāpat ir noteikts, ka hitozāna fluorescences intensitāte lēnām pieaug līdz ar hitozāna koncentrācijas palielināšanos[32].



11.att.Hitozāna fluorescences spektri ar atšķirīgām koncentrācijām (1: 0,12 mg/ml, 2: 0,5 mg/ml, 3: 1,0 mg/ml, 4: 3,0 mg/ml), kas iegūti pie ierosināšanas ar 325 nm lāzeri[32]

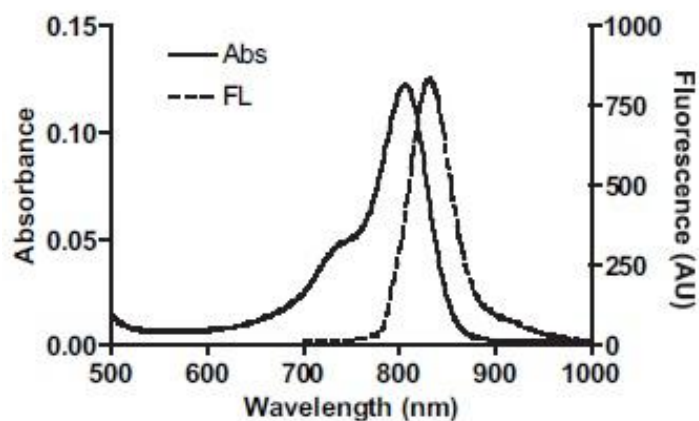
1.4.2. Indocianyne Green (ICG)

Otrs plāksterā komponents ir indocianīnzaļais (ICG). ICG ir tumši zaļas krāsas pulveris vai poraina masa. Diagnostisko krāsvielu ICG izmanto medicīnā praksē asinsvadu vizualizācijai ar fluorescentās angiogrāfijas palīdzību, kā arī aknu funkcijas novērtējumam ar pulsa densitometrijas palīdzību [34].



12.att. Izvērstā indocianīnzaļā formula[33]

ICG emisijas spektra maksimums λ_{\max} atrodas ap 810 nm. Fluorescences intensitāte var mainīties atkarībā no koncentrācijas [35,36].



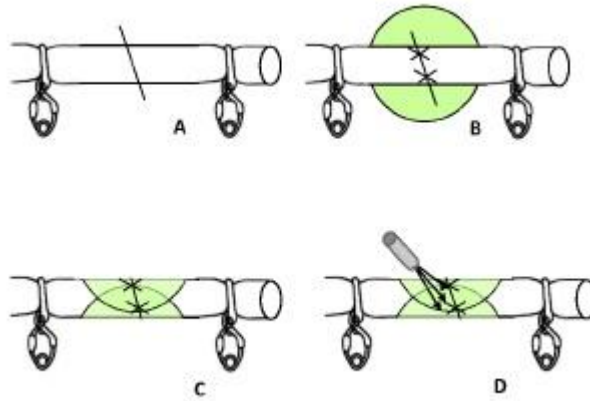
13.att. ICG absorbcijas un fluorescences spektrs ICG [33]

1.4.3. Plāksteru sastāvdaļas, novietošana un sakausešana

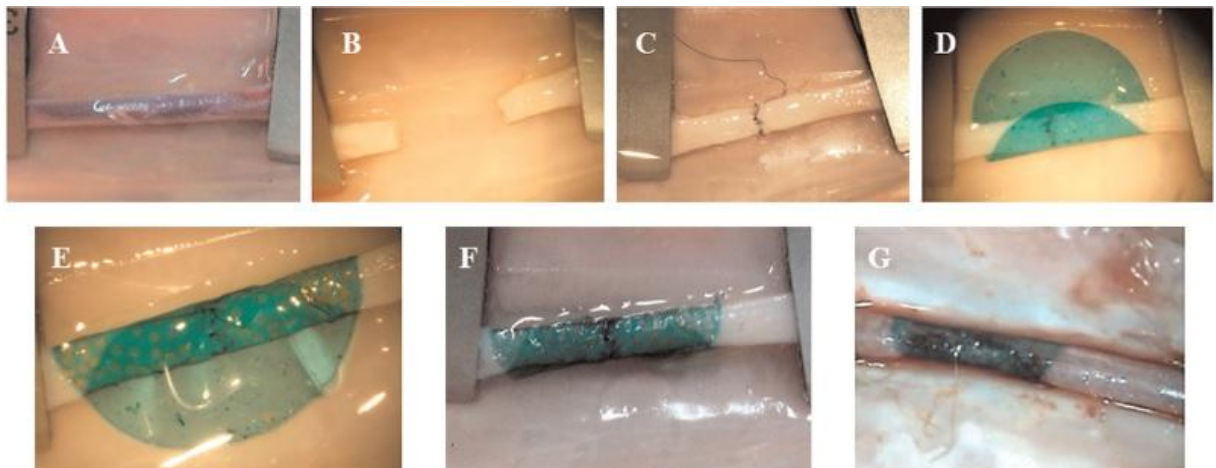
Lai iegūtu plāksteri, hitozānu disperģē vājā ūdens skābes šķīdumā, kas satur 0,07% ICG, līdz galīgai 3,5% (svars/ apjoms) koncentrācijai. Pēc tam notiek šķīdinātāja iztvaicēšana nakts laikā istabas temperatūrā, un pēc tam paraugus neitralizē ar sārma šķīdumu ar turpmāku skalošanu ar lielu ūdens daudzumu. Rezultātā iegūstam plēvi (plāksteri) 0,8 cm diametrā un 40 μm biezumā. Plēves glabājas ūdens šķīdumā līdz to izmantošanai eksperimentālajās procedūrās.

Sakausešanai izmantoja lāzeri AlGaAs ar viļņa garumu 810 ± 10 nm, lāzera maksimālā jauda ir 10 W. Iekārta ir aprīkota ar optisko šķiedru, šķiedras gals ir uzstādīts lāzera uzgalī. Optiskās šķiedras izmantošana ļauj viegli samontēt operācijas mikroskopu novērošanai un operācijas veikšanai. Optiskās šķiedras serdenis ir vienāds ar 300 μm.

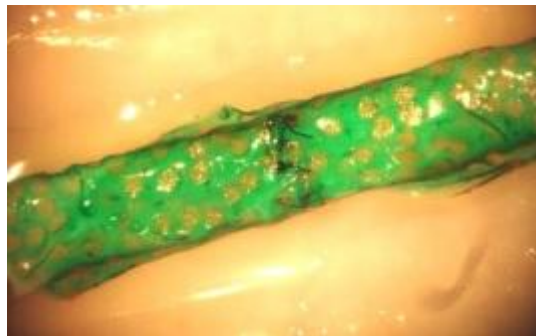
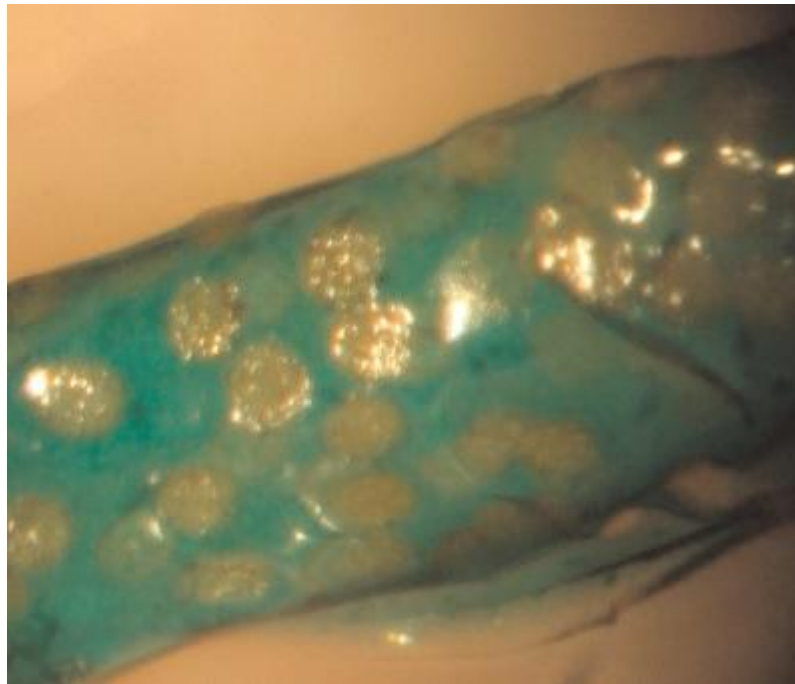
Eksperimenti tika veikti Romā Katoļu Eksperimentālās ķirurģijas universitātē. Pati operācija tika veikta uz truša vai žurkas miega artērijas, ar anestēziju. Pēc dzīvnieka anestēzijas tiek pārgriezts priekšējais kakla iecirknis, kur atrodas miega artērija. Tālāk operācijā miega artērija tiek saspiesta no divām pusēm, lai pārtrauktu asins plūsmu, tiek izdarīts artērijas griezumšķērsvirzienā. Atvērtā artērija tiek izskalota. Lai satuvinātu abas artērijas puses, tiek izdarīti pāris šuves dūrieni. Nosedzam brūci ar uzliedzamo plāksteri ap artēriju. Un jau pēc tam ar lāzera palīdzību notiek plāksteru pielodēšana pie artērijas. Uzskatāmāk ķirurģiskā operācija ir parādīta shēmā 14.un 15.attēlā [28, 37].



14.att.Hitozāna/ICG plākstera pielodēšanas procedūras shēma: A: pilns artērijas šķērsvirziena griezums saspiestā stāvoklī; B: 3-kārtīgs dūriens, lai satuvinātu divus artērijas segmentus; C: aptītais plāksteris ap anostomozi; D: plākstera virsmas apstarošana ar diožu lāzeri, lai nodrošinātu audu adhēziju[37]



16.att.Anostomozes noslēgšana ar hitozāna/ICG plāksteru un lāzera palīdzību. A: miega artērija saspiestā stāvoklī; B: šķērsais griezums; C: dūrieni anostomozes pastiprināšanai; D: plāksteru uzlikšana; E: sakausešanas process ar lāzera palīdzību; F: plāksteris ir pielodēts visā anostomozes garumā; G: miega artērija pēc veiktās operācijas, pēc spaiļu atbrīvošanas [28]



17.att.Hitozāna/ICG plāksteris un miega artērijas audu adhēzija. Gaišie aplīši ir iedarbības vieta ar lāzeri (spot), ciešā kontaktā ar audiem [28, 37]

Visa operācijas procedūra aizņem apmēram 12 minūtes, kas šādai operācijai ir mazs laika daudzums. Hromofora (ICG) izmantošana balstās uz to, lai iekrāsotu plāksteri-mērķi un lai paaugstinātu absorbciju, ICG absorbcijas maksimums ir ap 810 nm (skatīt 13.att.). Tādējādi, lāzera stars selektīvi tiek absorbēts uz iekrāsotā apgabala (plāksteris), kā rezultātā parādās siltuma efekts, tas arī nodrošina audu adhēziju. Arī blīvajā hitozāna plēves sistēmā ietvertais ICG ir ilgizturīgs, jo plēve palēnina ICG struktūras sabrukšanu un saglabā krāsvielas optiskās īpašības [28, 38].

Proti, komponentu izvēle ir acīmredzama, ICG darbojas kā salīmējošā viela un hitozāns kā viela, kas ātri un vislabākajā veidā sadziedē brūci.

Pēc veiktās plāksteris un artērijas adhēzijas operācijas artēriju pārbaudīja attiecībā uz asins caurlaidību, asins caurlaidības traucējumi netika konstatēti.

2. PĒTNIECISKĀ DAĻA

Šī operācija, kas aprakstīta iepriekš (skat. 1.4. paragrāfu), ir ļoti rūpīga un pieprasa piesardzību un uzmanību. Tāpēc mums ir precīzi jāzina izvēlētā lāzera jauda un ekspozīcijas laiks pie plākstera adhēzijas ar artēriju, vai netiek nodarīts kaitējums artērijai un plāksterim, proti, vai nenotiek artērijas un plākstera sagraušana (piedegšana). Vai otrādi, ja izvēlētā lāzera jauda vai ekspozīcija ir pārāk maza, tādā gadījumā adhēzija var nenotikt.

Šajā daļā būs aprakstīts, kā tika realizēta eksperimentālā daļa, kāda aparatūra tika izmantota, un matemātiskie aprēķini.

Lai realizētu eksperimentālo daļu, tika uzstādīti šādi uzdevumi:

1. Izveidot eksperimentālo stendu paraugu autofluorescences, ICG fluorescences un difūzās atstarošanas spektrālo īpašību izpētei un vizualizācijai;
2. Uzņemt un izanalizēt paraugu autofluorescences, ICG fluorescences un difūzās atstarošanas spektrus redzamajā un tuvajā infrasarkanajā;
3. Piedāvāt metodi vai risinājumu asinsvadu dzīšanas monitoringam izmantojot optiskās metodes.

2.1. Paraugi

Eksperimentālā daļa tika veikta uz trīs paraugiem. Bet trešais tika bojāts varbūt sakarā ar to, ka ilgu laiku bija formalīnā. Paraugi tika izgriezti pēc sekmīgi veiktas operācijas uz žurkas miega artērijas. Plākstera adhēzija tika veikta ar lāzeri ar jaudu 0,9 W un ar ekspozīciju 100 milisekundes. Plāksteri tika ievietoti mēģenē ar formalīnu, lai saglabātu artērijas un plākstera elastīgumu, un atsūtīti no Itālijas ar eksprespastu.

Lai veiktu parauga analīzi, paraugu ar pincetes palīdzību uzmanīgi, lai nesabojātu paraugu, izņēma no mēģenes un novietoja Petri trauciņā, iepriekš rūpīgi noskalojot paraugu PBS šķīdumā. Tālāk paraugs Petri trauciņā atradās nelielā PBS šķīduma daudzumā, lai paraugs nekļūtu trausls.

Iegūtajiem diviem artēriju paraugiem nav anastomozes šuvju, tātad anastomozi uztur plāksteris. Paraugi atšķiras ar to, ka otrajā artērijas paraugā iekšā atrodas no polikaprolaktona (PLC) izgatavots stents, uz kura ir savienotas artērijas puses pēc griezuma. Stents ir uzstādīts asins plūsmas uzlabošanai un lai izvairītos no iespējamās artērijas diametra saspiešanas pie plākstera adhēzijas.

2.2. Rezultātu iegūšana un izmantojamās aparatūras apraksts

Iegūtie paraugi tika analizēti ar četrām metodēm:

1. Autofluorescences ierosināšana;
2. ICG fluorescences iegūšana tuvajā infrasarkanajā diapazonā;
3. Difūzā atstarošana;
4. ICG fluorescences makro attēlošana.

2.2.1. Multispektrālā attēlošanas sistēma Nuanc eEX

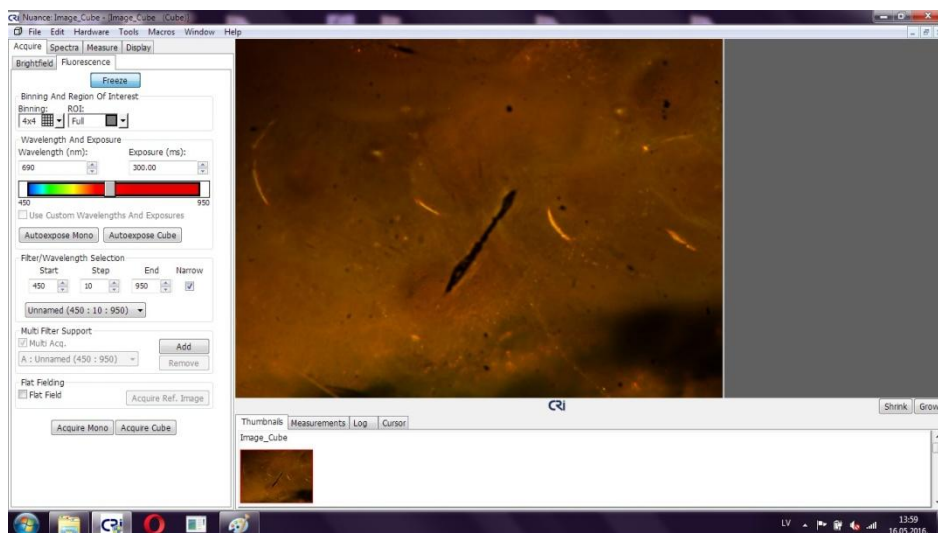
Dati tika iegūti ar multispektrālās kameras Nuance EX un attiecīgās programmas Nuance 2.10.0. palīdzību, kas bija uzstādīta datorā. Spektrālais diapazons 450-950 nm.



- A- Hg lampa
- B- Filtru kubs 434 nm līnijai
- C- Multispektrālā kamera Nuance EX
- D- Dators ar uzstādītu programmu Nuance 2.10.0.
- E- Mikroskops
- F- Hg lampas barošanas bloks

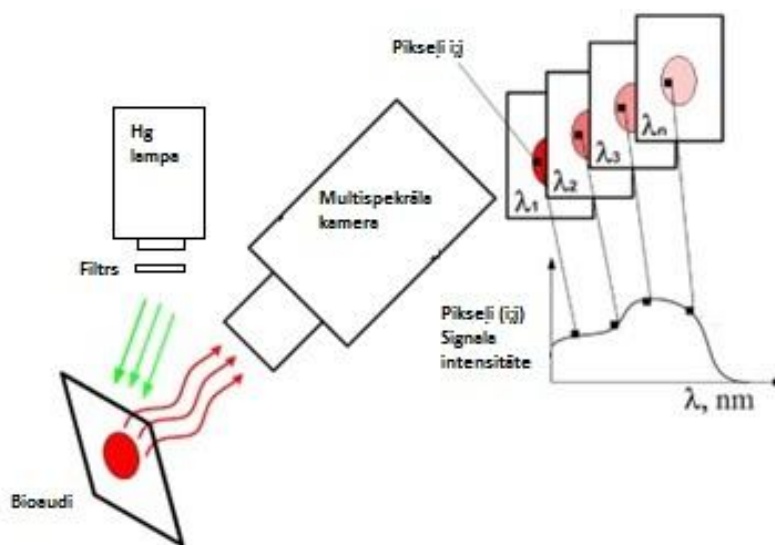
18.att. Izmantojamā aparatūra paraugu fluorescences spektru iegūšanai

Tālāk varam redzēt programmas Nuance logu, kur varam mainīt multispektrālās kameras īpašības kā, piemēram, spektrālo diapazonu, ekspozīciju u.c.



19.att. Izmantojamā programma Nuance 2.10.0. režīmā Live

Paraugs atrodas zem mikroskopa ar kopējo palielinājumu x50, kas ļauj apskatīt ne tikai plāksteri, bet arī vēl sakausēšanas vietas. Spektra iegūšanas process ir uzskatāmi redzams 20.attēlā. Bioloģisko audu fluorescenci ierosinām ar Hg lampu joslas filtru 434 nm, bet ar multispektrālo kameru reģistrējam iegūto spektru. Galarezultātā iegūstam datu kubu, kur katrs kadrs atbilst noteiktam viļņa garumam un intensitātei.

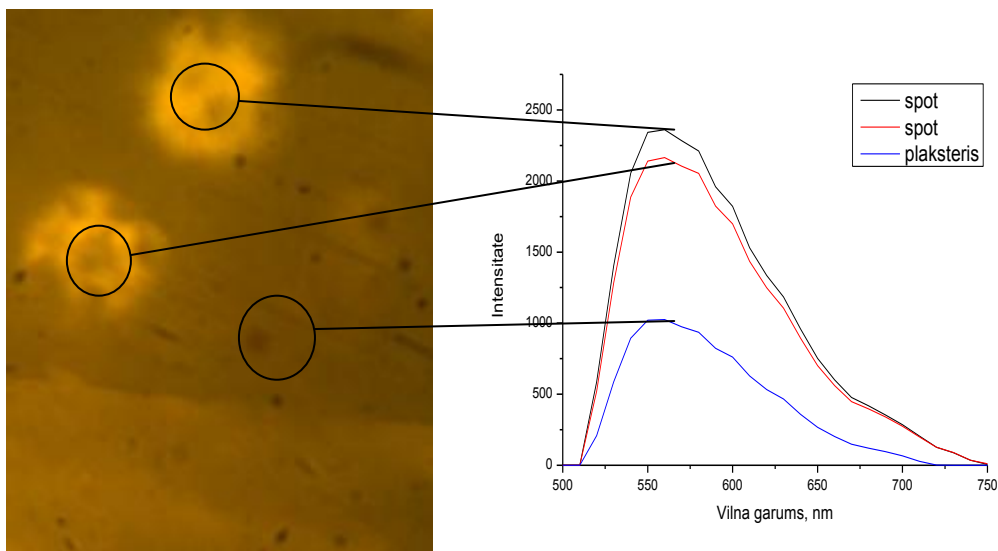


20.att. Fluorescences spektra iegūšanas shēma ar multispektrālo kameru Nuance EX[39]

2.2.1.1. Autofluorescences datu iegūšana

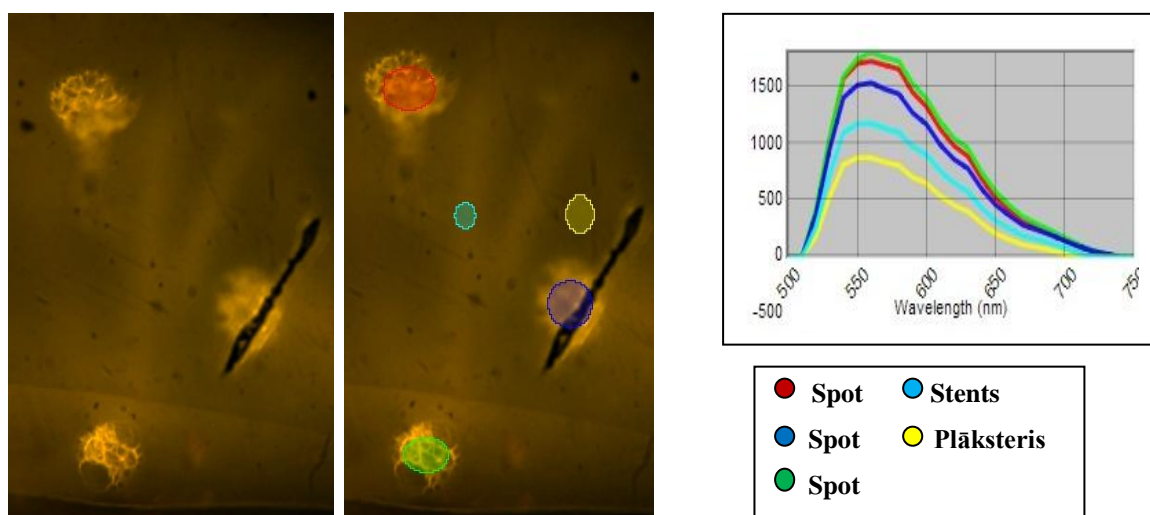
Lai ierosinātu autofluorescenci, izmantojam Hg lampu ar joslas filtru 434 nm, aptuvenais attālums 7,5 cm līdz paraugam. Multispektrālās kameras spektrālais diapazons ir

500-750 nm ar soli 10 nm. Galarezultātā programmā Nuance iegūstam dažādu spektrālo joslu intensitātes attēlu kubu. Mūs interesējošās vietas apvelkam ar apli, un programma mums parāda vidējo spektru intensitātes vērtību izceltajā zonā. Tas uzskatāmi ir parādīts 21.attēlā, kur atsevišķi ir attēloti dati, sakausēšanas vietās un tur, kur iedarbības ar lāzeri nebija, pirmajam paraugam.



21.att. Plāksterā fluorescences attēls ar spotiem un atbilstošajiem spektriem pirmajam paraugam

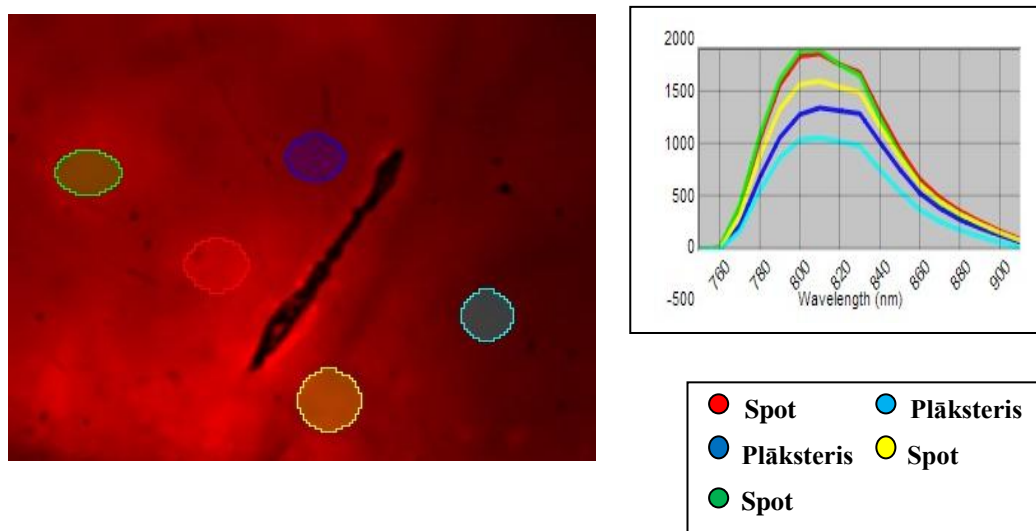
Analoģiska darbība tiek veikta arī ar otro paraugu, kurā atrodas stent, skatīt 22.attēlu. Melnā svītra un melnie punkti uz attēla ir netīrumi multispektrālajā kamerā.



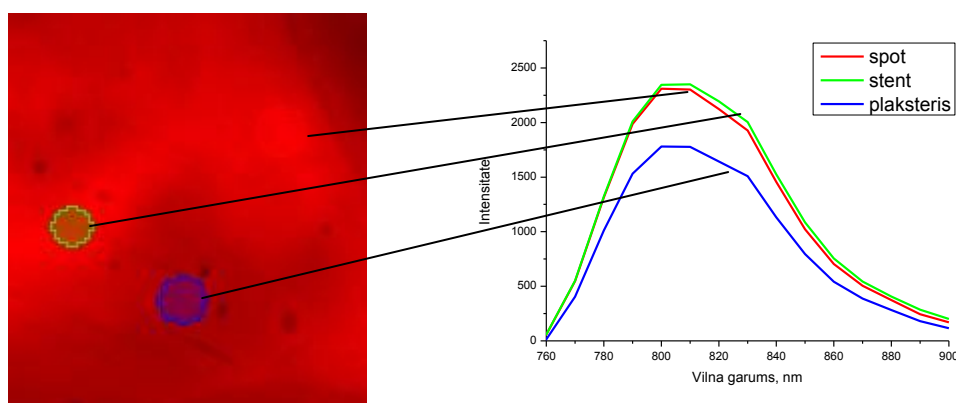
22.att. Plāksterā fluorescences attēls ar spotiem un stentu un atbilstošajiem spektriem otrajam paraugam

2.2.1.2. Fluorescences datu iegūšana tuvajā infrasarkanajā diapazonā

Tālākas paraugu analīzes mainām multispektrālai kamerai spektrālu diapazonu 750-950 nm ar soli 10 nm, lai novērot tikai ICG fluorescence un izslēgt autofluorescences intensitātes spektru. Un lai intensitāte palielināt ICG fluorescence intensitāte mainām ekspozīciju kamerai. Piemēram, ir iegūti ICG fluorescence attēli tuvajā infrasarkanajā diapazonā un ar attiecīgajiem fluorescence spektriem sakausēšanas vietām (spot) un tur, kur sakausēšana (plāksteris) nebija, skat. 23.att. Un tika iegūts tāds pats attēls ar spektriem otrajam paraugam, kur bija stent, skat. 24.att.



23.att. Plāksteris fluorescence attēls, tuvajā infrasarkanajā diapazonā, ar spotiem un attiecīgajiem fluorescence spektriem pirmajam paraugam

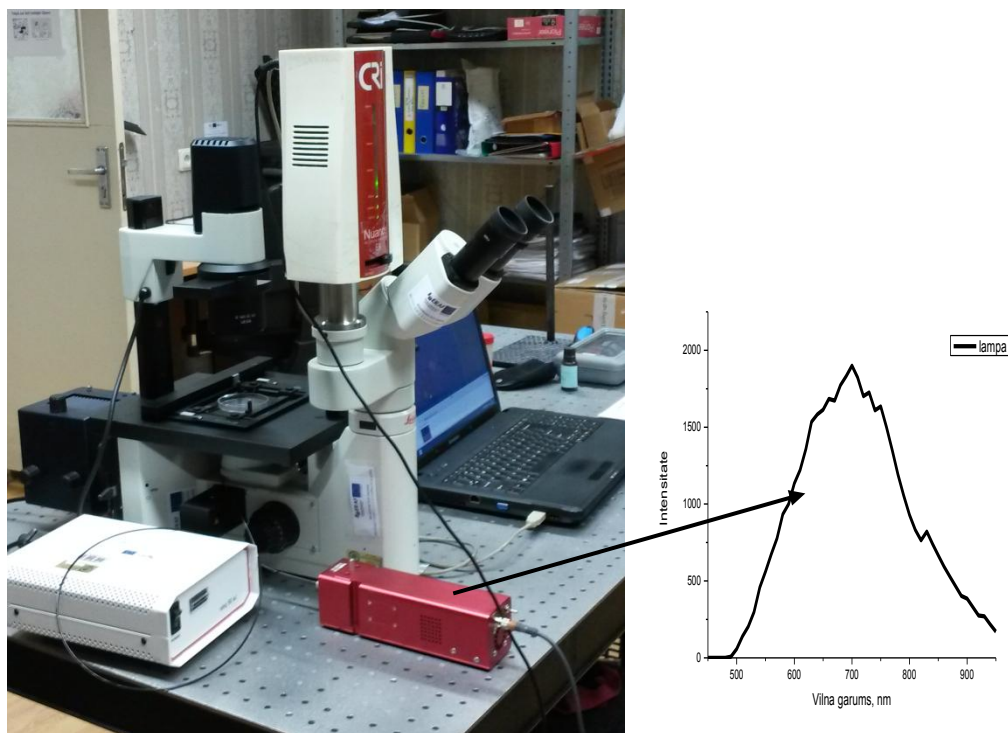


24.att. Plāksteris fluorescence attēls, tuvajā infrasarkanajā diapazonā, ar spotiem un stentu, attiecīgajiem fluorescence spektriem otrajam paraugam

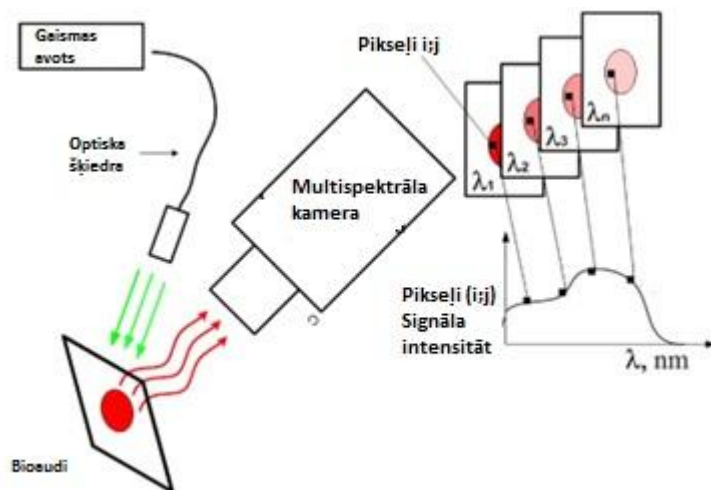
2.2.1.3. Difūzo atstarošanas datu iegūšana

Ja sakausēšanas vieta ir apdedzināta, tad difūzas atstarošanas spektrs būs izmainīts un intensitāte būs zema. Kas mums ļaus saprast, ka ir bijusi vai nu pārlietu liela lāzera jauda, vai arī vajag samazināt pielodēšanas laiku.

Lai iegūtu difūzās atstarošanas spektru, tika izmantota tā pati konstrukcija, bet tika noņemts filtrs ar Hg lampu un aizstāts ar platjoslas gaismas avotu, kurš no apkašas apgaismo paraugu (skat. 25. attēlu).



25.att. Iekārtu attēli difūzās atstarošanas mērīšanai, Hg lampa atslēgta, tās vietā uz paraugu no apakšas, ar optiskās šķiedras palīdzību ir notēmēta gaismas avots ar atbilstošo spektru.



26.att. Eksperimentāla shēma difūzā atstarošanas spektrālo attēlu uzņemšanai [39]

Izmantojot šo aparāturu, saņemam difūzā refleksijas intensitāti. Lai veiktu turpmāko analīzi, ir jāiegūst difūzā atstarošanas koeficienti. Izmantojam formulu:

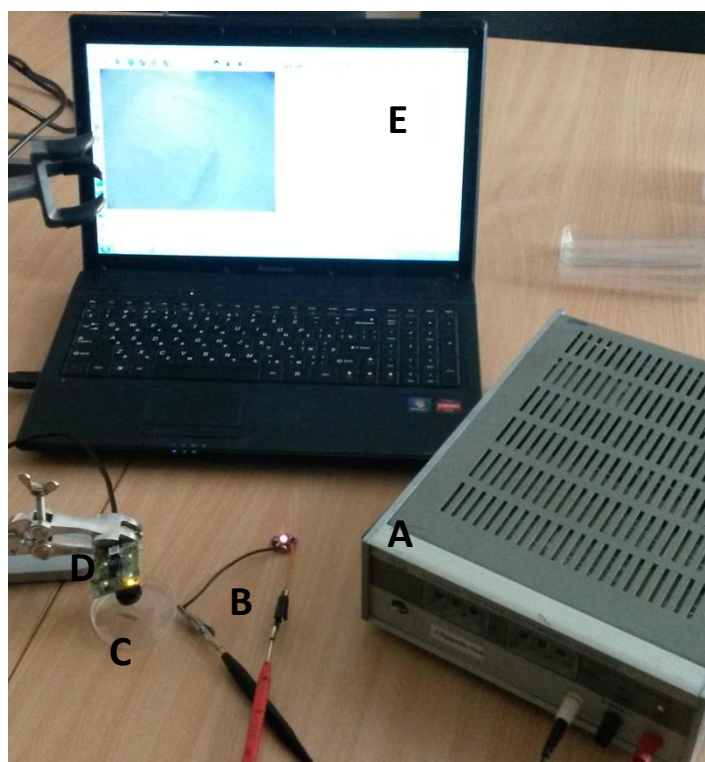
$$R_d = \frac{R_p}{R_o}, \quad (2.1)$$

kur, R_p – parauga difūza atstarošana, R_o – lampas difūza atstarošana. R_o ir iegūts ar šo pašu aparāturu, bet parauga vietā bija balta lapa, jo balta virsma ir teicams atstarotājs.

Iegūto spektru apstrāde notiek ar programmas Origin 8 palīdzību.

2.2.2. ICG makro attēlošana

Papildus tika izveidota metode, lai redzētu ICG visā paraugā. Mums vajadzēs strāvas ģeneratoru ($I=100$ mA un $U=19$ V), diodi ar viļņa garumu 740 nm un kameru ar iebūvētu garš caurlaidības filtru no 810 nm, vizuālai ICG novērošanai tuvajā infrasarkanajā diapazonā. Visas uzskaitītās iekārtas var redzēt 27.attēlā.



- A- Līdzstrāvas avots
- B- Gaismas diode (LED) 740 nm
- C- Paraugs
- D- Optiskā kamera USB 2 uEye LE ar iebūvētu infrasarkanā filtru
- E- Dators ar uzstādītu programmu uEyeCockpit

27.att. Aparatūras ICG attēlošanai paraugā LiVe režīmā attēls

Šī metode dos iespēju ieraudzīt ICG, kas atrodas un saglabājas plāksterī vai arī ar laiku iesūcas artērijā, lai turpmāk tiktu izvadīts no organisma.

3. PĒTĪJUMA REZULTĀTU APSKATS

Tika veikta plāksteru analīze, uz diviem paraugiem: pirmais paraugs –artērija savienota ar bezšuvju metodi, anastomozi uztur plāksteris, otrais paraugs–arī bezšuvju metode, bet asins plūsmas uzlabošanai artērijā, savienojot griezumam, ir ievietots stent un jau pēc tam uzlikts plāksteris. Plākstera adhēzijai ar artēriju izmantoja diožu lāzeri 810 nm ar jaudu 0,9 W ar iedarbības (ekspozīcijas, pielodēšanas) laiku 100 milisekundes.

Pētot paraugus, mūs interesē autofluorescence vietās, kur notika sakausešana (spot) un kur nebija iedarbība ar lāzeri. Bet otrā paraugā papildus aplūkosim virs artērijā ievietotā stenta esošo audu fluorescenci.

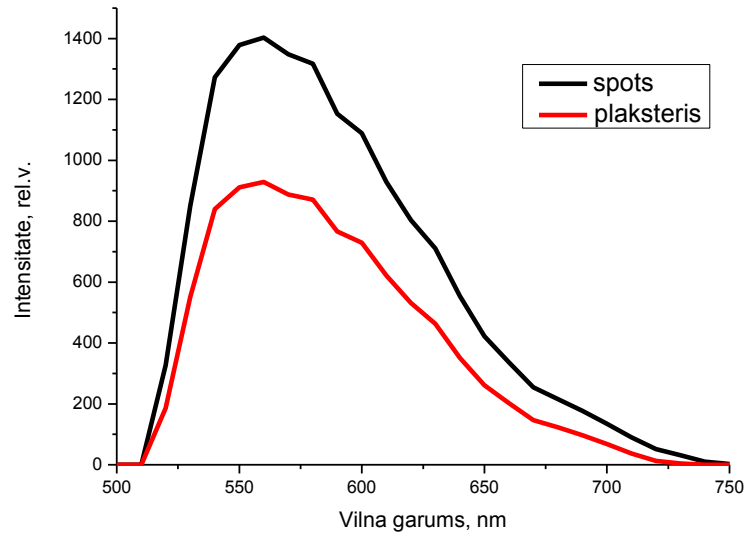
Tāpat atsevišķi ir izpētīti fluorescences spektri tuvajā infrasarkanajā diapazonā, kur atrodas raksturīgais ICG fluorescences spektrs. Ir izanalizētas sakausešanas vietas, plāksteris un otrajam paraugam papildus vietas, kur redzams stent.

Vēlāk tajās pašās mūs interesējošajās vietās ir apskatīts un izanalizēts difūzā atstarošanas spektrs abiem paraugiem.

Papildus tika ietvertas vēl 2 metodes plākstera analīzei: ICG makro attēlojums tuvajā infrasarkanajā diapazonā ar optiskās kameras, infrasarkanā filtra un gaismas diodes palīdzību; autofluorescences intensitātes izmaiņa ar laiku.

3.1. Autofluorescence

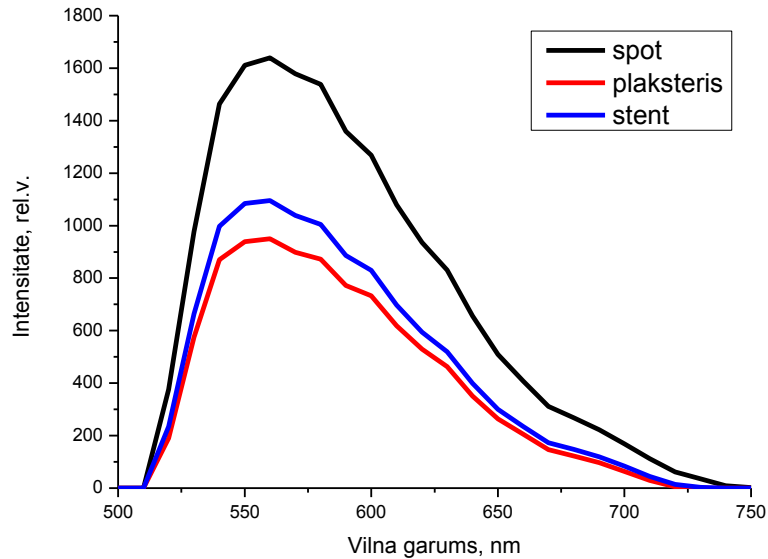
Ar mikroskopa, multispektrālās kameras Nuance EX un citas aparatūras palīdzību (18.attēls) ir iegūti spektri (skat. 21.un 22.attēlu) un pēc tam noteiktas vidējās vērtības ērtākai analīzei, kā arī datu normēšana, kas parādīs, vai fluorescences procesā piedalās viena viela, vai arī papildus izpaužas cita.



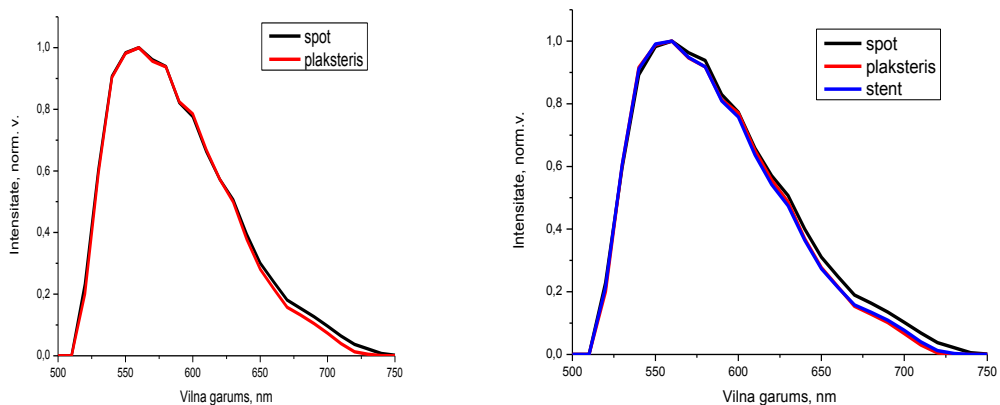
28.att. Autofluorescences vidējā vērtība, sakausēšanas vietā (spot) (41 apgabals) un plāksterā apgabaliem (28) bez sakausēšana, pirmajam paraugam

No 21. un 28.attēla ir uzskatāmi redzams, ka autofluorescences intensitāte sakausēšanas vietās ir lielāka par ~ 35%.

Otrajam paraugam fluorescences starpība starp plāksteri un spotu ir tāda pati kā pirmajam, proti, spotu fluorescence ir lielāka par ~ 40%. Bet varam arī atzīmēt, ka stenta fluorescences intensitāte ir lielāka nekā plāksterim, bet mazāka nekā pielodēšanas vietā (skat. 19.attēlu). Tas izskaidrojams ar materiālu, no kura ir izgatavots stent, stent ir izgatavots no polikaprolaktona (PCL), kurš nefluorescē. Bet stent ir baltā krāsā, kura, kā zināms, atstaro lielāko daļu gaismas. Tātad starojums, kas iziet cauri artērijas sienīņai, nonāk uz stentu, atstarojas no tā un atkal absorbējas artērijā vai plāksterī, kas mums dos lielu fluorescences intensitāti uz atstarotā starojuma rēķina.



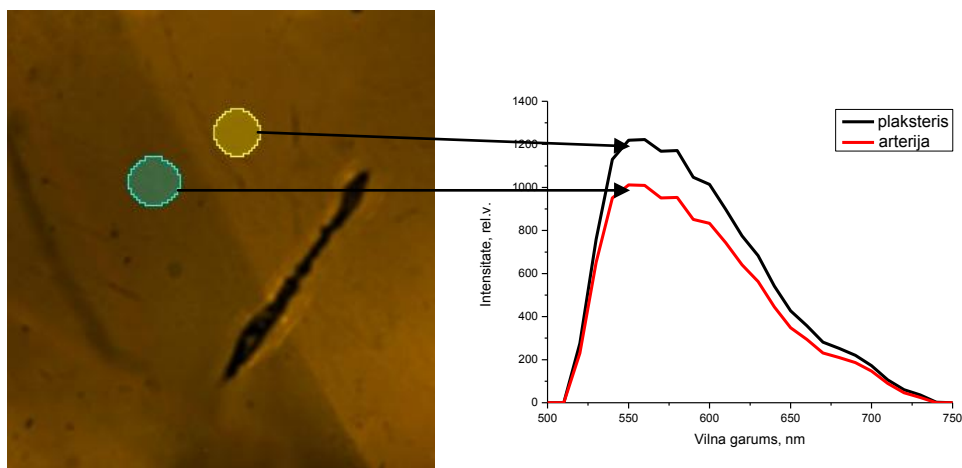
29.att. Otrā parauga autofluorescences vidējā vērtība, sakausēšanas vietā (19), plākštera apgabaliem bez sakausēšanas (8) un stentam (5)



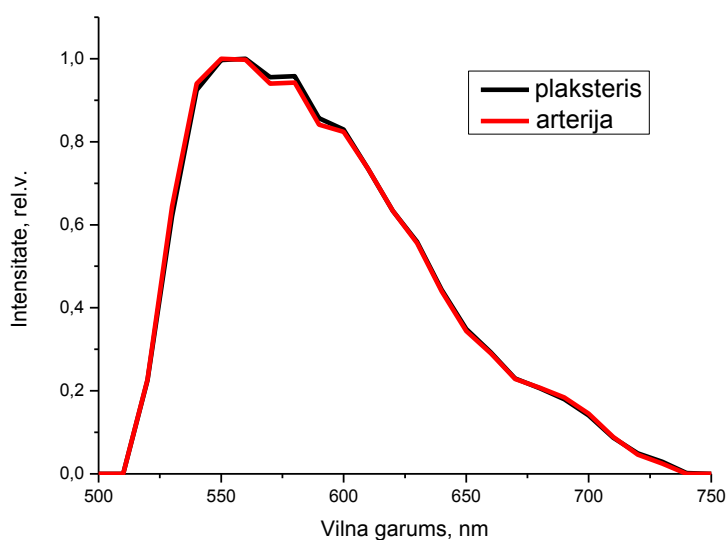
30.att. Normētie dati sakausēšanas un plākštera vietās, kur sakausēšana nebija, pirmajam paraugam, un otrajam paraugam, kad ir stent

Spektri pēc normēšanas ir gandrīz identiski. Pateicoties iegūto autofluorescences spektru normēšanai, mēs redzam, ka fluorescenci izpauž viena viela, jo autofluorescences maksimumiem ir kopīgs maksimums, kas novērojams abos paraugos.

Lai saprastu, vai plāksteris izcelsies uz artērijas fona, autofluorescences ierosināšanas laikā, tika aplūkoti uz artērijas uzlikta plākštera spektri un pati artērija bez plākštera (skat. 31.att.).



31.att. Plākstera un artērijas autofluorescences spektri



32.att. Plākstera un artērijas autofluorescences spektru normētie dati

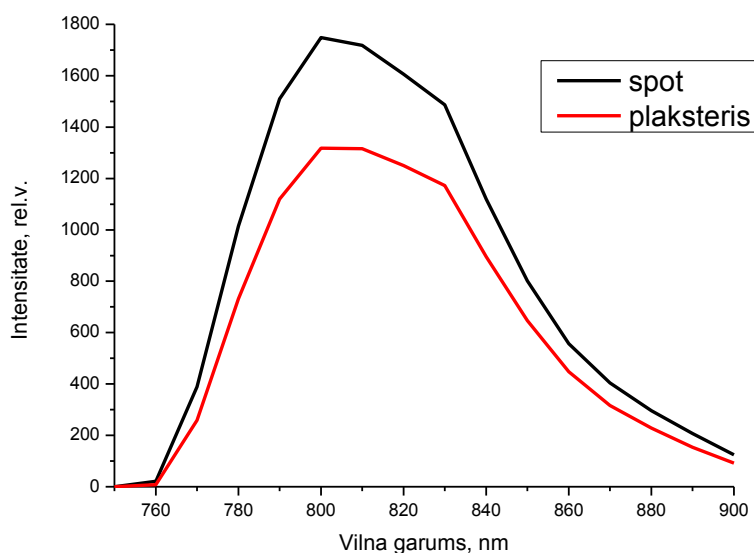
No 31. un 32.attēla izriet, ka, ierosinot ar starojumu 434 nm, fluorescē viena un tā pati viela artērijā un plāksterī. Tomēr plāksteris fluorescē intensīvāk.

Par fluorescējošo viela šobrīd ir pieņemts uzskatīt kolagēnu, no kura sastāv artērija un kurš veidojas pie brūču dzīšanas. Šis secinājums ir balstīts uz kuņģa un zarnu trakta fluorescences intensitātes izmaiņas izpēti, kas tikai veikta ar endoskopijas palīdzību, eksperimentā tika izmantots arī elektromagnētiskais starojums 390-450 nm (zilā gaisma), tā pati, kas arī mūsu eksperimentā autofluorescences ierosināšanai. Galarezultātā tika iegūti analogiski fluorescences spektri, un zinātnieki pieņēma, ka fluorescē kolagēns. Šo eksperimentu veica Kanādā A. Douplik, DeanChen, Margarete K. Akensun citi (pilnais raksta

nosaukums „Assessment of Photobleaching During Endoscopic Autofluorescence Imaging of the Lower GI Tract”).

3.2. ICG fluorescence

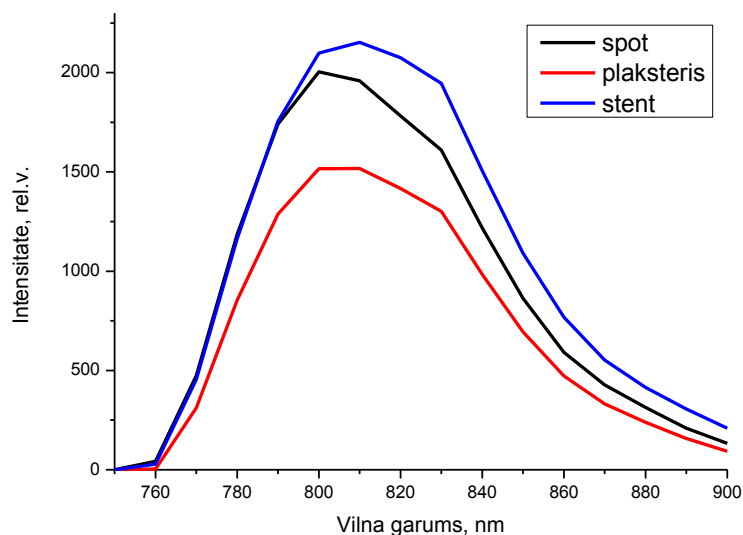
Tālāk ar šiem paraugiem tika veikta ICG fluorescences analīze, ar 18.attēlā redzamās aparatūras palīdzību, tikai izmainot spektrālu diapazonu 750-950 nm. Proti, tika skatīts tuvais infrasarkanais diapazons, kur atrodas raksturīgais ICG fluorescences spektrs, kā parādīts 23. un 24.attēlā.



33.att. Vidējā ICG fluorescences vērtība, sakausēšana vietā (16) un tur, kur sakausēšana nav (9), pirmajam paraugam

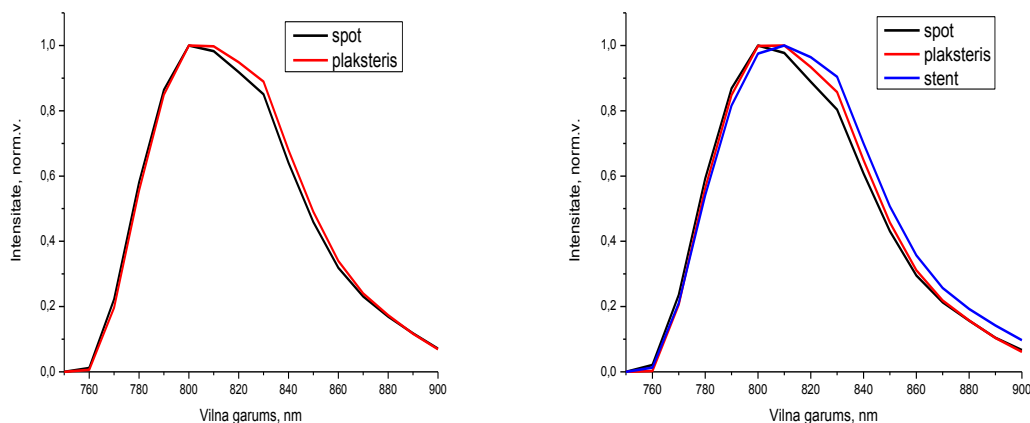
Varam novērot, ka šajā gadījumā sakusēšanas vietas arī fluorescē intensīvāk par ~ 33%..

Otrajā paraugā tuvajā infrasarkanajā diapazonā (34. att.) arī ir labi redzami raksturīgie ICG fluorescences spektri ar maksimumu 806 nm. Bet visintensīvāk fluorescē stent, jo tas atstaro lielāko daļu starojuma, kas bija aprakstīts iepriekš.



34.att. ICG fluorescences vidējā vērtība, sakausēšanas vietā (5), plāksterim bez sakausēšanas (11) un plāksterim vietā, kur redzams stents (6), otrajam paraugam

Datu normēšana parāda, ka fluorescē viena viela – ICG. (35.attēls)

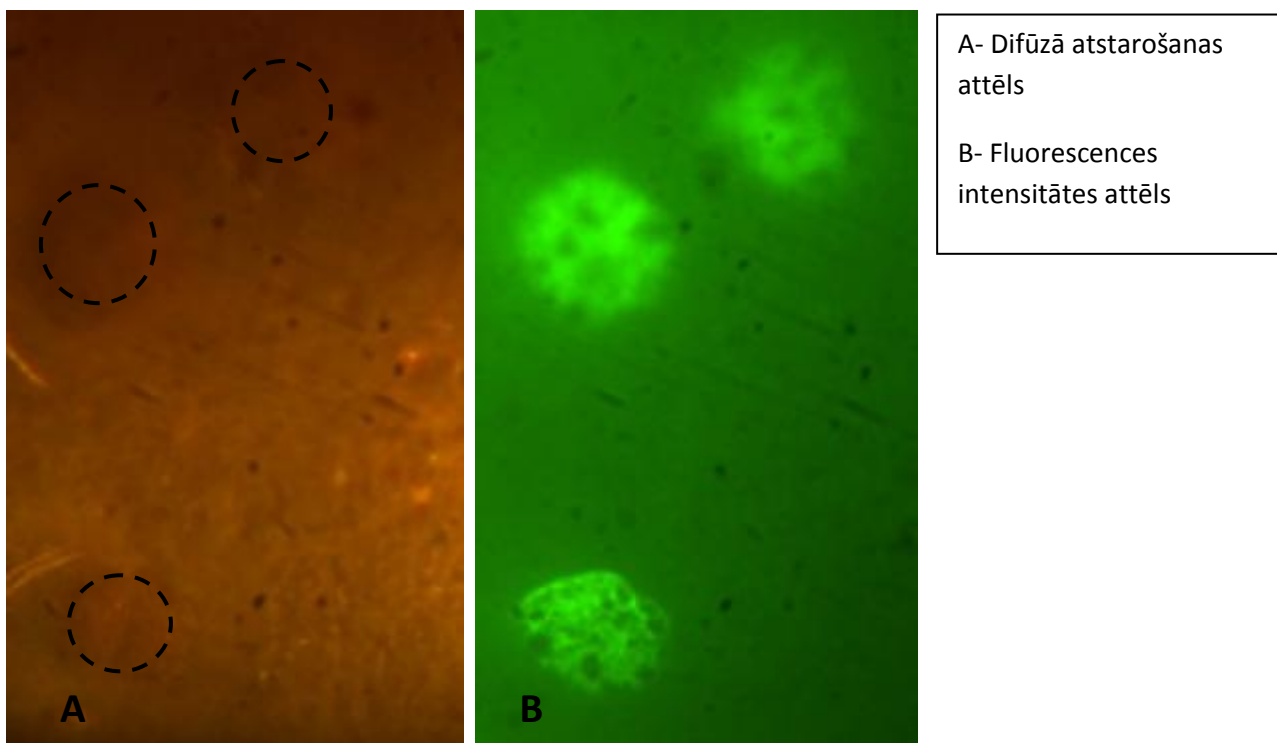


35.att. ICG fluorescences spektru normētie dati sakausēšana (spot), plākstera un stenta vietās, pirmajam un otrajam paraugam

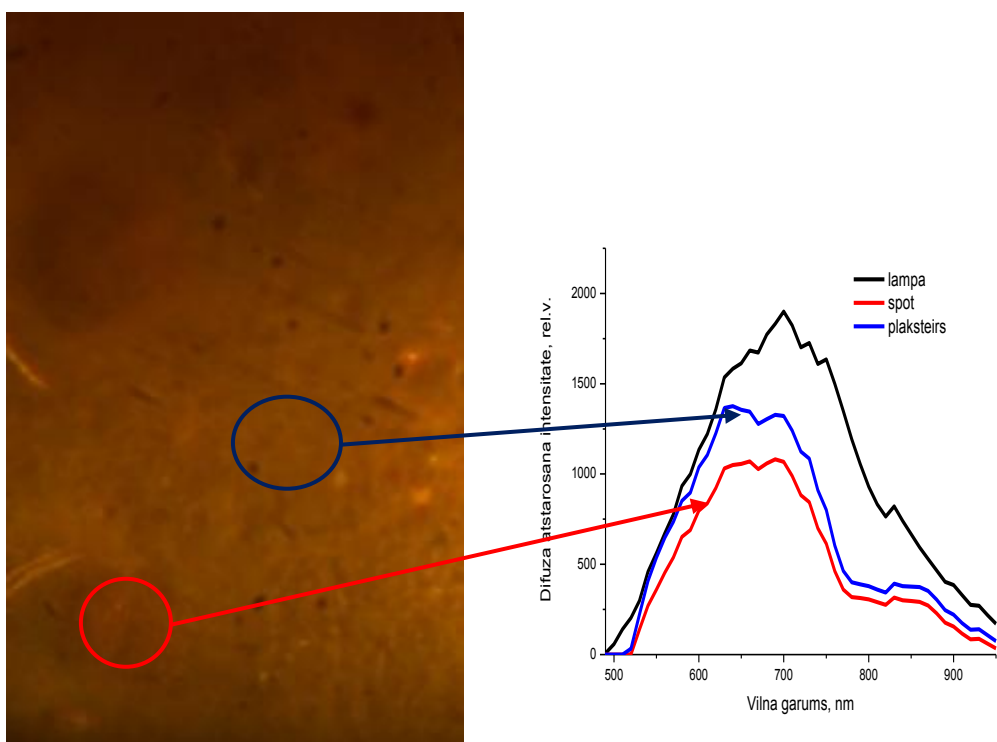
3.3. Difūza atstarošana

Izmantojot 25.attēlā redzamo aparāturu, ir iegūti abu paraugu difūzā atstarošanas spektri. Tika aplūkotas arī sakausēšanas vietas, kur nebija lāzera iedarbības un kur ir redzams stent zem artērijas sienīņas ar plāksteri.

Uzskatāmi aplūkosim iegūto difūzā atstarošanas attēlu, salīdzinot ar autofluorescenci, 36.attēlā, pirmajam paraugam.

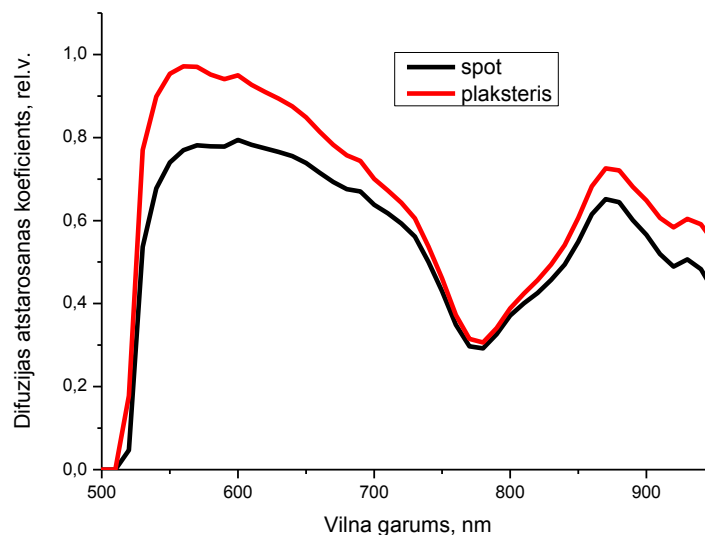


36.att. Iegūtie pirmā parauga difūzās atstarošanas un fluorescences attēli



37.att. Pirmā parauga difūzās atstarošanas attēls ar sakausēšanas vietas, plākstera un lampa spektriem

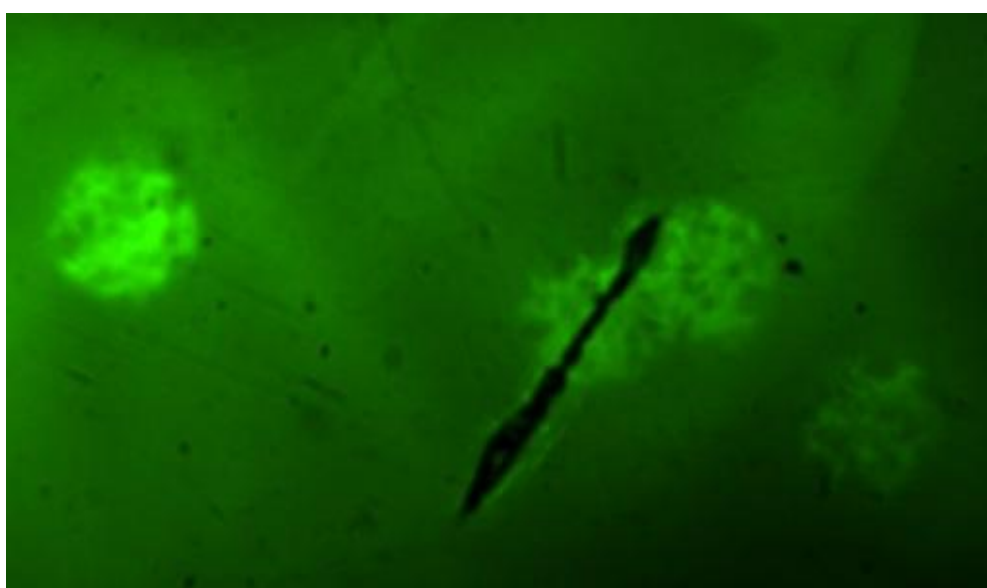
Pēc tam izmantojam formulu (2.1), lai noteiktu difūzā atstarošanas koeficientu, kur R_p – iegūtais spektrs no mūs interesējošās vietas, un R_0 – lampas spektrs. Un precīzai analīzei izmantojam iegūto koeficientu vidējo vērtību sakausēšanas vietās un tur, kur sakausēšana nebija.



38.att. Difūzās atstarošanas koeficientu vērtības sakausēšanas (19) un plāksterā vietās (16) pirmajam paraugam

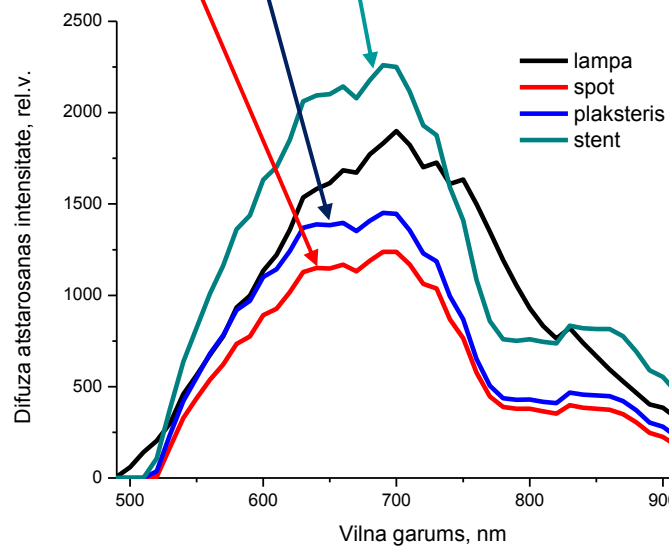
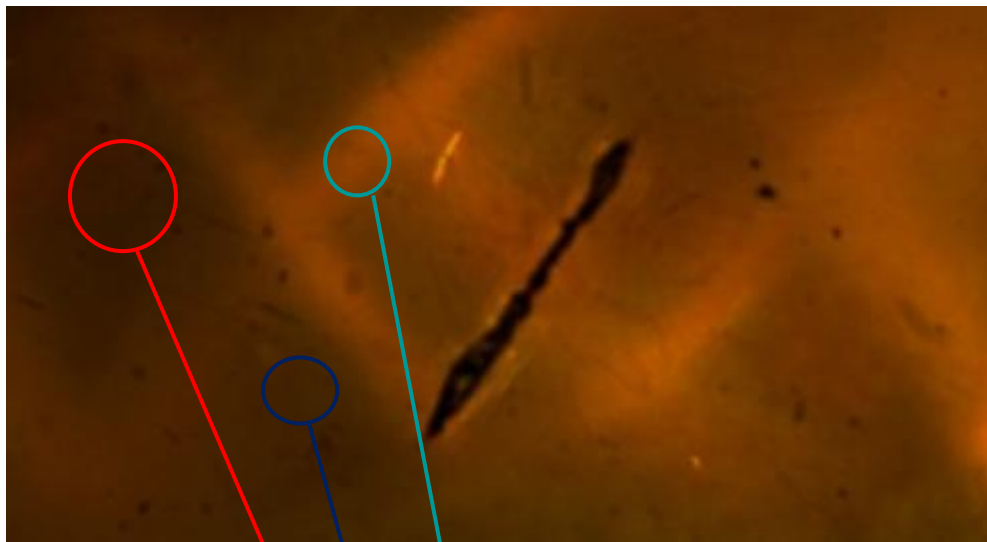
Iegūtie difūzā atstarošanas spektri uzskatāmi parāda, ka ICG pie sakausēšanas netika sagrauts, bet, tieši otrādi, nostiprināts sakausēšanas vietās. Toties hitozāns sakausēšanas laikā ir nedaudz sagrauts, par to liecina difūzā atstarošanas koeficienta samazināšanās sakausējuma vietās atšķirībā no plāksterā, kur nebija iedarbības ar lāzeri. Bet mēs arī neredzam, ka sakausēšanas vietas operācijas laikā būtu sākušas piedegt. Šajā gadījumā difūzā atstarošanas koeficients sakausēšanas vietās būtu bijis ievērojami mazāks un starojuma absorbcija ICG vielā nebūtu tik izteikta vai tās nemaz nebūtu, proti, maksimuma pie 776 nm nemaz nebūtu.

Ar otro paraugu tika veikta tā pati procedūra, bet papildus tika aplūkotas vietas, kur cauri spīd stent.

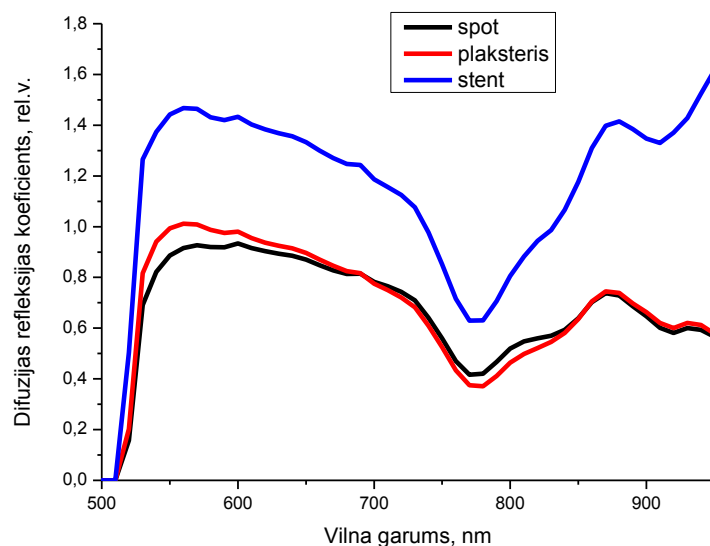


39. un 40. att. Iegūtie otrā parauga difūzā atstarošana un fluorescences attēli

Uzskatami redzams, ka sakausēšanas vietas ir labāk redzamas, ierosinot autofluorescenci, nekā difūzā atstarošanas gadījumā vai pie ICG fluorescences tuvajā infrasarkanajā diapazonā. Tādējādi, spotu monitoringam ir jāizvēlas autofluorescence ar ierosināšanu 434 nm.



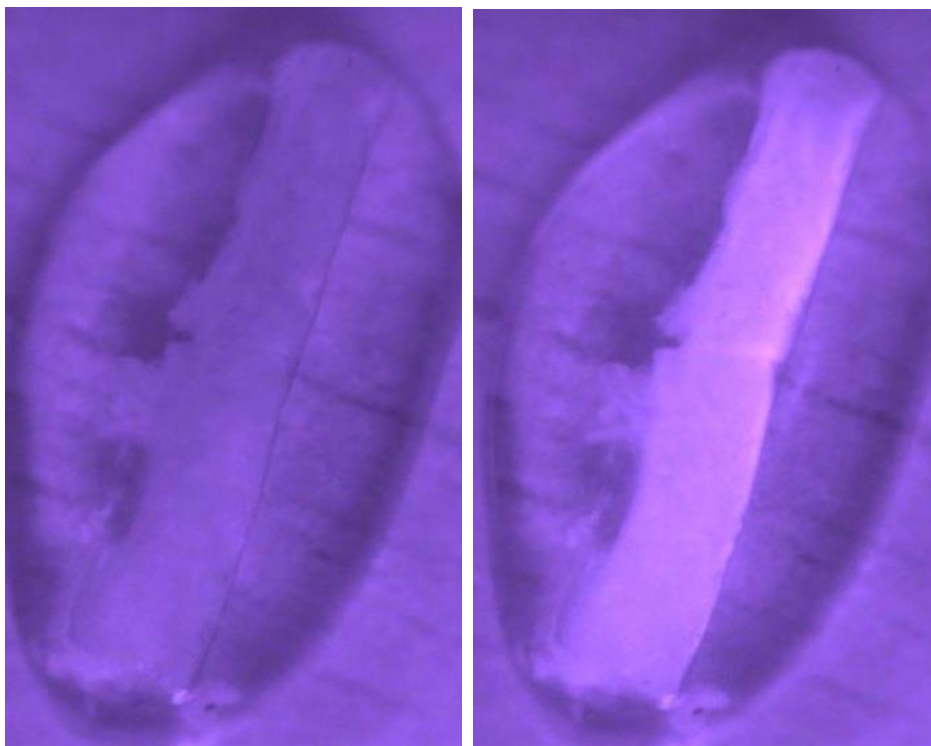
41.att. Difūzās atstarošanas attēls ar sakausēšanas vietas, plāksteris, stenta un lampa spektriem otrajam paraugam



42.att. Difūzās atstarošanas koeficientu vidējās vērtības sakausēšanas (19), plāksterā (21) un stenta (15) vietās otrajam paraugam

3.4. ICG makro attēlošana

Papildus ar 27.attēlā redzamās aparatūras palīdzību tuvajā infrasarkanajā diapazonā ir iegūti attēli ar LED 740 nm, optiskās kameras un infrasarkanā filtra palīdzību.



43.att. Pirmā parauga attēls tuvajā infrasarkanajā diapazonā bez un ar LED iedarbību



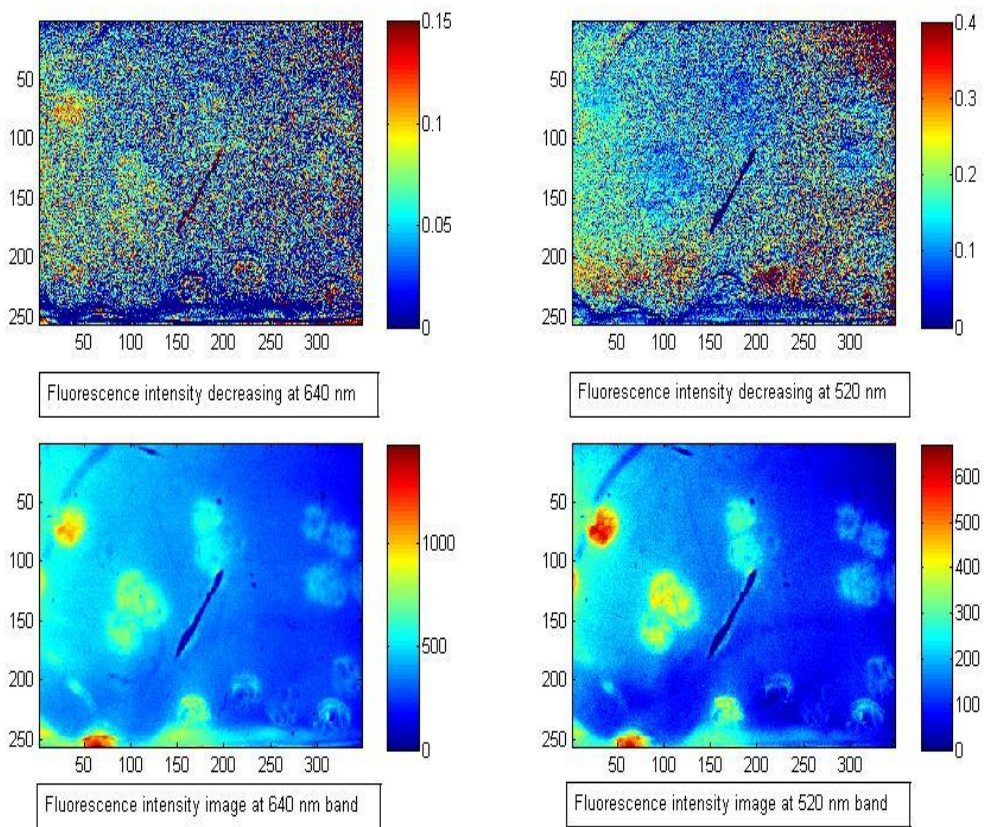
44.att. Otrā parauga attēls tuvajā infrasarkanajā diapazonā bez un ar LED iedarbību

Attēli uzskatāmi parāda, ka ICG sāka izplatīties pa artēriju, jo nav redzama skaidra robeža starp plāksteri un artēriju. Stent ir spilgtāk un labāk redzams, jo atstaro lielāko daļu starojuma, kas iet caur artēriju, ar ko divkārtšo absorbciju virs tā pieguļošajā artērijā un plāksterī, tādējādi ICG fluorescences intensitāte palielinās.

3.5. Autofluorescences intensitātes izmaiņas nepārtrauktās ierosmes laikā

Kā papildu metode tika veikta parauga analīze, kā izmainīsies autofluorescences intensitāte 3 minūtēs, pie viļņa garuma 520 un 640 nm. Aprēķins ir veikts ar koda (8.pielikumā) un programmas Matlab palīdzību, kas jau agrāk ir uzrakstīta LU Atomfizikas un Spektroskopijas institūtā.

Attēli rāda (skat.45.att.), ka fluorescences intensitāte pēc autofluorescences intensitātes maksimuma paiesanas (pie 560 nm) pavājinās ātrāk.



45.att. Fluorescences intensitātes izmaiņa laikā pie viļņa garuma 520 un 640 nm

Secinājumi un rekomendācijas

Darba laikā ir iegūti šādi secinājumi:

1. Ir izpētīta literatūra par krāsvielas indocianīnzaļā (ICG), hitozāna un artērijas optiskajām īpašībām;
2. Izvēlēti aparatūras elementi autofluorescences intensitātes, ICG fluorescences intensitātes un difūzā atstarošanas vizualizācijai, balstoties uz literatūras informāciju;
3. Ir iegūti un analizēti autofluorescences intensitātes spektri, fluorescences intensitātes spektri tuvajā infrasarkanajā diapazonā un difūzā atstarošanas spektri paraugiem;
4. Autofluorescences intensitāte 500-750 nm diapazonā vislabāk attēlo sakausēšanas vietas, ierosinājot ar gaismas viļņa garumu 434 nm;
5. Sakarā ar to, ka ICG nokļūst artērijā, turpmāk ICG makro attēlošanu būtu lietderīgi izmantot artērijas dzīšanas monitoringam ;
6. Izvēlētā doza (0,9 W un 100 ms) plākstera sakausēšanai labi der operācijas veikšanai, jo nekādas novirzes nav atrastas fluorescences metodēs un difūzā atstarošanā.

Rekomendācijas

1. Veikt lielāku paraugu skaitu analīzi, ar dažādu dzīšanas laiku pēc operācijas (5 dienas, 15 dienas, 30 dienas);
2. Veikt klīniskie pētījumi reālos apstākļos ICG fluorescence makro attēlošanai in vivo pēc operācijas;
3. Izveidot aparatūru un uzrakstīt programmu plākstera sakausēšanas monitoringam Live režīmā operācijas laikā uz artērijas, pamatojoties uz autofluorescences metodi, lai kontrolēt sakausēšanu ne tikai vienā punktā, bet arī blakus punktiem, varbūt būs vajadzīgs nomainīt devu (lāzeru jaudu un ekspozīciju).

Izmantotās literatūras un interneta avotu saraksts

1. В.В. Тучин, *Лазеры и волоконная оптика в биомедицинских исследованиях*. ФИЗМАТЛИТ, 2010
2. Википедija, *Asinsrites orgānu sistēma*. pieejams - https://lv.wikipedia.org/wiki/Asinsrites_orgānu_sistēma
3. BIOTRONIK, *Кровеносные сосуды*. pieejams - http://www.biotronik.com/wps/wcm/connect/ru_ru_web/biotronik/sub_top/patients/Heart_and_circulation_en/Blood_and_pulmonary_circulation/Blood_vessels
4. AyZdorov, *Функции кровеносных сосудов – артерии, капилляры, вены*. pieejams - http://www.ayzdorov.ru/lechenie_sosydi_cho.php
5. Медицина и высокие технологии, *Строение артерии, общие сведения*, 2014. pieejams - http://www.med007.ru/publ/anatomija_cheloveka/stroenie_arterii_obshhie_svedenija/23-1-0-1564
6. Uzdevumi, *Asinsvadu veidi*. pieejams - <http://www.uzdevumi.lv/p/biologija/12-klase/asinsrite-7792/re-20b4346e-0abf-4de3-9fc9-2e6ffd722c21>
7. Медицинская информационная сеть, Г.Г. Арабидзе, *Кровяное давление. Гипертоническая болезнь и гипотоническая болезнь*. pieejams - <http://www.medicinform.net/human/humanis/human47.htm>
8. А.Е.Пушкарева, *Методы математического моделирования в оптике биоткани*. Учебное пособие, ИТМО государственный университет, Санкт-Петербург, 2008
9. А.Н.Башкатов, *Управление оптическими свойствами биотканей при воздействии на них осмотически активными иммерсионными жидкостями*. Диссертация на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук, Саратовский ордена трудового красного знамени государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, Саратов 2002
10. В.В.Тучин, *Исследование биотканей методами светорассеяния, Успехи физических наук*. Том 167, №5, 1997
11. Википедия, *Флуоресценция*. pieejams - <https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%A4%D0%BB%D1%83%D0%BE%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%86%D0%B8%D1%8F#.D0.9F.D1.80.D0.B8.D0.BC.D0.B5.D0.BD.D0.B5.D0.BD.D0.B8.D0.B5>
12. Беломнимед, С.Гранько, О. Лапатин, А. Бутвиловский, *Применение количественной световой флуоресценции при минимально инвазивном лечении начальных кариозных поражений методом инфльтрации*. 2011, pieejams - <http://belomnimed.by/stati/primenenie-kolichestvennoj-svetovoj-fluorencii-pri-minima.html>
13. Традиция, *Флуоресценция*. pieejams - <https://traditio.wiki/%D0%A4%D0%BB%D1%83%D0%BE%D1%80%D0%B5%D1%81%D1%86%D0%B5%D0%BD%D1%86%D0%B8%D1%8F>
14. И.В.Турчин, *Оптический биомиджинг*, лекция 1, ИПФ РАН, отдел радиофизических методов в медицине. НижГМА, научная лаборатория флуоресцентного биомиджинга НИИ БМТ. Нижний Новгород 2013, pieejams - http://niibmt.nizhgma.ru/_resources/directory/6/common/turchin1.pdf

15. Н.М.Эмануэль, М.Г.Кузьмин, *Экспериментальные методы химической кинетики: Учебное пособие*. Изд-во Московского университета, 1985, стр. 115-
16. В.Н.Федорова, Е.В.Фаустов, *Медицинская и биологическая физика. Курс лекций с задачами: учеб. пособие*. 2008, 592с.
17. *Люминесценция и люминесцентные методы анализа*. pieejams - http://chemanalytica.com/book/novyy_spravochnik_khimika_i_tekhnologa/04_analiticheskaya_khimiya_chast_III/4022
18. С.В. Иванова, Л.Н. Кирпичёнок, *Использование флуоресцентных методов в медицине*. Витебский государственный медицинский университет. Медицинские новости. – 2008. – № 12. – С. 56-61.
19. Оптические методы исследований в онкологии, *Медико-биологические аспекты флуоресцентной диагностики*. ФГБУ "НИИГБ" РАМН 2013, pieejams - http://www.cancerplot.ru/mediko-biologicheskie_aspekty_fluorescentnoj_diagnosticski
20. Школа для электрика, *Виды электромагнитного излучения*. pieejams - <http://electricalschool.info/spravochnik/poleznoe/822-vidy-jelektromagnitnogo-izlucheniya.html>
21. Энциклопедия Кругосвет, *Электромагнитное излучение*. pieejams - http://www.krugosvet.ru/enc/nauka_i_tehnika/fizika/ELEKTROMAGNITNOE_IZLUCHENIE.html
22. UFO, *Siltuma starojums*. pieejams - http://www.ufoterm.lv/?l=3&item_id=18&id=50
23. Энциклопедия физики и техники, *Инфракрасное излучение*. pieejams - http://femto.com.ua/articles/part_1/1411.html
24. Википедия, *Инфракрасное излучение*. pieejams - https://ru.wikipedia.org/wiki/%D0%98%D0%BD%D1%84%D1%80%D0%B0%D0%BA%D1%80%D0%B0%D1%81%D0%BD%D0%BE%D0%B5_%D0%B8%D0%B7%D0%BB%D1%83%D1%87%D0%B5%D0%BD%D0%B8%D0%B5
25. P. Chetoni1, S. Burgalassi, D. Monti, u.c., *Healing of rabbits cornea following laser welding: effect of solid and semisolid formulations containing indocyanine green*. J. DRUG DEL. SCI. TECH., 17 (1) 25-31 2007
26. Francesca Rossi, Paolo Matteini, Fulvio Ratto u.c., *Laser bonding with ICG-infused chitosan patches: preliminary experiences in suine dura mater and vocal folds*. Proc. of SPIE Vol. 9129 9129L-1, 2014
27. Medbe, Нычик А.3., *Соединение кровеносных сосудов*. pieejams - <http://medbe.ru/materials/khirurgicheskie-shvy-i-shovnye-materialy/soedinenie-krovenosnykh-sosudov/>
28. G. Esposito, F. Rossi, P. Matteini, *In vivo Laser Assisted Microvascular Repair and End-to-End Anastomosis by Means of Indocyanine Green-Infused Chitosan Patches: A Pilot Study*. Lasers in Surgery and Medicine 45:318–325, 2013
29. Саратовский государственный университет им. Н.Г. Чернышевского, *Хитин и хитозан*. pieejams - <http://www.studfiles.ru/preview/4582362/>
30. *Хитозан, Хитозан в медицине и косметологии*. pieejams - <http://chitosanfortex.ru/chitin4.html>
31. Сайт Сальковой Валентины о продуктах пчеловодства, *Самые важные свойства хитозана*. pieejams - http://www.salkova.ru/Product_bee/Hitin/properties.php

32. Haowen Huang, Fang Liu, Shenna Chen, u.c., *Enhanced fluorescence of chitosan based on size change of micelles and application to directly selective detecting Fe³⁺ in human serum*. *Biosensors and Bioelectronics* 42, 539–544, 2013
33. Yoshitomo Ashitate, Alan Stockdale, Hak Soo Choi, Rita G. Laurence, u.c., *Real-Time Simultaneous Near-Infrared Fluorescence Imaging of Bile Duct and Arterial Anatomy*. *Journal of Surgical Research* 176, 7–13 (2012)
34. Фармацевтическая компания Армида, *Индоцианин зелёный ICG-PULSION*. pieejams - <http://www.fcarmida.ru/icg-pulsion/>
35. T. Desmettre, J.M. Devoisselle, and S. Mordon, *Fluorescence Properties and metabolic Features of Indocyanine Green (ICG) as Related to Angiography*. *Survey of ophthalmology* volume 45, Number 1, july-august 2000
36. S. Mordon, J.M. Devoisselle, S. Soulie-Begu and T. Desmettre, *Indocyanine Green: Physicochemical Factors Affecting Its Fluorescence in Vivo*. *Microvascular Research* 55, 146-152, 1998
37. F. Rossi, P. Matteini, F. Ratto, u.c., *Experimental study on laser assisted vascular repair and anastomosis with ICG-infused chitosan films*. 978-1-4244-9837-6/11/, 2011 IEEE
38. F. Rossi, P. Matteini, F. Ratto, R. Pini, u.c. *Laser bonding with ICG-infused chitosan patches: preliminary experiences in suine dura mater and vocal folds*. *Proc. of SPIE* Vol. 9129 91292L-1, 2014
39. J. Spigulis, A. Lihachev, R. Erts, *Imaging of laser-excited tissue autofluorescence bleaching rates*. *Applied Optics* Vol. 48, Issue 10, pp. D163-D168 (2009)
40. Ю.П.Синичкин, *Флуоресцентная спектрально-поляризационная диагностика биологических тканей in vivo*. Автореферат диссертации на соискание ученой степени доктора физико-математических наук, Работа выполнена на кафедре оптики и кафедре лазерной и компьютерной физики Саратовского государственного университета и в НИИМФ СГУ, Саратов, 2003, 34 стр.

Pielikumi

Izmantoto instrumentu saraksts

Multispektrāla attēlošanas kamera

Modelis: Nuance EX (Cambridge Research Institute, UK), N-MSI-EX

Serial No:70364

Spektrālais diapazons: 450-950 nm

Spektrālā izšķiršanas spēja: ≈ 2 nm

Mikroskops Leica

Modelis: DMIL LED Fluo

Max. palielinājums: x200

LED max.10W

Hg lampa

Max. 100W

Barošanas bloks Hg lampai LEJ

Modelis: ebq 50 ac-L

Max. 90 VA

Filtrs

Viļņa garums: 434 nm

Filtrs

Modelis: 810AGLP

Viļņa garums: 810-... nm

LED APG2C1-740

Struktūra: GaAlAs

Viļņa garums: 740 nm

Optiska kamera

Modelis: USB 2 uEye LE

Ātrdarbība: ≤ 87 kadri/sekundē

Attēlu formāts: 752 x 480–3840 x 2748

Gaismas avots

Modelis: Thorlabs SLS202(/M)

300 - 2600 nm

Elektriska jauda: 9W

Autofluorescences vidēji dati un tās standart novirze pirmajam paraugam*p.1.tabula*

λ, nm	Spots		Plaksteris	
	Vidēja intensitate	Standart novirze	Vidēja intensitate	Standart novirze
500	0	0	0	0
510	0,00	0,01	0	0
520	327,14	198,32	186,20	83,10
530	849,94	424,33	550,49	175,03
540	1272,52	602,10	839,32	243,55
550	1379,03	649,70	911,34	255,54
560	1402,76	661,05	928,75	259,50
570	1348,04	639,04	888,03	246,04
580	1316,83	625,41	870,83	243,04
590	1152,71	552,96	766,06	221,64
600	1089,23	531,13	729,29	215,31
610	929,35	467,91	621,49	194,75
620	803,38	415,88	531,49	173,89
630	710,69	376,29	463,60	155,26
640	553,77	310,27	350,93	125,68
650	421,93	251,10	260,78	104,73
660	335,99	211,72	201,96	90,92
670	254,19	173,10	146,32	75,17
680	215,74	154,36	122,60	69,83
690	177,19	135,53	97,08	63,11
700	135,03	112,66	68,15	52,88
710	89,88	83,97	36,67	35,60
720	51,62	56,53	12,33	19,97
730	31,20	38,79	4,36	11,09
740	10,24	15,79	0,29	1,16
750	2,35	5,01	0,01	0,03

Autofluorescences vidēji dati un tās standart novirze otrajam paraugam*p.2.tabula*

λ , nm	spots		Plaksteris		Stents	
	Vidēja intensitate	Standart novirze	Vidēja intensitate	Standart novirze	Vidēja intensitate	Standart novirze
500	0	0	0	0	0	0
510	0	0	0	0	0	0
520	376,00	122,76	190,27	79,25	234,92	47,31
530	977,34	254,40	574,58	168,92	663,73	104,66
540	1463,76	362,95	870,07	238,37	997,90	143,38
550	1610,77	408,49	939,31	247,45	1084,85	145,63
560	1639,70	412,94	950,22	251,26	1095,39	150,34
570	1578,40	403,07	898,95	240,21	1038,64	138,30
580	1537,95	395,96	872,36	235,68	1005,07	138,00
590	1359,65	351,49	772,12	209,95	886,54	124,34
600	1268,37	332,43	732,32	196,20	830,19	123,91
610	1079,26	287,61	618,68	169,63	697,75	110,96
620	935,97	251,91	529,64	148,68	594,26	96,34
630	831,18	227,71	462,40	135,19	519,29	83,55
640	656,39	189,78	351,10	106,69	398,98	70,99
650	508,96	152,39	263,63	86,30	299,92	62,15
660	407,11	127,92	205,03	70,41	234,22	56,38
670	310,87	106,52	146,39	57,14	173,21	46,79
680	268,06	97,98	122,06	51,80	147,56	45,28
690	221,88	87,54	96,74	44,12	119,75	43,52
700	168,45	73,91	63,23	33,71	84,39	40,33
710	112,42	57,53	29,04	21,46	44,19	31,49
720	61,30	41,01	4,84	6,53	13,72	16,79
730	35,59	31,30	0,34	0,66	3,35	4,94
740	8,73	13,52	0	0	0	0
750	1,53	3,45	0	0	0	0

ICG fluorescence vidēji dati un tās standart novirze pirmajam paraugam*p.3.tabula*

λ , nm	Spots		Plaksteris	
	Vidēja intensitate	Standart novirze	Vidēja intensitate	Standart novirze
750	0	0	0	0
760	20,84	22,68	7,99	16,25
770	389,10	118,80	259,17	119,59
780	1014,80	255,17	731,74	238,61
790	1509,96	349,42	1119,56	338,20
800	1748,11	392,59	1318,34	362,88
810	1718,06	367,41	1315,39	337,72
820	1605,98	361,25	1250,51	286,52
830	1486,48	340,45	1172,86	264,26
840	1119,98	269,27	895,72	200,00
850	801,82	199,93	646,60	148,46
860	557,30	147,20	447,47	112,22
870	404,03	116,63	316,71	88,17
880	296,31	92,48	228,65	71,50
890	206,70	74,11	153,92	58,21
900	124,62	57,46	91,53	46,53
910	64,71	41,07	45,55	29,69

ICG fluorescence vidēji dati un tās standart novirze otrajam paraugam

p.4.tabula

λ , nm	spots		Plaksteris		stents	
	Vidēja intensitate	Standart novirze	Vidēja intensitate	Standart novirze	Vidēja intensitate	Standart novirze
750	0	0	0	0	0	0
760	42,16	24,88	3,78	5,39	27,77	17,64
770	473,51	126,33	311,74	68,38	454,01	56,64
780	1186,80	262,34	854,80	146,50	1165,02	104,85
790	1740,67	374,57	1287,25	206,98	1755,66	160,61
800	2004,55	425,80	1515,79	235,77	2099,14	159,68
810	1958,98	413,67	1517,55	242,76	2152,62	149,05
820	1782,15	365,98	1417,25	239,67	2075,79	130,75
830	1610,84	311,97	1301,37	238,70	1946,12	118,86
840	1218,29	234,82	983,68	188,70	1505,70	107,92
850	864,32	161,16	694,82	149,04	1091,33	94,92
860	591,72	113,82	472,41	112,11	768,50	71,03
870	427,07	83,42	331,38	86,09	552,86	53,21
880	314,42	67,01	238,58	69,22	414,40	38,41
890	209,38	47,46	157,31	58,40	306,36	33,76
900	133,64	39,09	92,40	44,12	209,37	23,86

Difūzas atstarošanas vidēji dati un tās standart novirze pirmajam paraugam*p.5.tabula*

λ , nm	Spots		Plāksteris	
	Vidējais vērtējums	Standart novirze	Vidējais vērtējums	Standart novirze
520	0,05	0,06	0,18	0,13
530	0,54	0,16	0,77	0,22
540	0,68	0,15	0,90	0,21
550	0,74	0,15	0,95	0,21
560	0,77	0,15	0,97	0,21
570	0,78	0,15	0,97	0,20
580	0,78	0,15	0,95	0,19
590	0,78	0,14	0,94	0,18
600	0,79	0,14	0,95	0,18
610	0,78	0,13	0,93	0,17
620	0,77	0,13	0,91	0,16
630	0,77	0,13	0,89	0,16
640	0,76	0,12	0,88	0,15
650	0,74	0,12	0,85	0,14
660	0,72	0,12	0,81	0,14
670	0,69	0,12	0,78	0,13
680	0,68	0,11	0,76	0,13
690	0,67	0,11	0,74	0,13
700	0,64	0,11	0,70	0,12
710	0,62	0,11	0,67	0,12
720	0,59	0,10	0,64	0,12
730	0,56	0,10	0,61	0,11
740	0,50	0,09	0,54	0,10
750	0,43	0,08	0,46	0,09
760	0,35	0,07	0,37	0,08
770	0,30	0,07	0,31	0,08
780	0,29	0,07	0,31	0,08
790	0,33	0,08	0,34	0,09
800	0,37	0,09	0,39	0,10
810	0,40	0,09	0,42	0,10
820	0,43	0,09	0,46	0,10
830	0,46	0,09	0,49	0,10
840	0,49	0,10	0,54	0,10
850	0,55	0,11	0,61	0,11
860	0,61	0,12	0,68	0,11
870	0,65	0,13	0,73	0,12
880	0,64	0,14	0,72	0,12
890	0,60	0,14	0,68	0,12
900	0,57	0,14	0,65	0,12

910	0,52	0,14	0,61	0,12
920	0,49	0,15	0,58	0,13
930	0,51	0,15	0,60	0,14
940	0,48	0,17	0,59	0,15
950	0,43	0,19	0,55	0,16

Difūzas atstarošanas vidēji dati un tās standart novirze otrajam paraugam

p.6.tabula

λ , nm	spots		Plaksteris		stents	
	Vidējais vērtējums	Standart novirze	Vidējais vērtējums	Standart novirze	Vidējais vērtējums	Standart novirze
520	0,16	0,14	0,20	0,16	0,50	0,15
530	0,69	0,30	0,82	0,26	1,26	0,21
540	0,82	0,29	0,94	0,26	1,37	0,20
550	0,89	0,29	0,99	0,26	1,44	0,21
560	0,92	0,29	1,01	0,25	1,47	0,21
570	0,93	0,29	1,01	0,25	1,46	0,21
580	0,92	0,27	0,99	0,23	1,43	0,20
590	0,92	0,27	0,98	0,22	1,42	0,20
600	0,93	0,26	0,98	0,21	1,43	0,19
610	0,92	0,25	0,96	0,20	1,40	0,19
620	0,90	0,24	0,94	0,19	1,38	0,18
630	0,89	0,23	0,92	0,19	1,37	0,18
640	0,89	0,23	0,91	0,18	1,36	0,18
650	0,87	0,23	0,90	0,18	1,33	0,18
660	0,85	0,22	0,87	0,17	1,30	0,18
670	0,83	0,22	0,85	0,17	1,27	0,18
680	0,81	0,22	0,82	0,17	1,25	0,17
690	0,81	0,22	0,82	0,17	1,24	0,17
700	0,78	0,21	0,78	0,17	1,19	0,17
710	0,76	0,21	0,75	0,17	1,16	0,17
720	0,74	0,21	0,72	0,17	1,12	0,17
730	0,71	0,21	0,68	0,16	1,08	0,17
740	0,64	0,19	0,61	0,15	0,98	0,16
750	0,56	0,17	0,53	0,13	0,85	0,14
760	0,47	0,15	0,43	0,12	0,72	0,13
770	0,42	0,14	0,37	0,11	0,63	0,12
780	0,42	0,15	0,37	0,11	0,63	0,13
790	0,47	0,17	0,41	0,13	0,71	0,14
800	0,52	0,19	0,46	0,14	0,81	0,16
810	0,55	0,20	0,50	0,15	0,88	0,16
820	0,56	0,20	0,52	0,16	0,94	0,16
830	0,57	0,20	0,55	0,16	0,99	0,16
840	0,59	0,21	0,58	0,16	1,07	0,17
850	0,64	0,22	0,64	0,18	1,18	0,18
860	0,70	0,24	0,71	0,20	1,31	0,20
870	0,74	0,26	0,74	0,21	1,40	0,21
880	0,73	0,27	0,74	0,22	1,41	0,22
890	0,69	0,27	0,70	0,22	1,38	0,22
900	0,65	0,26	0,66	0,22	1,35	0,22

910	0,60	0,27	0,62	0,23	1,33	0,22
920	0,58	0,29	0,60	0,25	1,37	0,24
930	0,60	0,30	0,62	0,26	1,43	0,25
940	0,59	0,33	0,61	0,29	1,52	0,28
950	0,57	0,35	0,58	0,32	1,62	0,31

Matlab programma autofluorescences izmaiņu noteikšanai

```

clearall
A = imread('C:\Users\Alexey\Desktop\Nuance\may\1_520.tif');
B = imread('C:\Users\Alexey\Desktop\Nuance\may\2_640.tif');
C = imread('C:\Users\Alexey\Desktop\Nuance\may\3_640.tif');
D = imread('C:\Users\Alexey\Desktop\Nuance\may\4_520.tif')
% A1=single(A(:,:,1));
% A2=single(A(:,:,2));
% A3=single(A(:,:,3));
% B1=single(B(:,:,1));
% B2=single(B(:,:,2));
% B3=single(B(:,:,3));
% % C=((A2)./(A1));
% % D=(A-B);
A1=single(A);
B1=single(B);
C1=single(C);
D1=single(D);
% % A1=A(:,:,1);
% % A2=A(:,:,2);
% % A3=A(:,:,3);
% % B1=B(:,:,1);
% % B2=B(:,:,2);
% % B3=B(:,:,3);
% % % D=B2./A2;
% %
% % % indx = C<0.9;
% % % %A2(indx) = 255;
% % % A1(indx) = 255;
% % % A(:,:,1) = A1;
% % % A(:,:,2) = A2;
% %
%imagesc(A1);
%image(A-D);
imagesc(1-D1./A1, [0, 0.4]);
%imagesc(A, [0,1000]);
%((1-B1./A1), [0, 0.1]);

```

Maģistra darbs „Optiskās metodes asinsvadu dzišanas novērtējumam un monitoringam” izstrādāts Latvijas Universitātes Atomfizikas un spektroskopijas institūtā.

Ar savu parakstu apliecinu, ka pētījums veikts patstāvīgi, izmantoti tikai tajā norādītie informācijas avoti un iesniegtā darba elektroniskā kopija atbilst izdrukai.

Autors: Rita Benta _____
paraksts datums

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Vadītājs: LU ASI vad. pētnieks, Dr. Phys. Aleksejs Ļihačovs _____
paraksts

Recenzents: LU LC vad. pētnieks, Dr. Phys. Māris Tamanis _____
paraksts

Darbs iesniegts Fizikas un Matemātikas fakultātē _____
datums

Dekāna pilnvarotā persona, sekretāre: _____ Ārija Deme
paraksts

Darbs aizstāvēts maģistra gala pārbaudījuma komisijas sēdē

_____ prot. Nr. _____
datums

Komisijas sekretāre: _____
amats, zina. grāds, vārds, uzvārds paraksts