

LATVIJAS UNIVERSITĀTE  
FIZIKAS UN MATEMĀTIKAS FAKULTĀTE  
OPTOMETRIJAS UN REDZES ZINĀTNES NODAĻA

**ACS STRUKTŪRU NOVĒRTĒŠANA AR  
SPEKTROMETRIJAS METODI**

MAĢISTRA DARBS

Autors: **Jānis Bērziņš**

Stud. apl. Nr.: jb14043

Darba vadītājs: Dr. hab. Fiz, **Prof. Māris Ozoliņš**

RĪGA 2016

## ANOTĀCIJA

Darba mērķis ir pārbaudīt metodi neinvazīvai dažādu vielu un to koncentrācijas noteikšanai asinīs, izmantojot UV un VIS spektrometriju.

Darbā apskatīta iespēja ar atstarošanās spektrometrijas metodi noteikt hromoforu (hemoglobīnu) un skābekļa koncentrāciju asinīs, izmantojot acs konjunktīvas asinsvadus. Darba laikā uzņemti vairāki vielu references spektri, veikta acs modeļa izveide un izpēte dažādu spektrometrijas metožu pielietošanai acs struktūru izpētē. Uzņemti dzīvas acs ābola konjunktīvas spektrs, izdalītas hromoforas un noteikta to koncentrācija. Darbā veikta vienkāršota nezināmās vielas noteikšanas simulācija, izmantojot fluorescēna krāsvielu.

Darbā pierādīts, ka ar atstarojošās spektrometrijas metodi ir iespējams identificēt dažādas vielas un to piemaisījumus, izmantojot acs ābola konjunktīvu.

Maģistra darbs uzrakstīts latviešu valodā uz 42 lapas. Darbs satur 27 attēlus, 3 pielikumus un 25 atsauces uz literatūras avotiem.

Atslēgas vārdi: Acs, atstarošanās spektrometrija, hemoglobīns, skābekļa saturācija.

## **ANNOTATION**

The goal of this study is to check the noninvasive method of UV and VIS spectrometry for detecting presence of different chemical agents in the blood.

The method of reflective spectrometry has been tried for detecting chromophore (hemoglobin) and saturation of oxygen in the blood using bloodvessels of bulbus conjunctiva. During this study several reference spectra were taken, eye model was made and different spectrometry methods were applied to explore different parts of the eye. Spectrum of alive person`s eyeball was taken and chromophore concentration in the blood was defined. Using fluorescine, a simplified simulation of detecting unknown chemical agent in the blood was done.

The study verifies, that using reflective spectrometry method, it`s possible to identify different chemical agents and their impurities in the blood testing bloodvessels of conjunctiva of bulbus.

These master work is written in Latvian on 42 page. There are 27 pictures, 3 annexes and 25 refferences.

Keywords: eye, reflective spectrometry, hemoglobine, oxygen saturation.

# SATURS

IEVADS .....	1
LITERATŪRAS PĀRSKATS .....	2
1.1. Optiskais starojums un tā īpašības .....	2
1.1.1. Elektromagnētiskais starojums .....	2
1.1.2. Gaismas atstarošanās un laušana .....	4
1.1.3. Gaismas absorbcija un izkliede.....	5
1.2. Spektrometrijas metožu pielietojums biomedicīnā. ....	7
1.2.1. Absorbcijas un atstarošanās spektrometrija.....	8
1.3. Acs ābola konjunktīvas asinsvadi un to mijiedarbība ar starojumu. ....	11
1.3.1 Asins sastāvs.....	11
1.3.2 Acs ābola konjunktīvas apasiņošana .....	13
1.3.3 Asins mijiedarbība ar optisko starojumu .....	14
2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA UN REZULTĀTI.....	17
2.1. Mērījumu metode .....	17
2.1.1 Gaismas avots .....	17
2.1.2. Polarizatoru izmantošana.....	18
2.1.3. Ocean Optics USB 4000 spektrometrs .....	20
2.1.4. Mērījumu veikšana un fiksācija.....	22
2.2. Acs daļu spektru uzņemšana .....	23
2.2.1. References spektrs .....	23
2.2.2. Asins spektra uzņemšana.....	23
2.2.3. Modeļveida acs izpēte .....	25
2.2.3.1 Atvērta acs modeļa analīze .....	27
2.2.3.2 Pilna acs modeļa analīze .....	29
2.2.4. Cilvēka acs spektrometriskā izpēte.....	31
2.3. Citu vielu noteikšana organismā, izmantojot acs konjunktīvas spektrometriju	34
2.3.1. Fluorescīna spektra uzņemšana .....	34
2.3.2. Acs un fluorescīna mijiedarbība, detektēšana .....	36
2.4. Hemoglobīna oksigenācijas pakāpes noteikšana.....	38
DISKUSIJA.....	40
SECINĀJUMI.....	42
NOBEIGUMS.....	43

PATEICĪBAS .....	43
IZMANTOTĀ LITERATŪRA.....	44
PIELIKUMI .....	47
1. PIELIKUMS. Darbā neuzrādīto mērījumu rezultāti.....	47
2. PIELIKUMS. Hemoglobīna molārās ekstincijas koeficienta vērtības atkarībā no viļņa garuma.....	51
3. PIELIKUMS. Matlab programmas kods oksihemoglobīna un deoksihemoglobīna koncentrācijas aprēķināšanai .....	55

## IEVADS

Laika gaitā cilvēki dažādi centušies izpētīt sevi un vidi sev apkārt. Viena no visvairāk izpētītajām lietām cilvēka organismā ir asinis. Tās var pētīt ne tikai noņemot asins paraugus, bet arī neinvazīvi, pielietojot dažādas optiskās metodes. Kā viena no šādām biomedicīniskās optikas metodēm ir spektrometrija. Gaismai jeb elektromagnētiskam starojumam krītot uz dažādām virsmām, tas var atstaroties, var tikt absorbēts, izkliedēts. Tas ir atkarīgs no vides (vielas) optiskajām īpašībām un gaismas viļņa garuma, kas rada atšķirīgas, tikai vielu raksturojošas spektra formas, līdzīgi kā cilvēka pirkstu nospiedumi.

Kā ierosinājums pētāmajai tēmai bija dzirdēts fakts, ka pēc dažādiem izklaides pasākumiem jauniešiem likumsargi veikuši neinvazīvas pārbaudes, kaut ko pieliekot pie galvas (acīm), spīdinot gaismu. Rezultātā iegūstot apstiprinājumu, ka jaunieši lietojuši ko nelikumīgu. Pēc nelielas literatūras izpētes noskaidrojās, ka mērīts, iespējams, zīlītes reakcijas ātrums uz noteiktu gaismas stimulu, no kā iegūta saikne ar dažādu vielu lietošanu. Tā kā primāri šādas vielas uzsūcas asinīs, tad, iespējams, šādus piemaisījumus vajadzētu noteikt arī ar asins sastāva spektrometriju. Tā kā vistuvāk apskatāmie un novērtējamie ir acs ārējie asinsvadi (bulbus konjunktīvas), tad radās doma pielietot spektrometrijas metodi šo daļu izpētei.

Darba mērķis:

Izveidot metodi neinvazīvai dažādu vielu klātbūtnes noteikšanai asinīs, izmantojot spektrometriju.

Darba uzdevums:

1. Izpētīt dažādu spektrometrijas metožu iespējas neinvazīvas acs ābola konjunktīvas asinsvadu mērījumu pielietošanai.
2. Uzņemt asins absorbcijas spektru, izmantojot acs ābola konjunktīvas asinsvadus.
3. Veikt vielas X spektrometrisko analīzi un salīdzināt šīs vielas īpašību izmaiņas bioloģiskā vidē (asinīs).
4. Noteikt iespējamus piemaisījumus asins sastāvā acīs, izmantojot izvēlēto spektrometrijas metodi UV un VIS apgabalā.

Darba eksperimentālajā daļā tiks izmantots firmas OCEAN OPTICS USB 4000 spektrometrs.

## LITERATŪRAS PĀRSKATS

Elektromagnētiskā starojuma īpašības tiek plaši pielietotas ikdienā, mākslā, medicīnā. Šajā sadaļā tiks apskatītas optiskā starojuma īpašības, asins īpašības un optiskā starojuma mijiedarbība ar to.

### 1.1. Optiskais starojums un tā īpašības

Nodaļā tiks apskatīts elektromagnētiskais starojums (gaisma) un fotofizikālie procesi, kas ietekmē gaismas mijiedarbību ar bioloģiskām vienībām- atstarošanās un laušana, izkliede un absorbcija.

#### 1.1.1. Elektromagnētiskais starojums

Elektromagnētisko starojumu var iedalīt relatīvi divās grupās: dabīgais un mākslīgais. Dabīgais starojums ir saule, zvaigznes, zibens, degšanas procesi, luminescentas vielas, bet mākslīgais starojums ir ar nepieciešamību pēc papildus enerģijas pievadišanas un izmantošanas. Elektromagnētisko viļņu skalā jeb elektromagnētiskā starojuma spektrā EM viļņi ir sakārtoti pēc viļņa garuma un frekvences. Analītiskiem mērķiem visbiežāk izmanto starojumu, kura viļņu garums ir robežās 200...1000 nm, kas atbilst UV, redzamai gaismai un tuvai IS. Šāds starojuma diapazons tiks izmantots arī šajā pētnieciskajā darbā.

Starp starojuma viļņa garumu un fotona enerģiju pastāv šāda sakarība:

$$\Delta E = \frac{hc}{\lambda} \quad (1.1)$$

kur E – fotona enerģija, J; h – Planka konstante,  $6,63 \cdot 10^{-34}$ , J·s; c – starojuma izplatīšanās ātrums,  $3 \cdot 10^8$  m/s;  $\lambda$  – viļņa garums, nm.

Redzams, ka starp fotona enerģiju un viļņa garumu  $\lambda$  apgriezta sakarība. Pēc viļņa garuma izšķir septiņus starojuma diapazonus (Students, 1971):

- $\gamma$ -starojumu ( $< 0,1$  nm),
- rentgenstarojumu (10-2... 10 nm),
- ultravioleto starojumu (10...400 nm),
- redzamo gaismu (400...760 nm),
- infrasarkanā starojumu (760...10<sup>6</sup> nm),
- mikroviļņus (10-3...1 m) un radioviļņus ( $> 1$  m).

Tā kā darbā tiek lietota tikai UV, redzamā un nedaudz infrasarkanā gaisma, tad apskatīsim tikai šos starojuma veidus.

Ultravioleto starojumu iedala UVA, UVB, UVC, daļā, kur katrai atbilst savs viļņu diapazons. Dažādos optiskos pētījumos pārsvarā izmanto UVB un UVA starojumu (280-400nm).

Redzamā gaisma ir tā, ko var detektēt cilvēka acs. Dažādiem indivīdiem redzamās gaismas uztveres sliekšnis nav konstants: tas variē no 380...400 nm līdz 700...780nm. Gadalaikos, kad daudz gaismas, cilvēki jūtas labāk, tumšajā periodā daudziem cilvēkiem rodas depresija. Kaut arī gaismas ietekme uz cilvēkiem nav pietiekami izpētīta, firmas piedāvā gaismas terapijas aparātus. Šo firmu pētījumi it kā liecina, ka gaismas terapija 1,5 reizes palielina šūnas aktivitāti, stimulējot daudz efektīvāku šūnas membrānas darbību. Tas palīdz vitamīnu, skābekļa un citu nepieciešamo komponentu iekļūšanai caur membrānu šūnā un veicina tās reģenerēšanās spēju, kā arī stimulē kolagēna izstrādi. Savukārt šūnas fotoaktivizācija veicina audu funkciju uzlabošanu.

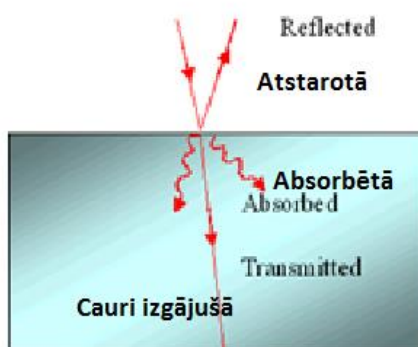
Infrasarkano starojumu izstaro visi ķermeņi, kuru temperatūra ir augstāka par apkārtējās vides temperatūru. Infrasarkanā starojumu izstaro dzīvnieki, sildierīces, Saule, zvaigznes un galaktikas u. c. Visi sakarsēti ķermeņi izstaro nepārtrauktu infrasarkanā staru spektru. Paaugstinoties temperatūrai, palielinās intensitāte un spektrā parādās augstākas frekvences komponenti (aptuveni pie 700 °C objekti sāk izstarot redzamo gaismu). Pēc viļņa garuma infrasarkanā starojumu iedala tuvajā (0,7...1,4 μm), vidējā (1,4...15 μm) un tālajā (15...1000 μm). Tuvo infrasarkanā starojumu izmanto zinātnē pētījumiem, komunikācijām, optiskajās šķiedrās, nakts redzes aparātos, jo šāda garuma viļņiem ir vismazākā absorbcija. Vairākums silto ķermeņu izstaro vidējo infrasarkanā starojumu. Infrasarkanā starojums ir enerģijas forma, kas raksturīgā viļņu garuma rezultātā var sasildīt cilvēka ķermeni 4 cm dziļumā. Tieši šāds dziļums nodrošina optimālu iekšējo orgānu, kaulu, muskuļu sasilšanu, paātrina asinsriti un organisma šķidrums aprites ātrumu. Tā rezultātā uzlabojas orgānu apgāde ar skābekli, paātrinās metaboliskā apmaiņa, kas savukārt pastiprina organisma imūnsistēmas darbību.

Elektromagnētiskais starojums rodas vai tiek absorbēts elektronu pārejas dēļ vai arī molekulu fragmentu svārstību, vai rotācijas izmaiņu dēļ. Optiskais starojums var tikt

atstarots, laužts, izkliedēts un absorbēts. Šajā darbā tiks pārsvarā tiks analizēta dažādu vižu mijiedarbība ar elektromagnētisko starojumu no 350-700nm.

### 1.1.2. Gaismas atstarošanās un laušana

Ja gaismas stara platums (vai viļņa garums) ir mazs salīdzinājumā ar robežu starp vidēm vai izliekumu, notiek gaismas atstarošanās un laušana (1.1.attēls). Starojuma daudzums, kas tiek atstarots no robežas un laužts otrā vidē, ir atkarīgs no abu materiālu laušanas koeficientiem  $n_1$  un  $n_2$ , krišanas leņķa (Jansone, Blūms, 2012; Williams,2011).



**1.1.attēls:** elektromagnētiskā starojuma īpašības atkarībā no šķērsojamās vides: atstarošanās, absorbcija, izspiešanās cauri vielai (Williams, 2011).

Viendabīgā (homogēnā) vidē gaisma izplatās taisnā virzienā kā gaismas stari. Vakuumā gaismas izplatīšanās ātrums ir  $c$  ( $c \approx 3 \times 10^8$  m/s). Caurspīdīgā vidē gaismas ātrums  $v < c$ .

$$v = \frac{c}{n}, \text{ kur } n > 1 \text{ ir gaismas laušanas koeficients videi, kurā gaisma izplatās. (1.2)}$$

Gaismas viļņu fronteī krītot uz robežvirsmu, kas atdala divas caurspīdīgas vides, gaisma no robežvirsmas atstarojas un lūst. Atstarošanās un lūšanu uz robežvirsmas izskaidro Heigensa princips. Pēc šī principa katru gaismas viļņa frontes punktu var pieņemt par jauna, sekundārā sfēriskā viļņa avotu. Sekundāro viļņu apliecējvirsmas kļūst par gaismas viļņa frontēm. No tā var nedefinēt gaismas atstarošanās likums:

atstarotās gaismas stars atrodas gaismas krišanas plaknē, un atstarošanas leņķis  $\beta$  ir vienāds ar krišanas leņķi  $\alpha$ .

$$\alpha = \beta. \quad (1.3)$$

Bet gaismas laušanas likums nosaka, ka lauztās gaismas stars atrodas gaismas krišanas plaknē un krišanas leņķa  $\alpha$  sinusa attiecība pret laušanas leņķa  $\gamma$  sinusu ir vienāda ar otrās un pirmās vides gaismas laušanas koeficientu attiecību:

$$\frac{\sin \alpha}{\sin \gamma} = \frac{n_2}{n_1}. \quad (1.4)$$

### 1.1.3. Gaismas absorbcija un izkliede

Ir zināms, ka visi elektroni veic svārstības pie noteiktām frekvencēm. Gaismas fotoni, ejot cauri kādai vielai, atdod daļu savas enerģijas vielai, jo mainīgais elektriskais lauks izraisa vielu atomos un molekulās elektronu jonu svārstības, kuru uzturēšanai nepieciešama enerģija. Mijiedarbojoties ar blakusesošiem atomiem, daļa enerģijas tiek pārveidota citos enerģijas veidos, kā, piemēram, siltumā. Tā kā dažādām molekulām un atomiem ir dažādas šīs svārstību ierosmes frekvences, tie selektīvi absorbēs dažādu frekvenču vai viļņu garuma gaismu. Tādejādi gaismas intensitāte samazinās, ejot cauri vielām. Fotons ar sev raksturīgu enerģiju var tikt absorbēts tikai tad, ja fotona enerģija atbilst divu molekulas enerģijas līmeņu starpībai (Valters, 1992).

$$\Delta E = E_1 - E_2 = h\nu = \frac{hc}{\lambda} \quad (1.5.)$$

Lai izskaidrotu elektromagnētiskā starojuma absorbciju dažādās vielās un ķermeņa audos, tiek lietots absorbcijas koeficients. Ķermeņa audi sastāv no daudz dažādu vielu molekulām, kurai ir sava raksturīgā absorbcija. Kopējo absorbciju apraksta visu šo absorbcijas koeficientu summa (Mobley. J., Vo-Dinh. T. , 2003)

$$\mu = \mu_1 + \mu_2 + \dots + \mu_n \quad (1.6)$$

Pēc P.Bugēra (1698-1758) likuma pārveidojumiem var secināt, ka absorbcijas koeficients  $\mu$  nav atkarīgs no absorbējošās vielas slāņa biezuma  $l$  un uz vielu krītošās gaismas intensitātes  $I_0$ ,

$$I = I_0 e^{-\mu l} \quad (1.7)$$

bet ir atkarīgs no vielai cauri ejošās gaismas viļņa garuma (Harvey, 2008; Students, 1971).

Šajā darbā tika izmantots vienkāršots optiskā starojuma mijiedarbības ar audiem modelis, kura pamatā ir Bēra-Lamberta likums:

$$I = I_0 e^{-\varepsilon \cdot c \cdot l} \quad (1.8)$$

kur  $\varepsilon$  ir molārais ekstinkcijas koeficients pie viļņa garuma  $\lambda$ ,  $c$  ir molārā koncentrācija un  $l$  ir optiskā ceļa garums.

Bēra-Lamberta likums apraksta to, ka gaismas intensitāte  $I$ , izejot cauri materiālam ar biezumu  $l$  un savu noteiktu absorbcijas spēju, eksponenciāli samazinās, salīdzinot ar materiālā ieejošo gaismas intensitāti  $I_0$  (Saknīte, 2015).

Audos ir vairāki absorbētāji (hromoforas) un to kopējais absorbcijas koeficients ir vienāds ar visu absorbētāju absorbcijas koeficientu summu. Katram absorbētājam ir sev raksturīgs molārais ekstinkcijas koeficients, un tas audos atrodas noteiktā koncentrācijā, tāpēc Bēra-Lamberta likumu var uzrakstīt kā:

$$I = I_0 e^{-(\varepsilon_1(\lambda) \cdot C_1 + \varepsilon_2(\lambda) \cdot C_2 + \dots + \varepsilon_n(\lambda) \cdot C_n)} = I_0 e^{-\sum_n(\varepsilon_i \cdot C_i)} \quad (1.9)$$

Intensitāti pavājinošās vides absorbējamību (angliski absorbance  $A$ ) jeb optisko blīvumu (angliski optical density  $OD$ ) izsaka kā:

$$A = OD = \lg \frac{I_0}{I} \quad (1.10)$$

Apvienojot formulas, iegūst formulu  $OD$  vērtības aprēķinam, ja zināmas molāro ekstinkcijas koeficientu un relatīvo koncentrāciju vērtības:

$$OD = \lg \frac{I_0}{I} = \lg e \cdot \sum_n(\varepsilon_i \cdot C_i) \quad (1.11)$$

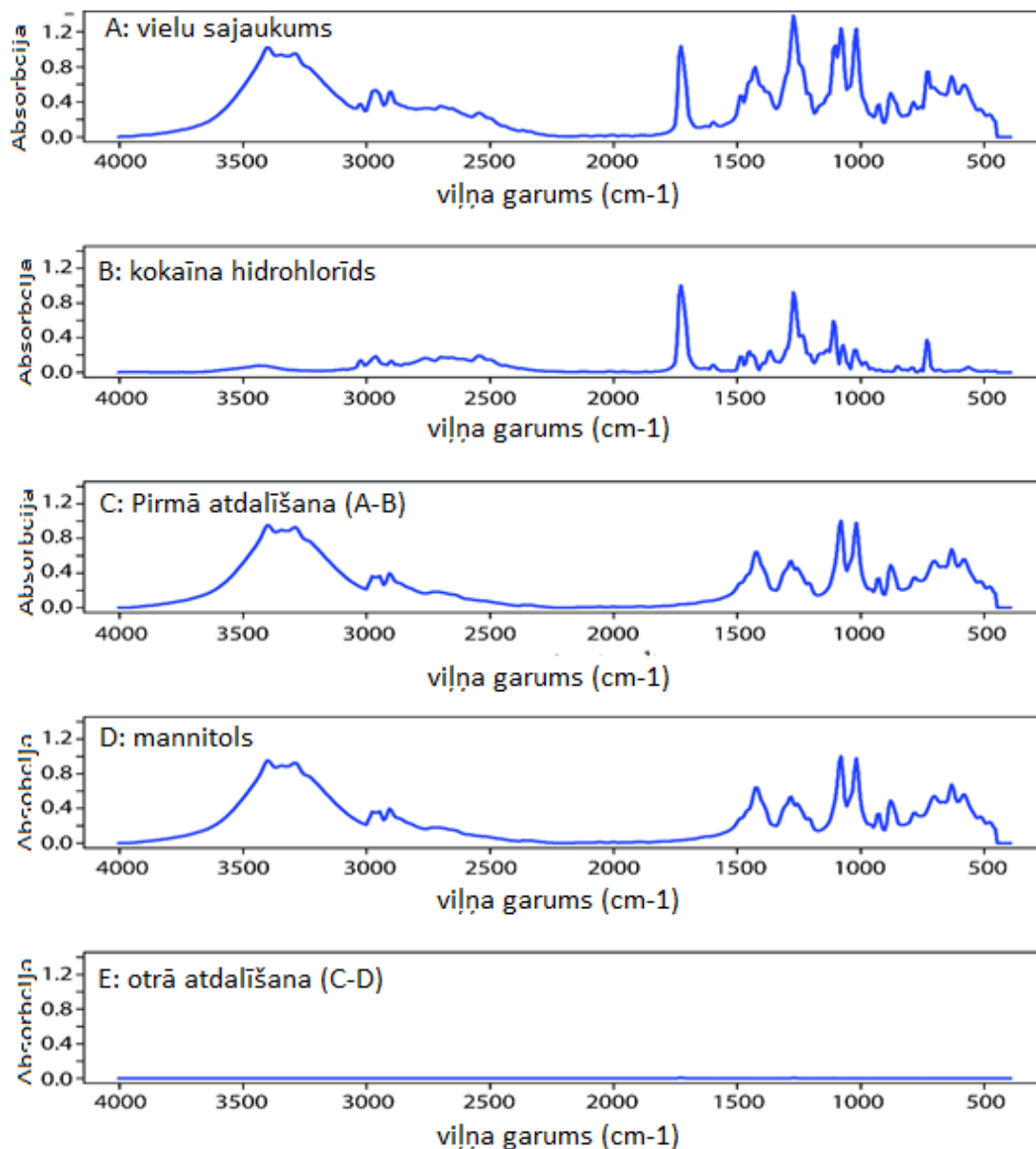
Absorbcija tieši saistīta ar gaismas caurlaidību. Ja viela absorbēs starojumu kādā noteiktā viļņa garumā, tad caurlaidība šajā viļņa garumā nebūs.

Savukārt gaismas izkliede notiek, ja neabsorbētie fotoni dažādu vielas nehomogenitātes dēļ tiek novirzīti un izkliedējas. Katrā šādā fotona laušanā notiek izkliede.

Šajā darbā galvenokārt tiks apskatīta gaismas absorbcija un atstarošanās no acs audiem, pieņemot, ka daļa gaismas izkliedējas.

## 1.2. Spektrometrijas metožu pielietojums biomedicīnā.

Katra viela spēj absorbēt tikai noteiktus selektīvus starojuma viļņu garumus, kas kalpo par šīs vielas detektēšanas pamatprincipu. Ja kādā nezināmā paraugā ar kādu no spektrometrijas metodēm izdodas detektēt absorbcijas maksimumus pie noteiktiem viļņu garumiem, kas sakrīt ar konkrētas vielas references spektru, tad var secināt, ka noteiktais paraugs satur zināmu vielas daudzumu (1.2. attēls).



**1.2.attēls:** vielu identifikācija maisījumā ar spektrometrijas metožu palīdzību. (a) IR šķīduma spektrs; (b) kokaīna references IR spektrs; (c) Vielas spektrs pēc kokaīna spektra subtrakcijas; (d) mannitola (cukuram līdzīga substance) IR references spektrs; (e) vielas iznākuma spektrs pēc pārējo vielu izņemšanas (Harvey, 2008).

Spektrometrija kā fizikāla metode ir zināma sen, bet attīstoties jaunākām un jaudīgākām tehnoloģijām, tās pielietojums kļūst arvien plašāks. Spektrometriju arvien vairāk izmanto biomedicīnā, veicot vielu ķīmisko analīzi, pielietojot ādas melanomu noteikšanā.

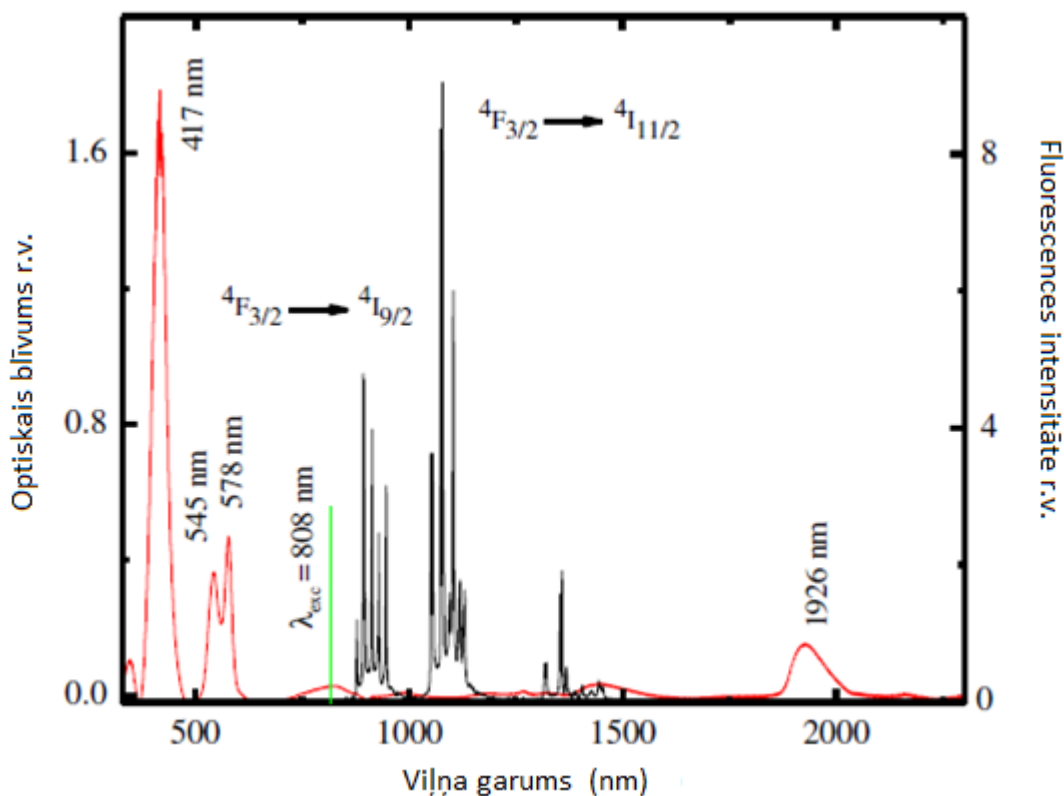
Literatūrā atrodami vairāki pētījumi par spektrometrijas metožu pielietojumu acs struktūru pētījumos. Tā O.Kim et al (2014) savos darbos izmantojuši atstarošanās spektrometriju neinvazīvai hemoglobīna detektēšanai no acs plakstiņu ādas. Līdzīgi, izmantojot Raman spektrometriju, M.J. Juliano (2001) patentējis metodi dažādu vielu neinvazīvai noteikšanai, izmantojot acs ābola konjunktīvas asinsvadus.

### **1.2.1. Absorbcijas un atstarošanās spektrometrija**

Absorbcijas spektrometrijā elektromagnētiskais starojums krīt uz apskatāmo paraugu. Lielākā starojuma daļa izies cauri bez intensitātes zudumiem. Bet pie noteiktiem viļņu garumiem starojuma intensitāte tiks izmainīta. Šo procesu arī sauc par absorbciju. Elektromagnētiskais starojums sastāv no fotoniem ar noteiktu enerģiju (1.1 formula). Tā kā enerģētisko līmeņu starpība vielā ir stingri noteikta, un ir tikai šai vielai raksturīgs lielums, viela absorbēs fotonu ar noteiktu viļņa garumu. Parasti iespējamās elektronu pārejas ir vairākas – no pēdējā aizpildītā līmeņa uz pirmo neaizpildīto, no pēdējā aizpildītā uz otro neaizpildīto, no priekšpēdējā aizpildītā uz pirmo neaizpildīto līmeni utt. Tādējādi katrai vielai var būt ne tikai viens, bet vairāki (1.3. attēls) raksturīgi viļņa garumi, ko tā absorbē (Šalma-Ancāne, 2010; Harvey, 2008).

Absorbcijas spektrometrija ir pretējs process caurlaidības spektrometrijai, jo tur, kur vielas caurlaidība būs 100%, nebūs absorbcijas, bet tur kur būs palielināta absorbcija, caurlaidība būs samazināta vai nebūs vispār.

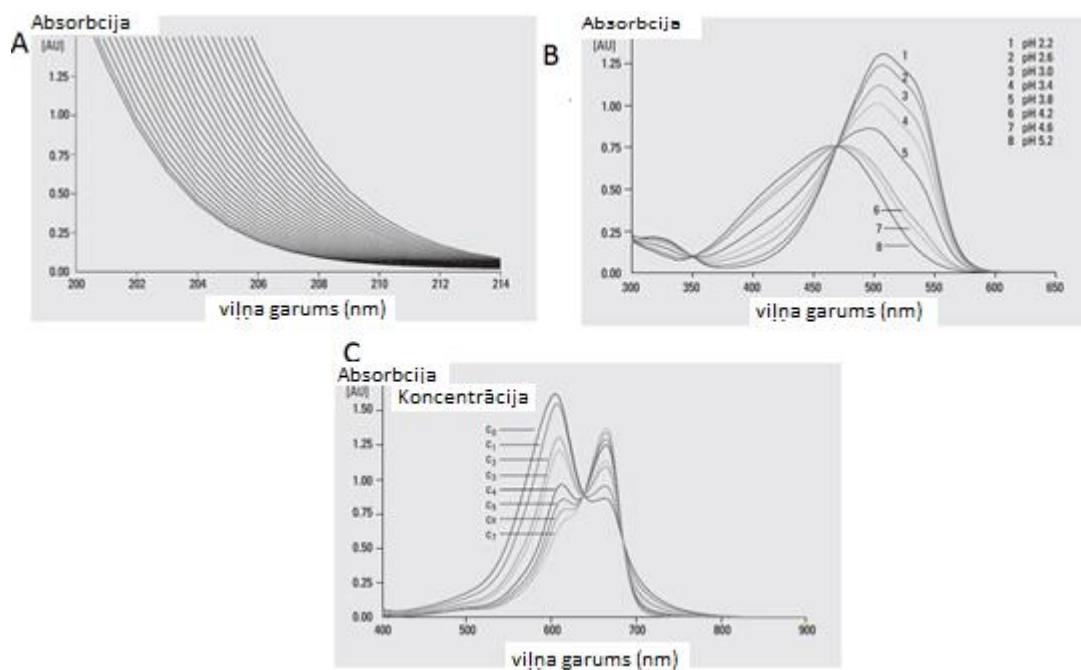
Atstarošanās spektrometriju var pielietot tajos gadījumos, kad nevar uzņemt pētāmā objekta caurlaidības spektru. Atšķirībā no absorbcijas spektra atstarošanās spektrs būs ar apgrieztu spektra formu, saglabājot raksturīgās vielas iezīmes uz noteikta viļņa garuma.



**1.3.attēls:** asins absorbcijas spektrs no 280-2300 nm (Barrera et al, 2013).

Tā kā tālākā darbā tiks apskatīta gaismas mijiedarbība ar cilvēka acs audiem, tad jāņem vērā gaismas izkliede, absorbcija. Pētāmā vieta, acs ābola konjunktīvas asinsvadi, neatrodas dziļi audos, bet novietoti salīdzinoši tuvu (~līdz 500 $\mu$ m) robežšķirtnei gaisa –audi (Owen et al, 2004). Laušanas koeficientu atšķirība un audu virsmas struktūra rada atstarošanos uz robežas starp konjunktīvu un gaisu. Pētāmās vielas sastāvdaļas ietekmē starojuma caurlaidību, izkliedi un absorbciju. Liela daļa sākotnējā starojuma iekļūst dziļāk audos, kur tas izklierējas. Ja starojums netiek absorbcēts audos, tas var tikt izvadīts atpakaļ prom no audiem (Haggblad, 2008).

Jebkuru atstarošanos un absorbciju ietekmē papildus faktori, kas var radīt izmaiņas rezultātos (Fundamentals of UV-Visible spectroscopy, 2000). Tā izmaiņas var rasties dažādu temperatūru ietekmē, pie dažādu pētāmo vielu pH līmeņa, kā arī pie dažādām vielas koncentrācijām (1.4.attēls).



**1.4.attēls:** (A) uzņemtie spektri no 20-70<sup>0</sup>C, novērojamas izmaiņas, jo augstāka temperatūra, jo lielāka nobīde pa labi; (B) pH izmaiņas vienai vielai un novērojamas pārmaiņas vielas spektrālā analīzē; (C) koncentrācijas izmaiņas vielai, kas rada izmainītu spektra formu, saglabājot izteiktās absorbcijas virsotnes (Fundamentals of UV-Visible spectroscopy, 2000).

### **1.3. Acs ābola konjunktīvas asinsvadi un to mijiedarbība ar starojumu.**

Šī darba galvenais mērķis ir noskaidrot, vai iespējams redzamajā gaismā uzņemt konjunktīvas asins spektru un no kā tas galvenokārt atkarīgs. Aci kā pētījuma avotu spektrometrijai izmantojuši daudzi pētnieki, pielietojot dažādas metodes, bet nav skaidri norādīts metodes lietderīgums.

Eksistē vairākas neinvazīvas optiskās metodes netiešai hemoglobīna (Hgb) un asins oksigenācijas pakāpes mērīšanai asinīs. Pie šādām metodēm var pieskaitīt retinālo attēlošanas metodi (Rice et al. 2002), asins oksigenācijas monitoringu, izmantojot tuvo infrasarkanā (NIR) spektrometriju (Liu et al. 1999; Benni 2002), fotoplezmozogrāfiju (Aldrich et al. 2002), UV un redzmās gaismas spektroskopiju (Mourant et al. 2005; Bigio and Mourant 1999), kā arī fluorescences spektrogrāfiju no mutes dobuma audiem (Pavlova et al. 2009). Šāda audu atstarošanās spektroskopija ļauj apskatīt kopējās audu optiskās īpašības. Atstarošanās spektroskopija sākotnēji tika pielietota, lai raksturotu ādas audus, kuri ir viegli pieejami, bet rada grūtības, nosakot hemoglobīna (Hgb) signālu, melanīna ietekmējošo signālu fluktuācijas dēļ, lielās izkliedes, un salīdzinoši vājā signāla dēļ tieši UV un VIS starojuma daļā. Cilvēka acs konjunktīva ir viegli pieejama neinvazīvai Hgb noteikšanai, jo asins kapilāri ir virspusēji un nesatur dažādas stipri absorbējošas hromoforas kā melanīns (Kim et al, 2014, Juliano, 2007). Ernsting et al. 2001; McMurdy et al. 2006; Suner et al. 2007 savos pētījumos uzrāda zināmu korelāciju starp Hgb koncentrāciju un atstarošanos, bet neizmanto fizioloģiski bāzētu modeli konjunktīvas spektra atjaunošanai, kā arī neizceļ informāciju par konjunktīvas strukturālām iespējām iespaidot pētījuma rezultātus.

#### **1.3.1 Asins sastāvs**

Asins ir visvarīgākā transporta vide cilvēka organismā. Ar asins starpniecību notiek gāzu apmaiņa, barošana, šūnu metabolisma produktu izvadīšana. Asins veic informatīvu funkciju citu organisma šūnu apziņošanā ar dažādu ķīmisku mediatoru palīdzību. Tās ir atbildīgas par temperatūras regulāciju organismā, skābju- sārmu līdzsvaru, regulē ūdens daudzumu audos un šūnās. Asinis dēvē par organisma šķidrājiem audiem (Becker, n.d, Composition of Blood).

Asinis sastāv no asinsķermenīšiem jeb formelementiem un asins plazmas. Asins formelementus veido eritrocīti (sarkanie asinsķermenīši), leukocīti (baltie asinsķermenīši) un asins plātnītes, jeb trombocīti. Asins masa sastāda apmēram 8% no cilvēka kopējā svara. Visu asinsķermenīšu tilpuma attiecība asinīs ir aptuveni 45 % pieaugušajiem (hemokrita rādītājs). Pārējo daudzumu sastāda asins plazma.

Asins plazma ir asiņu šķidrā daļa. Tas ir iedzeltens, puscaurspīdīgs šķidrums, kura sastāvā ir organiskas un neorganiskas vielām. Plazmas lielāko daļu sastāda ūdens- 93%, olbaltumvielas, kā albumīni, globulīni, fibrinogēns- 7,3% (7,3g/100ml), elektrolīti (<1%), barības vielas (glikoze un citi oglehidrāti, aminoskābes, lipīdi, holesterīns, vitamīni, mikroelementi), gāzes (CO<sub>2</sub>; O<sub>2</sub>; N<sub>2</sub>), vielmaiņas produkti (urīnviela, kreatinīns, urīnskābe, bilirubīns), dažādi hormoni. Sakarā ar sarežģīto asins plazmas struktūru un elementiem, praktiski nav izdevies izveidot mākslīgu tās aizvietošanu.

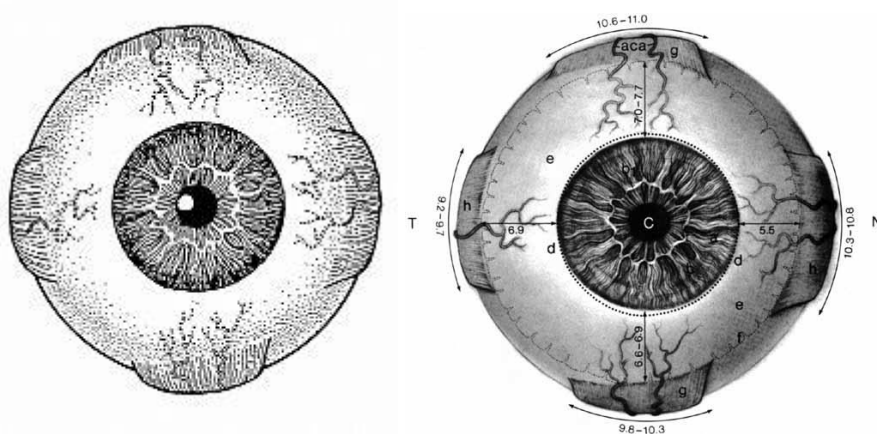
Asins formelementi sastāda 40-50% no kopējā asins daudzuma. Vislielāko formelementu daudzumu sastāda eritrocīti vai sarkanie asins ķermenīši (~95% no formelementiem). Eritrocītos ir krāsviela hemoglobīns, kurā ietilpst divvērtīgā dzelzs. Hemoglobīns piešķir eritrocītiem un asinīm sarkano krāsu. Hemoglobīns veido nestabilus savienojumus ar skābekli un oglekļa gāzi. Hemoglobīna molekula sastāv no olbaltumvielas globīna un pigmenta hema. Tā kā hemoglobīns spēj piesaistīt skābekli un CO<sub>2</sub>, tas kalpo par galveno transportu organismā. Hemoglobīna savienojumi ar skābekli viegli disociē atkarībā no gāzes koncentrācijas vidē — audos, kuros ir zema skābekļa koncentrācija, no hemoglobīna atbrīvojas skābeklis, bet plaušās, kur skābekļa koncentrācija ir augstāka, no hemoglobīna atbrīvojas oglekļa dioksīds. Hemoglobīnu, kas savienojies ar skābekli, sauc par oksihemoglobīnu, bet hemoglobīna savienojumu ar oglekļa gāzi - par karbohemoglobīnu (deksihemoglobīnu). Skābekļa piesaiste nosaka arī asins krāsu. Arteriālās asinis ir gaiši sarkanas, bet venozās - tumši sarkanas (Becker, n.d, Composition of Blood).

Kā formelementi asins sastāvā ir arī leukocīti, granulocīti, trombocīti. Šo šūnu skaits skaitliski ir samērā mazs, tomēr to funkcijas nepieciešamas organisma veiksmīgai attīstībai un imunitātei.

Tādā veidā no asins sastāva var izdalīt dažas vielas, kuras ir pārākumā- ūdens un hemoglobīns, kas sastāda galvenās spektrālās komponentes biofizikālos pētījumos.

### 1.3.2 Acs ābola konjunktīvas apasiņošana

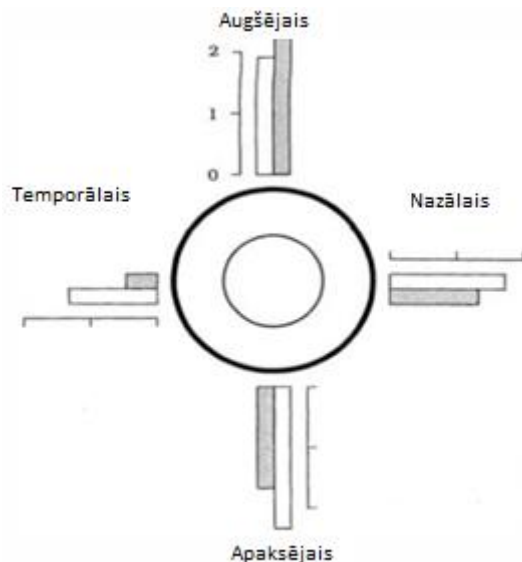
Acs priekšējā segmenta asins apgāde pamatā sākas no oftalmiskās artērijas, kas apgādā ar asins plūsmu acs grozītājmuskuļus, turpinās priekšējās ciliārajās artērijās un satiekas episklerārā artēriju lokā. Tas baro konjunktīvu un episklerāro acs daļu. Šīs artērijas nodrošina lielāko asins plūsmu (~70%). Pārējo priekšējās acs daļas apasiņošanu nodrošina divas garās mugurējās ciliārās artērijas, kas intrasklerāri izdalās uz 3 un 9 pulksteņa virzieniem. Abas šīs artērijas arī aizsākas oftalmiskajā artērijā. 1.5. attēlā parādīts artēriju ceļš acs priekšējā daļā.



**1.5.attēls:** kopumā ir septiņas priekšējās ciliārās artērijas, pa divām katram augšējām, apakšējam, mediālām muskulim. Laterālām acs grozītājmuskulim ir viena artērija. Šīs artēriju ceļš katram subjektam var atšķirties (Anterior segment blood supply, [www.cybersight.org](http://www.cybersight.org))

Venozās asinis arī galvenokārt tiek novadītas vēnās taisnajos acs muskuļos.

Lielos asinsvadus var iedalīt divās kategorijās- pēc plūsmas ātruma un piepildījuma. Lielāko asinsvadu plūsma var sasniegt 100 mm /s, un asins plūsmu un pulsāciju var viegli pamanīt biomikroskopā. Asinsvadus ar lielāku nosakāmo plūsmu detektē kā artērijas, bet ar mazāku (< 4,3mm/s)- vēnām (Meyer, 1988). Artērijas mazāk sazarojas, to piepildījums ir vienmērīgs, bet vēnas ir sazarotas ar neviendabīgu piepildījumu. Īpaši šo efektu var novērot, veicot asins plūsmas angiogrāfiju. Asinsvadi galvenokārt tiek izdalīti vēnās un artērijās pēc asins plūsmas, asinsvadu sienīņu biezuma (artērijās biezāks), formas un sazarotības, kā arī pēc asins plūsmas virziena – uz vai no limba. Šādā veidā noteikto artēriju un vēnu relatīvais daudzums katrā acs priekšējās daļas kvadrantā atšķiras, kas parādīts 1.6. attēlā pēc fluorescīna videoangiogrāfijas pielietošanas.



**1.6.attēls:** Galvenais artēriju (gaišais lauks) un vēnu (ietonētais) relatīvais sadalījums atkarībā no virziena un taisnā muskuļa novietojuma (Meyer, 1988).

Acs ābola konjunktīvas asinsvadu lielums ir atšķirīgs. To ietekmē cilvēka vecums, asins spiediens, dzimums, dažādas acu patoloģijas. Vidējais asinsvadu lielums variē atkarībā no mērīšanas vietas no 20-300 $\mu$ m (Owen, Woodward, 2004; Anterior segment blood supply, (n.d.) Cubersight.org)

Tas var tikt uzskatīts par pietiekamu lielumu, lai varētu izmantot UV-VIS spektrometriju virspusējo asinsvadu spektra uzņemšanai.

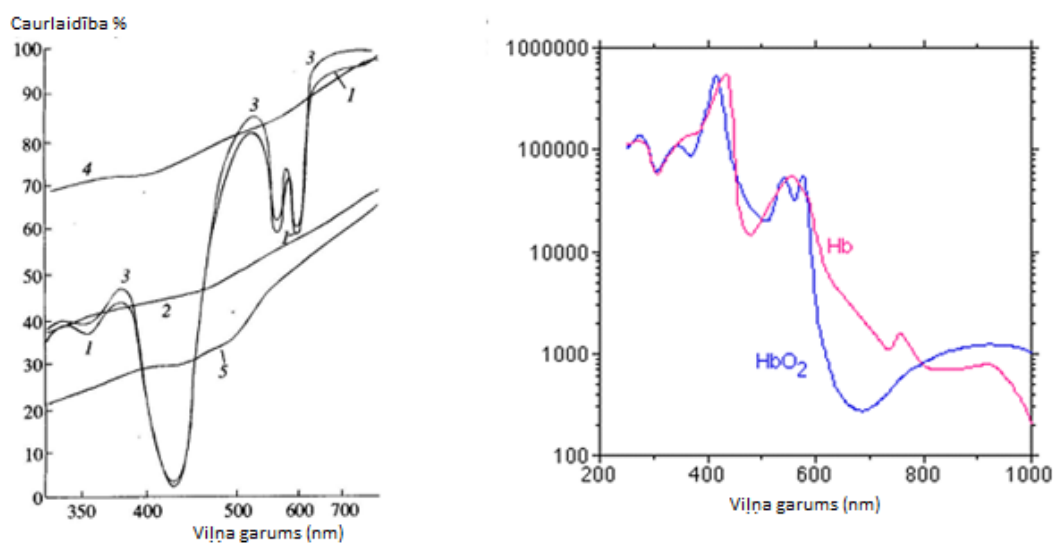
### 1.3.3 Asins mijiedarbība ar optisko starojumu

Dažādi asins ķīmiskie un hematoloģiskie testi ir pieejami, lai iegūtu informāciju par pacienta fizisko stāvokli. Šie rezultāti ir noteicošie precīzas diagnozes noteikšanā. Tomēr visi šie testi prasa tiešu asins paraugu noņemšanu, kas var būt nepatīkami vai pat sāpīgi, īpaši ja to nepieciešams veikt bieži pacienta stāvokļa monitoringam.

Šī iemesla dēļ optiskas neinvazīvas asins izpētes metodes var būt kas jauns un noderīgs. Preparātu noteikšanai, asins sastāva analīzei neinvazīvā ceļā var būt vairākas priekšrocības: ātrāk iegūstams rezultāts, samazinātas pacienta sāpes un diskomforts, gandrīz izslēgtas iespējas bioloģiskiem inficēšanās riskiem, kā arī nav bioloģisko medicīnas atkritumu. Tas pieļauj palielināt nepieciešamo procedūru veikšanas biežumu, tiešu kontroli un pacienta aprūpes uzlabošanu. Kā optiskās metodes, kuras jau

pielieto, ir pacienta pulsa kontrole, skābekļa satura noteikšana asinīs, asins plūsmas mērījumu veikšana ādā diabēta radīto izmaiņu diagnostikai (Tooke et al, 1987), hemoglobīna detektēšana un hemokrita noteikšana. Tieši acs konjunktīvas asinsvadu izmantošanai kā mērķaudiem ir zināma priekšrocība, jo tie atrodas tuvāk, vides ir caurspīdīgas (asaru plēve), salīdzinot ar ādas un citu audu optiskās analīzes pielietošanu.

Kā minēts iepriekš, galvenās asins sastāvdaļas ar lielāko tilpuma daļu ir plazma un eritrocīti jeb sarkanie asins ķermeņi. Tā kā plazmas sastāvā >90% ir ūdens, kura spektrs UV-VIS daļā no 350-1050nm netiek izteikti identificēti, tad par asins identifikatoru kļūst eritrocīti jeb hemoglobīns ar raksturīgo spektrālo formu un virsotnēm pie 417, 545, 578nm (Prah, 1999). Ja netiek izdalīts oksigenētais un deoksigenētais hemoglobīns, tad spektra raksturojums ir līdzīgs 1.7.a. attēlā novērojamam, kas ir Hg un HbO<sub>2</sub> summārais sadalījums (1.7.b. attēlā).



**1.7.attēls:** (attēls pa kreisi) venozo asiņu caurlaidības spektrs, kur (1) atšķaidītas asinis 1:60, (2) plazma ar trombocītiem un leukocītiem, (3) atšķaidīta eritrocītu masa 1:75, (4) plazma, (5) trombocītu masa (Tooke et al, 1987); (attēls pa labi) hemoglobīna absorbcijas spektri (Minkovich, 2001).

Literatūrā pieejamas dažādas Hgb spektra virsotnes, bet tās neatšķiras 2-3 nm robežās, kas skaidrojams ar asins sastāva ķīmiskām atšķirībām – skābju sārmu līdzsvara, skābekļa daudzuma, veiktās analīzes asins koncentrācijas. Tā kā pētījumos netiek uzrādītas būtiskas atšķirības starp *in vitro* un *in vivo* uzņemtajām Hgb

spektrālajām virsotnēm, tad par pamatu darbā tiek pieņemti minēti lielumi asins identifikācijai.

## 2. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA UN REZULTĀTI

Darba eksperimentālā daļā tiek analizētas cilvēka acs audu optiskās īpašības, gaismas atstarošanās raksturlielumi un to atšķirības atkarībā no apstarojamās vietas. Darbā atstarošanās spektri tiek salīdzināti, izmantojot audus, kas satur asinsvadus un nesatur tos (acs radzene).

Lai iegūtu plašāku priekšstatu par acs audu pielietojumu spektrometriskos mērījumos, tiek veikta modeļa acs izpēte, kuras pamatā tiek izmantota cūkas acs.

Darba pētnieciskajā daļā tika veikti šādi darba uzdevumi:

1. Apgūta spektrometra Ocean Optics USB 4000 darbība un spektru uzņemšanas iespēja ar to;
2. Uzņemti asins absorbcijas spektri un to optiskais blīvums;
3. Uzņemti modeļa acs (cūkas) audu spektri, lai noteiktu gaismas atstarošanās spektrālās īpašības dažādos atstarošanās leņķos un acs vietās;
4. Uzņemti asins atstarotie absorbcijas spektri no cilvēka acs ābola konjunktīvas;
5. Izmantojot matemātisku modeli, noteikta acs audu asins oksigenācijas pakāpe;
6. Izveidots modelis svešas vielas klātbūtnes noteikšanai audos, izmantojot fluorescēna un acs audu mijiedarbību.

### 2.1. Mērījumu metode

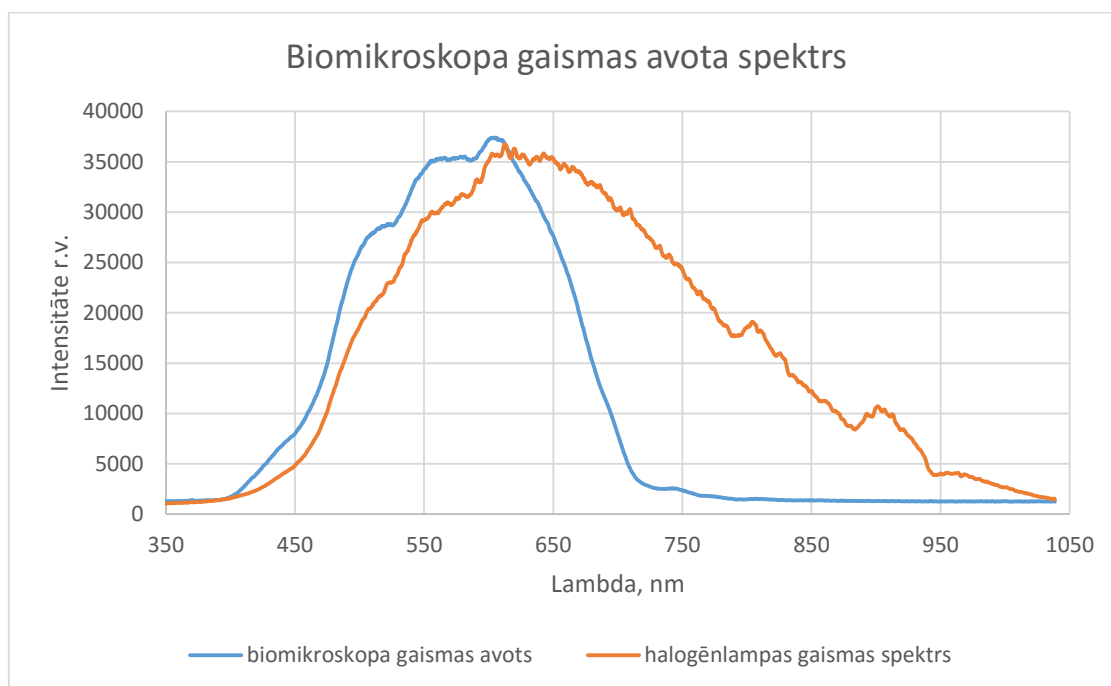
Jebkuras vielas optiskās īpašības ir atkarīgas no gaismas avota īpašībām un tā ietekmes uz pētāmo vielu, iekārtas, ar kuru tiek veikta izpēte un pašas pētāmās vielas. Asins optiskās īpašības ir daudz pētītas, bet kā jau minēts šī darba 1.3.3 nodaļā, galvenie spektrālie raksturlielumi parādās pie 417, 545 un 578 nm. Tā kā analīzē tiek pielietots redzamās gaismas un tuvās infrasarkanās gaismas spektrometrs (350-1050nm), tad gaismas avotam jābūt tādām, kas raksturīgajās spektra daļās ir ar pietiekamu intensitāti un pietiekamu spektra platumu.

#### 2.1.1 Gaismas avots

Darba pamatuzdevums ir uzņemt asins spektru no acs audiem, tad, lai nodrošinātu datu salīdzināmību un atkārtojamību, tiek izmantots biomikroskops Takagi-Seiko SM-2N, kas nodrošina regulējamu gaismas avota intensitāti un pagriešanas leņķi. Ar doto

iekārtu ir iespējams nodrošināt relatīvi nekustīgu galvas un acs stāvokli, kā arī vienādu attālumu no iekārtas līdz cilvēka acij, neatkarīgi no gaismas avota pagriezienu leņķa. Šādu iespēju nelielā diapazonā nodrošina biomikroskopa optika, ja pieņem, ka darba attālums tiek izvēlēts pie skaidra mikroskopa pētāmās vietas attēla noteiktā nemainīgā palielinājumā.

Kā gaismas avots tiek izmantota OSRAM 12V 30W halogēnlampa ar raksturīgo pielietoto spektrālo starojumu ( 2.1. attēls). Gaismas avota intensitāte tiek fiksēta un netiek izmainīta visā eksperimenta veikšanas laikā.



**2.1. attēls:** Halogēnspuldzes gaismas avota un biomikroskopa gaismas avota spektrs redzamajā mērāmajā diapazonā (350-1050nm), uzņemts ar OO USB 4000 spektrometru.

Gaismas avota spektrālās īpašības ierobežo biomikroskopa optiskie filtri, kas nodrošina tikai redzamās gaismas caurlaidību. Tas eksperimenta veikšanai ir negatīvs nosacījums, jo tiek apskatīta tikai šaura spektra daļa. Bet pieņemot, ka galvenais pētāmais objekts jeb bioloģiskā hromofora ir asinis ar galvenajiem raksturlielumiem 550-600nm, tad šāda veida eksperimentam dotā iekārta ir izmantojama.

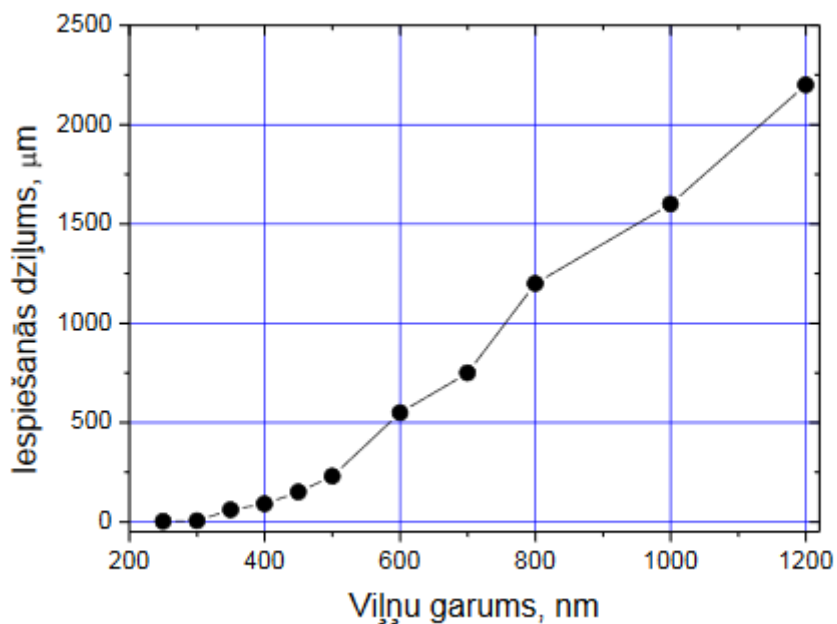
### 2.1.2. Polarizatoru izmantošana

Laukums, ko rada gaisma no avota uz pētāmās daļas, ir aptuveni 0,3 cm<sup>2</sup> liels. Uztverošā gaismas vada ieejas diametrs ir ~0,25mm<sup>2</sup>. Optiskajam starojumam mijiedarbojoties ar acs audiem, gaismas intensitāte samazinās gan absorbcijas, gan

izkliedes dēļ. Ir daudz pētīta redzamās gaismas izplatīšanās un izkliede ādā, bet nav daudz zināms par gaismas izkliedi acs audos, jo nav salīdzināmi vides biežumi. Acs apvalks pēc struktūras un blīvuma ir līdzīgs ādai, tāpēc tiek pieņemts, ka notiek vairākkārtēja izkliede un atstarošānās no dažādām optiskām vidēm. Tā kā dzīvās acīs nav iespējams uzņemt transparences acs audu spektrus, tad tiek uzņemti atstarotās gaismas spektri, kas satur informāciju gan izklienētā veidā no pētāmām struktūrām, gan kā spoguļatstarošānās no avota. Tā kā gaismas nestais informatīvais saturs intensitātēs ir nesamērojams (spoguļatstarošānās no virsmas un difūzi atstarotā gaismas intensitāte atšķiras vairākas reizes), tad var atdalīt tiešo atstaroto starojumu no gaismas, kas tiek difūzi (vairākkārtēji izklienēts un atpakaļ atstarots) atstarota no audiem. To iegūst ar polarizētu starojumu, pieliekot polarizatorus pie gaismas avota izejas un uztverošās iekārtas ievada.

Darbā tika pielietota krusteniskā jeb ortogonālā gaismas polarizācija, ievērojot to, ka gaismas polarizācijas vektori ir ortogonāli plaknē, kas paralēla parauga (ādas) acs virsmai un uztverošai iekārtai. Gaismai izejot cauri ārējam polarizatoram, tā tiek lineāri polarizēta plaknē, kas perpendikulāra pētāmās vietas virsmai. Gaismai, nonākot uz acs audiem, daļa tiek atstarota, daļa ieiet audos – izklienējas un tiek atstarota atpakaļ (difūzi atstarota). Primāri atstarotā gaisma saglabā savu lineāro polarizāciju, bet difūzi atstarotā lineāro polarizāciju zaudē (Saknīte, 2015). Darba mērījumos lielāko informāciju par audiem, to saturu nes difūzi atstarotā gaisma, kuras intensitāte ir daudzreiz mazāka par primāri atstaroto, tāpēc ir nepieciešams, lai šī primāri atstarotā gaisma neiespaidotu mērījumu rezultātus.

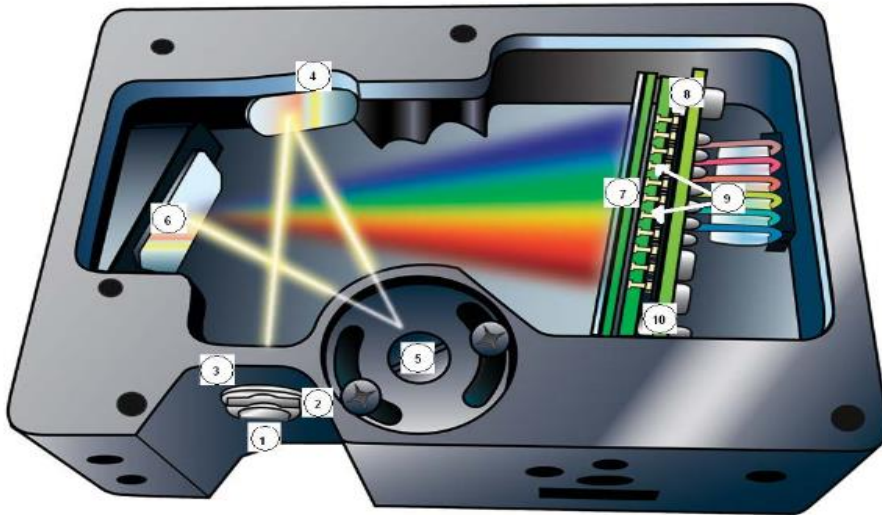
Lai gan darbā tiek izmantoti polarizatori, daudzviet literatūrā minēts, ka šāda veida pētījumos, kuri tiek veikti uz bioloģiskiem audiem virsējā slānī (līdz 1mm) īpaša nepieciešamība pēc polarizācijas nav. Eksperimentā pārbaudītiem mērījumiem ar ortogonālo polarizāciju nebija atšķirības ar mērījumiem, kuri veikti tiešā atstarotā starojumā. Pirmajā gadījumā jūtami samazinājās atstarotās gaismas intensitātes, bet rezultāti netika ietekmēti, nosakot optisko blīvumu apskatāmajam apgabalam. Tas daļēji skaidrojams ar to, ka krītošas gaismas laukums uz objektu ir salīdzinoši mazs, kas ietver salīdzinoši homogēnu pētāmo vidi (acs konjunktīva). Arī gaismas iespiešanās dziļums audos (2.2. attēls) pētāmajos viļņa garumos ir salīdzinoši neliels, kas nosaka pieņēmumu, ka polarizatoru izmantošanai šādā pētījumā nav nozīmīga loma. (Mērījumi ar polarizatoru izmantošanu uzrādīti 1.pielikumā).



**2.2. attēls:** gaismas iespīšanās dziļums audos mikrometros atkarībā no gaismas viļņa garuma (Allen et al, 1999, Anderson et al 1981) . Attēlā redzams, ka pētāmajā diapazonā starojuma iespīšanās dziļums nepārsniedz 500 mikrometrus, kas ir samērojams ar acs ābola konjunktīvas asinsvadu atrašanās dziļumu.

### 2.1.3. Ocean Optics USB 4000 spektrometrs

Darbā kā mērierīce tiek pielietots firmas *Ocean Optics USB 4000* spektrometrs. Spektrometra ierīce sastāv no gaismas vada un analizējošās ierīces. Ierīces barošanu nodrošina caur USB pieslēguma portu datorā. Lai ierīce strādātu, nepieciešams instalēt datorā speciālu *Spectra Suite* programmu. Ar šīs programmas palīdzību var iestatīt spektrometra nolasišanas datus, veikt summācijas, rezultātu attēlošanas nogludināšanas, izvēlēties dažādas spektrometrijas attēlošanas metodes (refleksijas, caurlaidības, absorbcijas spektru uzņemšanai).



2.3. attēls: USB 4000 darbības princips (<http://oceanoptics.com/wp-content/uploads/USB4000OperatingInstructions.pdf>).

Principiālā spektrometra darbības shēma parādīta 2.3. attēlā. Spektrometra iekārtai nav regulējamu vai bīdāmu detaļu, tās attiecīgi samontētas izgatavotājrūpnīcā un neprasa papildus regulēšanu. Shēmā ar cipariem apzīmēta analizējošā starojuma gaita ierīcē un galvenās sastāvdaļas (Ocean Optics INC, 2008):

1. SMA 905 savienotājs- savieto ieejas gaismas vadu ar spektrometru;
2. Sprauga – četrstūraina apertūra, kura var tikt regulēta no  $5\mu\text{m}$ - $200\mu\text{m}$ , izmainot ienākošās gaismas daudzumu iekārtā. Ja iekārtā nav šīs apertūras, tad tikai pienākošās šķiedras diametrs nosaka ienākošās gaismas daudzumu;
3. Filtrs- nosaka optiskā starojuma determinētās robežas attiecīgajai iekārtai;
4. Savācējspogulis- safokusē ienākošo starojumu un novada uz difrakcijas režģi;
5. Režģis- pārvada starojumu no savācējspoguļa uz fokusējošo spoguļi. Difrakcijas režģi pieejami ar dažādu rievu blīvumu, nosakot spektrometra izšķirtspēju;
6. Fokusējošais spogulis- fokusē pirmās kārtas spektru uz detektēšanas virsmas;
7. L4 detektora savācējlēcas- apkopo ienākošo spektru uz detektora;
8. Detektors (UV un VIS) – konvertē optisko signālu digitālā signālā. Katrs pikselis uz detektora atbilst savam viļņa garumam, veidojot digitālo atbildi. Spektrometrs tad pārraida digitālo signālu uz SpectraSuite aplikāciju;
9. OFLV filtrs- bloķē otrās un trešās kārtas starojumu ( Papildus uzstādījums, kas var nebūt visās iekārtās);

10. UV4 detektors- papildus uzstādījums spektrometra jutības parametru noteikšanai <340nm.

Spektrometra detektora viena pikseļa jutība laika vienībā ir 100000 elektronu, tas spēj sasniegt 130 fotonu uzskaiti pie 400nm un 60 fotonu pie 600nm. Signāla- trokšņa attiecība 300:1 kopējā summācijā. Kopējo spektrometra lietderību raksturo kā 99,8%.

#### **2.1.4. Mērījumu veikšana un fiksācija**

Visi darbā uzņemtie mērījumi veikti, izmantojot biomikroskopa darbapalīdzību. Lai dati būtu savstarpēji salīdzināmi, tika pielietota viena nemainīga biomikroskopa lampas jauda, kā arī nemainīgs optiskais palielinājums. Nemainīgs optiskais palielinājums nosaka vienādu ieregulētu attālumu no apgaismojuma izejas līdz objektam, ko nosaka skaidra fokusa nosacījums.

Atstarotās gaismas mērījumos tika izmantota speciāli izgatavota spektroskopa uztverošā gaismas vada uzdeva, kas fiksēta vienā nemainīgā pozīcijā pie biomikroskopa optiskās daļas. Līdz ar to visa mērījumu gaitā tiek izpildīts nosacījums par vienādu gaismas ceļu līdz objektam un uztverošai iekārtai.

Maģistra darbā tiek izmantoti trīs veidu objekti mērījumu veikšanai:

1. references spektra iegūšana uz baltas kartona lapas (aprakstīts nākamajā sadaļā);
2. modeļa acs (cūkas) dažādu caurejošo un atstaroto spektru uzņemšana, informatīvi lielāka apgabala apzināšanai;
3. cilvēka acs segmentu spektroskopija.

Lai mērījumi būtu salīdzināmi gan savā starpā, gan starp objektiem, tiek stingri ieturēts vienāds fokusa attālums, ko nodrošina biomikroskopa iekārtas zoda balsts.

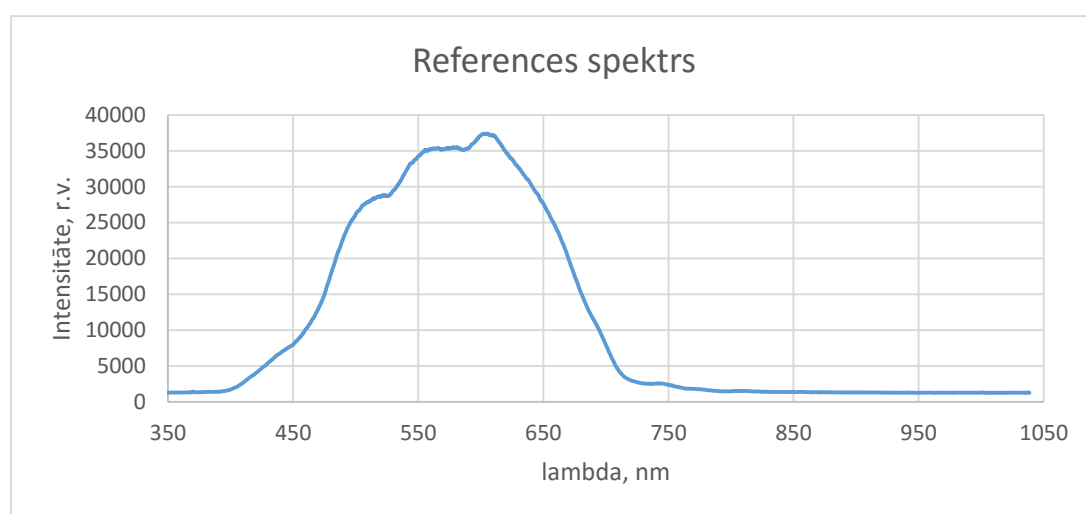
## 2.2. Acs daļu spektru uzņemšana

Darba eksperimentālā daļa nosacīti iedalāma trīs sadaļās, kurās tiek apskatīta iespēja uzņemt izdalītas asins spektru, iegūta modeļa acs un uzņemti gan atstarotie, gan tiešie spektri, kā arī uzņemts cilvēka acs konjunktīvas spektrs ar galveno uzdevumu- noteikt metodes pielietojumu dažādu vielu analīzē, izmantojot acs struktūras.

### 2.2.1. References spektrs

Lai iegūtu optiskā blīvuma (OD) vērtības, ir jāzina sākotnējais starojums  $I_0$  un difūzi atstarotais gaismas starojums  $I$ . Ar referenci saprot sākotnējo starojumu  $I_0$  (2.4. attēls).

Par referenci sauc ideāli atstarojošu virsmu, kas ir tādā pašā plaknē un attālumā no uztverošās iekārtas kā pētāmais objekts. Izmantojot referenci, iespējams iegūt informāciju par sākotnējo starojumu  $I_0$ , kas nonāk uz pētāmā objekta virsmas. Par referenci šajā darbā tika izmantots balts vairākslāņu kartons (kas varētu imitēt acs audu vairākslāņu struktūru), kas ir pietiekami labs atstarotājs, kā arī pieejamāks par standarta kalibrācijas balta ķermeņa etaloniem. Šāda veida references uzņemšana saglabā līdz pat 95% no krītošas gaismas intensitātes atkarībā no gaismas viļņa garuma (Saknīte, 2015).

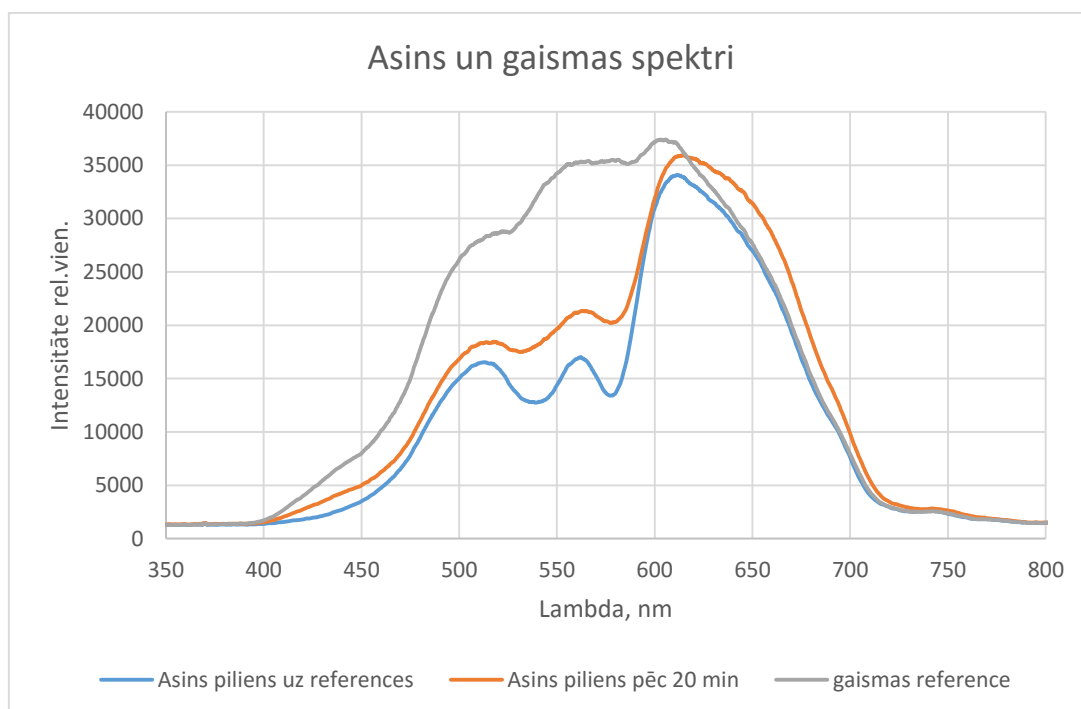


**2.4. attēls:** references spektrs biomikroskopa gaismas avotam.

### 2.2.2. Asins spektra uzņemšana

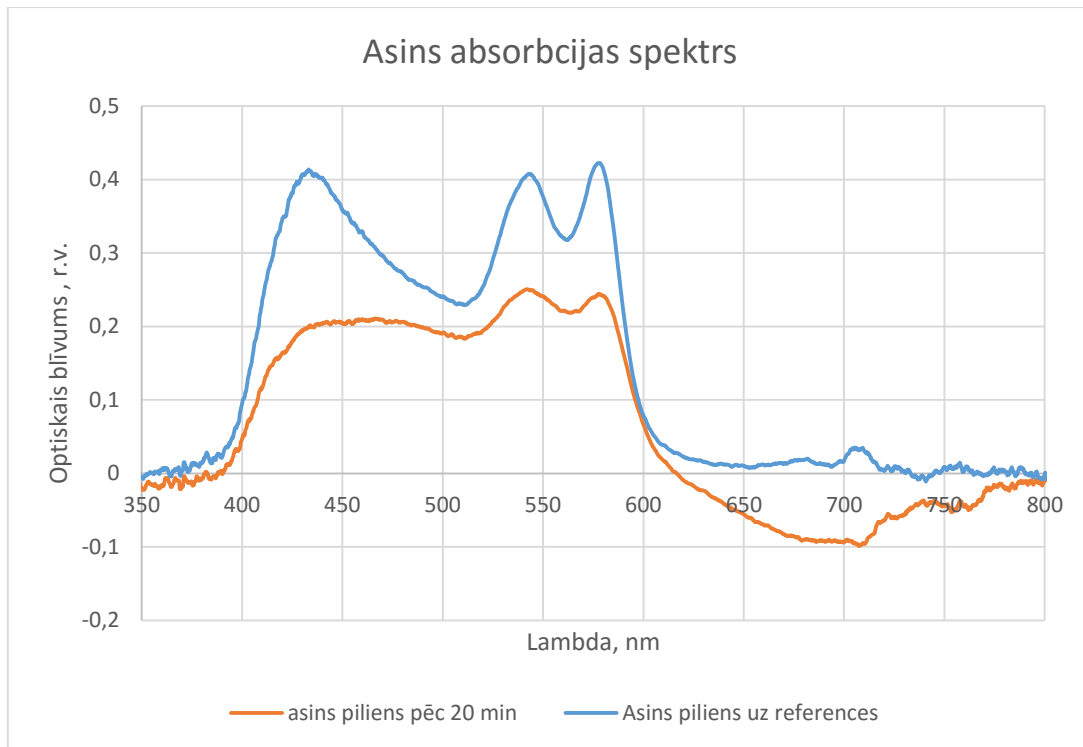
Galvenais bioloģiskais šķidrums cilvēka organismā ir asinis. Tās var izteikti identificēt ar VIS spektroskopijas metodi. Pārējo organismā esošo hromoforu-ūdens, melanīna, bilirubīna un citu- difūzi atstarotās gaismas intensitāte redzamās gaismas apgabalā ir minimāla. Lai turpmākā darba gaitā spētu analizēt iegūtos datus, nepieciešams uzņemt izdalītu asins spektru.

Asins izdalīšana veikta no cilvēka rokas bioloģiskiem audiem, iegriežot ar skalpeli un uznesot šķīdumu uz references pamatnes plānā slānī. Tika uzņemti vairāki spektri, izmantojot biomikroskopa iekārtu, kur gaismas avots nobīdīts no uztverošās zondes  $25^{\circ}$  savstarpējā leņķī ( tiešu atstarošanas  $0^{\circ}$  šajā darba shēmā nav iespējams tehniski nodrošināt, jo gaismas avots aizsedz uztverošās zondes daļas). Tika nomērīti asins piliena spektri, uzreiz to uzklājot uz pamatnes un pēc 20 minūtēm, kad paraugs jau ir izžuvis (2.5. attēls).



**2.5. attēls:** svaigu asins piliena spektrs salīdzinājumā ar izžuvuša tā paša piliena spektru. Redzamas zināmas izmaiņas attēlojuma intensitātē, kur izžuvušās asinis tuvojas uzņemtajai referencēi.

Veicot matemātiskos pārveidojumus, izsakot optisko blīvumu (2.6.attēls), iegūstam asins absorbcijas spektru, kas salīdzināms ar literatūrā atrodamo informāciju, ar galvenajiem raksturlielumiem pie 417, 545 un 578 nm (Barrera et al, 2013). tā kā gaismas avota intensitāte pie 400 nm ir zema, tad galvenie raksturlielumu redzamajā spektra uztvertajā daļā ir tieši rajonā no 540-585nm.



**2.6. attēls:** uzņemtais asins absorbcijas spektrs, no kura izteikti tiek izdalīti divi pārliekuma punkti pie 545 un 580 nm. Novērojuma liela atšķirība starp izžuvušo paraugu un svaigu asins pilienu. Uzņemtā laika atšķirība ir 20 min, bet līknes formas izmaiņas ir ļoti krāsas, lai gan abos paraugos iespējama vielas identifikācija.

Tā kā ir zināma viela (asinis), tad iegūto rezultātu pieņemsim kā asins referenci turpmākajā darba gaitā, lai identificētu vielas klātbūtni pētāmajā paraugā.

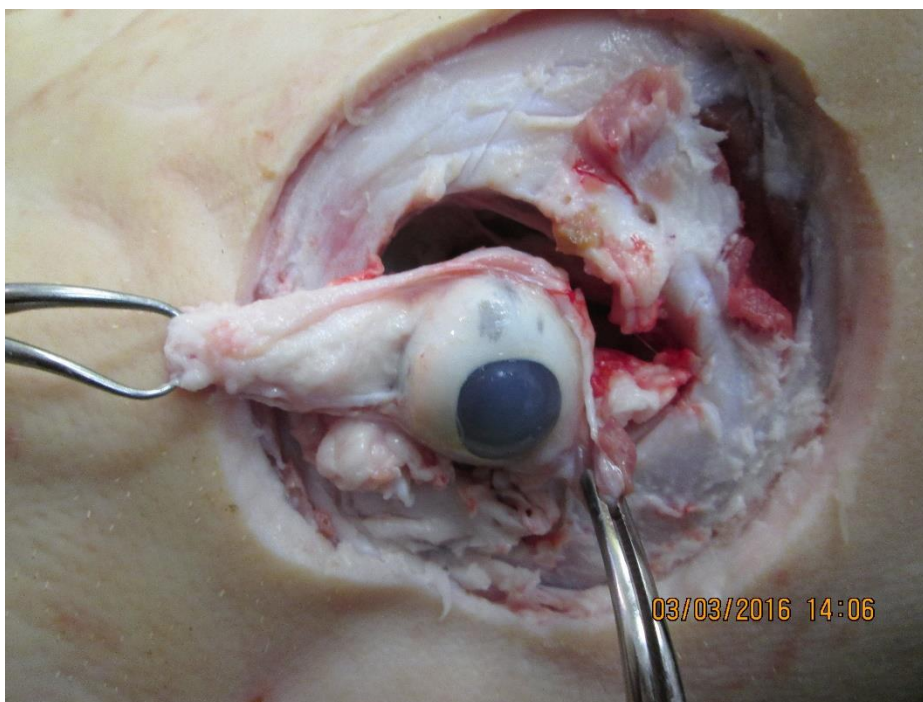
### 2.2.3. Modeļveida acs izpēte

Pasaulē veikta virkne dažādu pētījumu, kuros nonākts pie secinājuma, ka cilvēka acij vistuvākās bioloģiskās acs īpašnieki ir truši, aitas un cūkas. Vistuvākā bioloģiskā būtne pēc organisma funkciju un orgānu struktūras cilvēkam ir cūka (acs gadījumā līdz 98% struktūru un funkcijas līdzību (Sanchez et al, 2011), kas arī ir salīdzinoši visvieglāk iegūstamais bioloģiskais organisms. Lai izzinātu dzīvas acs iespējamu gaismas mijiedarbību (atstarošanās, absorbcija), tika izveidots acs modelis, kas iegūts no 12h laikā kautas mājas cūkas kautķermeņa.

Galvenais uzdevums pētījumos ar acs modeli ir noskaidrot, vai iespējama informatīva datu iegūšana, un ar kādu metodi (atstarošanās salīdzinājumā ar cauri izgājušo) ir iespējams iegūt labākos rezultātus, kā dati izmantojami pētījumā uz dzīvu

cilvēka aci. Ņemot vērā, ka galvenais pētāmais darbā būs dzīva cilvēka acs, tad vairāk tiek apskatīta tieši atstarošanās mijiedarbība, kā kritēriju nosakot tuvākās intensitātes spektra iegūšanu references spektram.

Tika veikta abu acu ekstrakcija no orbītām (2.7 attēls), saglabājot acs veselumu, atdalot tikai grozītājmuskuļus, liekos taukaudus, atdalot redzes nervu ~10mm no acs ābola.



**2.7.attēls:** acs modeļa iegūšana, veicot cūkas acs ābola ekstrakciju, saglabājot acs ābola veselumu. Redzams, ka jau apduļķojusies ir radzene, izmaiņas novērojamas varavīksnenē, kā arī tiks novērotas tīklenes daļā. Pārējā acs ābola daļa ir neizmainīta ar labi pamanāmiem konjunktīvas asinsvadiem.

Tika iegūtas divas modeļa acis un veikti vairāki mērījumi divos dažādos ciklos. Pirmais, veicot mērījumus, izmantojot cūkas acs apvalku (sklēru), pārējo acs sastāvu izpreparējot. Otrais, atstājot aci veselu, veicot acs struktūru absorbcijas mērījumus un atstarošanās mērījumus no priekšējām struktūrām, iekļaujot radzeni, sklēras limbālo daļu un konjunktīvas mediālo daļu.

Mērījumi veikti uz biomikroskopa darbgalda, ievērojot darba 2.1.4 punktā aprakstīto shēmu. Acs modelis tika ievietots speciālā metāla turētājā, kas nodrošina nemainīgu pozīciju attiecībā pret gaismas avotu un uztvērēju (2.8. attēls)



**2.8. attēls:** acs modelis ievietots speciālā turētājā nemainīgā pozīcijā uz biomikroskopa darbgalda, kas nodrošina nemainīgu attālumu no gaismas avota līdz uztvērējam. Atkarībā no izmantotā acs modeļa, tika veikti acs struktūru absorbcijas mērījumi gan cauri izgājušai gaismai, gan atstarotai. Atkarībā no veicamā mērījuma, uztvērējs tika novietots biomikroskopa optiskās daļas priekšā, vai aiz acs modeļa.

### ***2.2.3.1 Atvērta acs modeļa analīze***

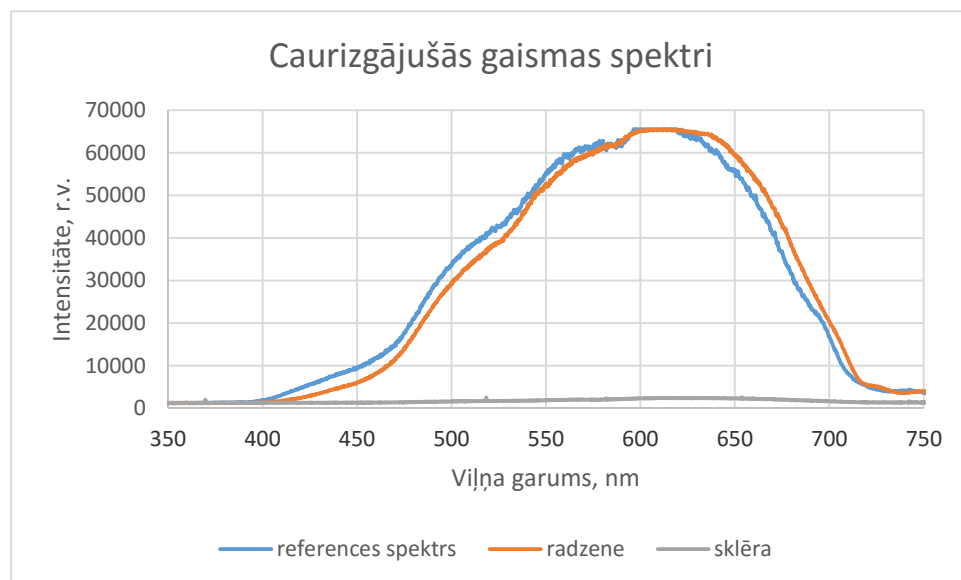
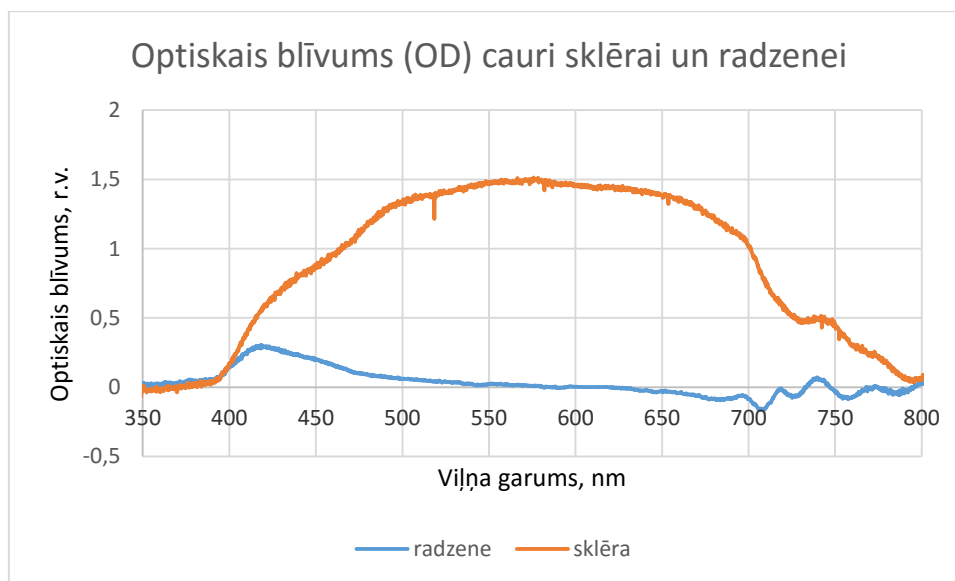
Atvērtam acs modelim tika veikti absorbcijas mērījumi gan cauri izgājušam starojumam, gan atstarojošam.

Absorbcija cauri izgājušam starojumam tika uzņemta radzenei un sklērai ~5mm no limba. Uzņemtais spektrs parādīts 2.9. attēlā. Attēlā redzams, ka, lai gan acs modeļa radzenes vizuāli ir apduļķojušās, gaismas caurlaidība ir gandrīz neizmainīta. Sklēra, savukārt, absorbē un izkliedē gandrīz visu starojumu redzamajā spektra daļā. Neliela caurlaidība parādās no 550-650 nm .

Apskatot attiecīgos optiskā blīvuma pārveidojumus (2.10. attēls), var novērot, ka radzene nedaudz absorbē starojumu pie 400 nm, bet pārējā daļā ir pilnībā caurspīdīga.

Tas skaidrojams ar gaismas avota sašaurināto spektru. Ja gaismas avota spektrs sāktos no 350nm, iespējams radzenes absorbcijas netiktu parādīta šajā spektra daļā. Sklēra visā spektra daļā uzrāda pilnīgu absorbciju.

**2.9. attēls:** atvērta acs modeļa absorbcija radzenei un sklērai 5mm no limba. Redzams, ka radzenes gaismas caurlaidība ir gandrīz neizmainīta, bet sklēra absorbē lielāko daļu starojumu redzamajā spektrā.

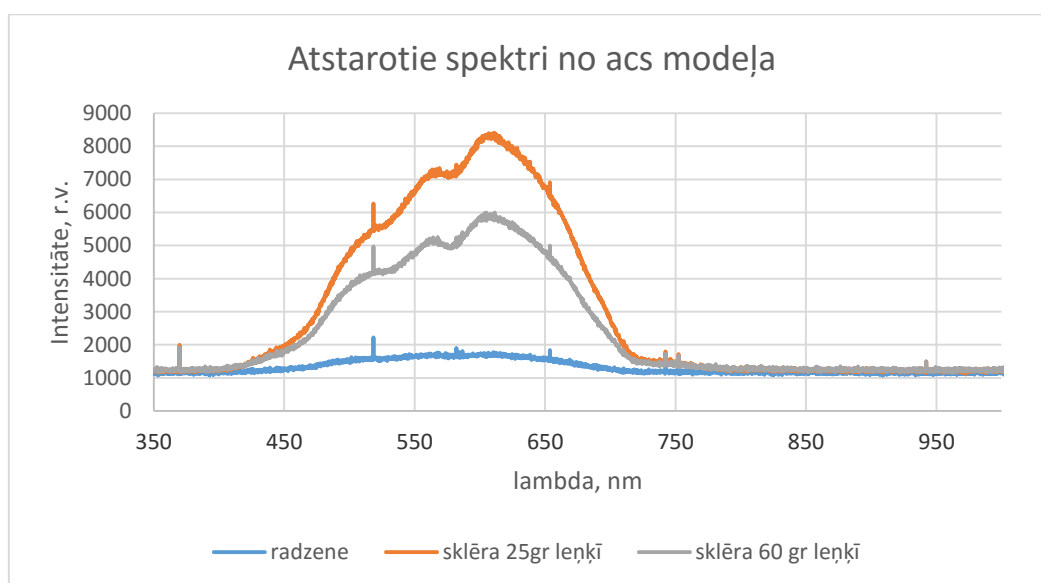


**2.10. attēls:** Optiskā blīvuma aprēķini, nosaka radzenes nelielu absorbciju ap 400 nm un pilnīgu caurlaidību pārējā spektra daļā. Sklēra absorbē gaismu visā mērījumu daļā.

Rezultāti sklēras absorbcijai jeb optiskajam blīvumam nesakrīt ar gaidīto. Tā kā acs struktūrās jābūt apasiņošanai, tad absorbcijas mērījumos bija jāparādās līknes

izmaiņām, kas saistītas ar hemoglobīna spektrālo ietekmi. Bet attiecīgi veiktajos mērījumos netiek fiksētas izmaiņas, kas saistāmas ar hemoglobīna atpazīšanu. No tā tiek secināts, ka šāda veida bioloģiskie audi nedrīkst būt bez apasiņošanas ilgāk par 30-40 min, jo notiek ķīmiskie procesi audos, kas hemoglobīna molekulu sadala un izveido citu ķīmisku savienojumu ar citiem raksturīgiem parametriem, neskatoties uz to, ka asinsvada fizikālās aprises uz acs tika noteiktas.

Absorbēcija atstarotai gaismai no acs modeļa struktūrām uzņemta no radzenes un sklēras divās vietās: 25 grādu leņķī un 60 grādu leņķī, kas mērīts starp gaismas avotu un uztverošo iekārtu. Uzņemtie spektri parādīti 2.11. attēlā.



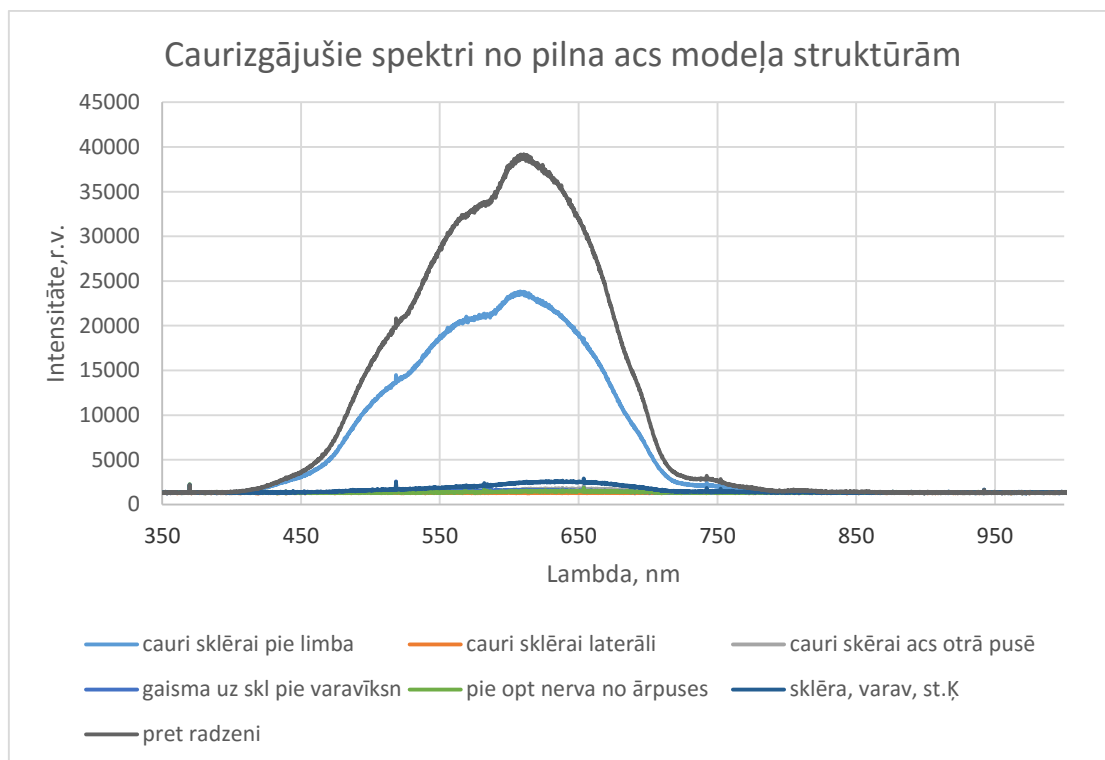
**2.11. attēls:** atstarotie spektri no acs modeļa apvalka. Redzams, ka labāka atstarošanās ir no sklēras, ja leņķis starp gaismas avotu un uztvērēju ir mazāks.

Mazāku leņķi starp gaismas avotu un uztvērēju ir tehniski grūti iegūt, jo uztvērējs šinī shēmā atrodas zem mikroskopa optiskās daļas. Lai varētu salīdzināt savstarpēji iegūtos rezultātus, tiek pieņemts lietot šos leņķiskos izmērus arī turpmākajos pētījumos ar dzīvām acīm.

### 2.2.3.2 Pilna acs modeļa analīze

Pilnam acs modelim tika apskatīts cauri izgājušā starojuma spektrs un tā izmaiņu atkarība no acs struktūrām, kā arī uzņemti atstarojošie spektri no acs priekšējām daļām. Tika veikts neliels iegriezums 2mm no redzes nerva, nesabojājot pārējo acs struktūru

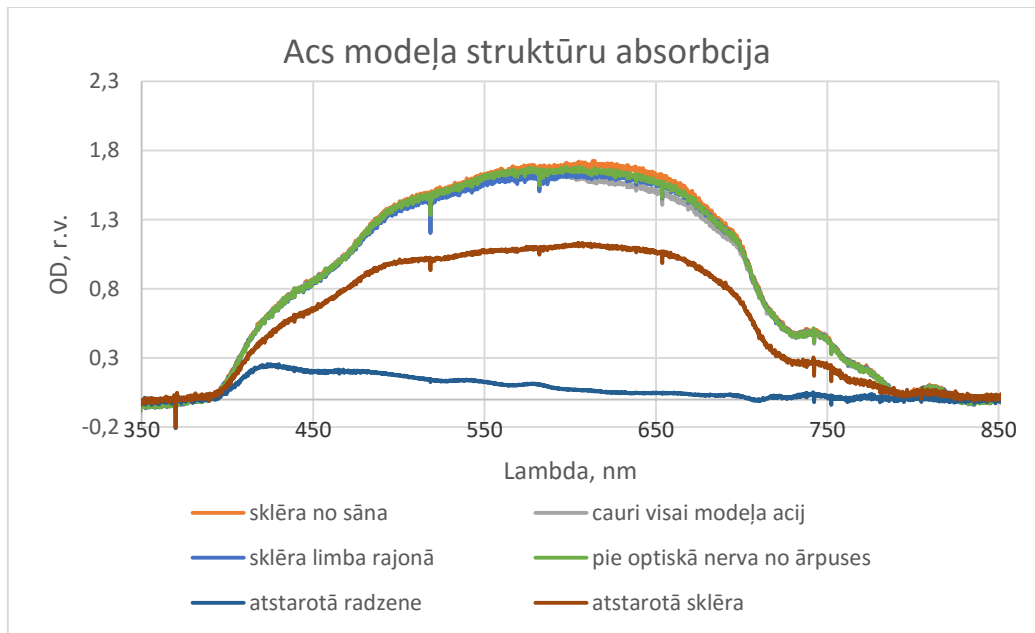
(stiklveida ķermenis paliek neskarts). Šajā atverē tiek ievietots uztvērēja gals un attiecīgi nostiprināts, lai uzņemtu cauri izgājušo starojumu. Kā reference visos transparences mērījumos tiek pielietots tiešā gaisma avota spektrs. Veiktie mērījumi redzami 2.12.attēlā.



**2.12 attēls:** cauri izgājušā gaismas spektri. Redzams, ka vismazākā absorbcija ir radzenei un robežvirsmāi radzene- sklēra. Pārējās mērījumu vietās gaismas absorbcija ir liela. No tā var secināt, ka acs caurspīdīgās vides gaismu tikpat kā redzamajā diapazonā neabsorbē, bet acs sklēra absorbē.

Uzņemot absorbcijas līknes jeb vides optisko blīvumu (2.13 attēls), var secināt, ka meklējamā hromofora nav identificējama, bet visinformatīvāk šāda veida pētījumam ir pielietot atstarošanas spektrometriju pēc iespējas šaurākā krītošās un uztvertās gaismas leņķī.

Pēc papildus mērījumiem (1. pielikums) var secināt, ka radzenes atstarošanās sastāda ~ 7 % no krītošās gaismas daudzuma.

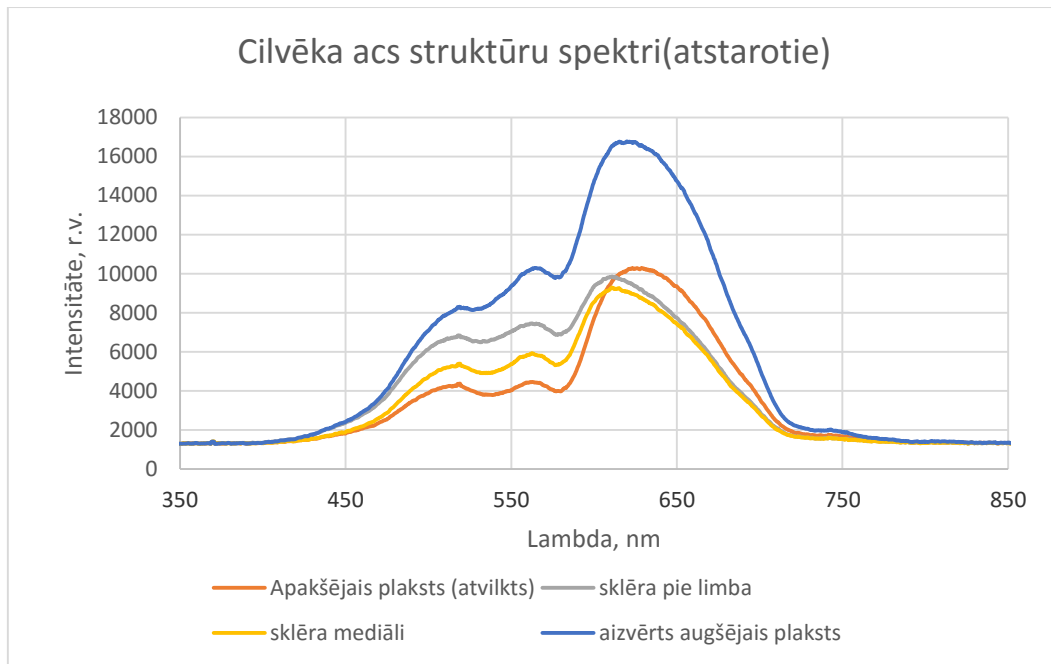


**2.13. attēls:** acs modeļa dažādu struktūru optiskais blīvums. Vismazākā absorbcija ir acs caurspīdīgajām vidēm, lielākā sklērai.

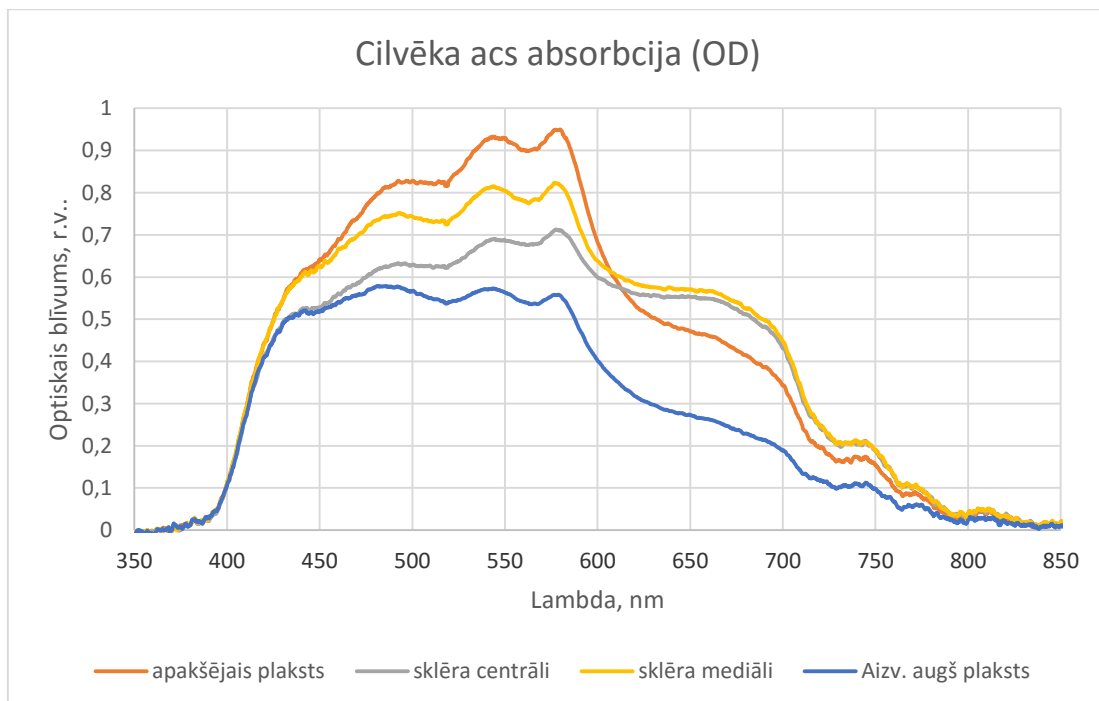
#### 2.2.4. Cilvēka acs spektrometriskā izpēte

Iegūtie dati no acs modeļa analīzes izmantoti, lai uzņemtu dzīva cilvēka acs spektrus. No iepriekš iegūtajiem rezultātiem redzam, ka uz acs lietderīgi veikt mērījumus sklēras daļā aptuveni 5 mm no limba. Darba uzdevums ir uzņemt acs spektrus hromofomu (hemoglobīna) detektēšanai. Lai iegūtu labākus rezultātus, nepieciešams izmantot acs daļu ar vislabāko apasiņošanu. Literatūrā minēts, ka vislielākais asinsvadu sakopojums ir sklēras nazālajā daļā (gan artērijas, gan vēnas) (Meyer, 1988). Darbā tiek veikti mērījumi no sklēras divos punktos, no atvilkta apakšējā plaksta un aizvērtā augšējā plaksta ādas (2.14. attēls).

Kā mērījuma objekts tiek izmantota pusmūža vecuma vīrieša labā acs. Acs veselības stāvoklis vērtējams kā normāls. Acs ir bez vizuāliem iekaisumiem ar vieglu hiperēmiju, bez izteiktiem centrālajiem konjunktīvas asinsvadiem. Plakstu stāvoklis ir normāls, bez izteiktas hiperēmijas. Augšējā plaksta āda plāna, nedaudz krokojas, bez papildus veidojumiem. Eksperimenta laikā novērojama neliela asarošana, kas saistīta ar radītā apžilbinājuma diskomfortu. Mērījumu gaitā tiek ievēroti iepriekšējie eksperimenta nosacījumi, saglabājot apgaismojuma intensitāti, fokusa attālumu un leņķiskos izmērus nemainītus.



**2.14. attēls:** Cilvēka acs uzņemtie spektri no četrām pozīcijām: sklēras 5 mm no limba, sklēras vairāk nazāli, pagriežot aci uz āru, atvilkta apakšējā plaksta un aizvērtā augšējā plaksta ādas. Redzams, ka vislielāko absorbciju rada apakšējais plaksts un sklēras daļa mediāli. Starojuma avota un uztvērēja savstarpējais novietojums netiek izmainīts.



**2.15. attēls:** dzīvas acs daļu absorbcija. Nosakāmi hemoglobīnam raksturīgi līknes maksimumi uz 545 un 580 nm. Redzams, ka no acs atvilktā apakšējā plaksta un sklēras iegūst izteiksmīgāku līkni hromoforu detektēšanai.

Izsakot uzņemtos datus absorbcijā (optiskajā blīvumā-2.15. attēls), var pamanīt noteiktas izliekumu līnijas, kas atšķiras no acs modeļa iegūtajām līknēm ar hemoglobīnam raksturīgiem līknes maksimumiem. Salīdzinot iegūto asins references spektru (2.5. attēls) ar uzņemto spektru no dzīvas acs, var novērot līdzības un skaidri noteikt līknes pārlikuma maksimumus, kas sakrīt ar raksturīgajiem viļņa garumiem 545 un 580 nm. Visizteiktāk hromoforas parādās apakšējā plakstiņa mērījumos, kas ir saprotams, jo šajā apgabalā ir daudz vairāk asinsvadu un virspusējo kapilāru tīklojums nekā acs sklērā. Iespējams, ka stipri hiperemētas acs gadījumā rezultāti būtu līdzīgi.

Tas nozīmē, ka ar atstarošanās spektroskopijas metodi ir iespējams detektēt hromoforas no acs un acs struktūrām.

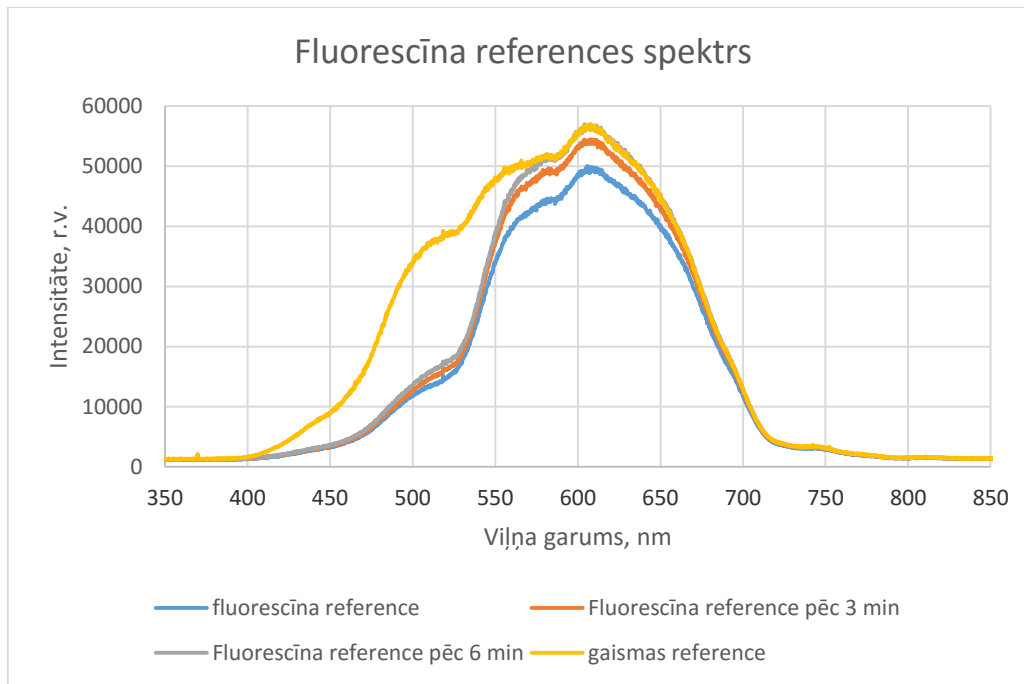
## **2.3. Citu vielu noteikšana organismā, izmantojot acs konjunktīvas spektrometriju**

Maģistra darbā izteikta hipotēze, ka ar spektrometrijas metodi no acs konjunktīvas asinsvadiem iespējams detektēt dažādas vielas un piemaisījumus. Literatūrā atrodamos pētījumos dažādas apreibinošās vielas (alkohols, LSD, amfetamīni, heroīns, kokaīns) tiek detektētas tikai IS starojumā un tīrā veidā, bet nav minēts par vielu parādībām redzamajā gaismā, jo šīs vielas šķīdumā ir pārsvarā bezkrāsainas, kas nosaka vājo spektrālo atbildi. Tāpēc šī pētījuma ietvaros pie dotā gaismas avota un uztverošās iekārtas nav iespējams veikt dažādu augstākminēto vielu iespējamu detektēšanu organismā, izmantojot acs konjunktīvu.

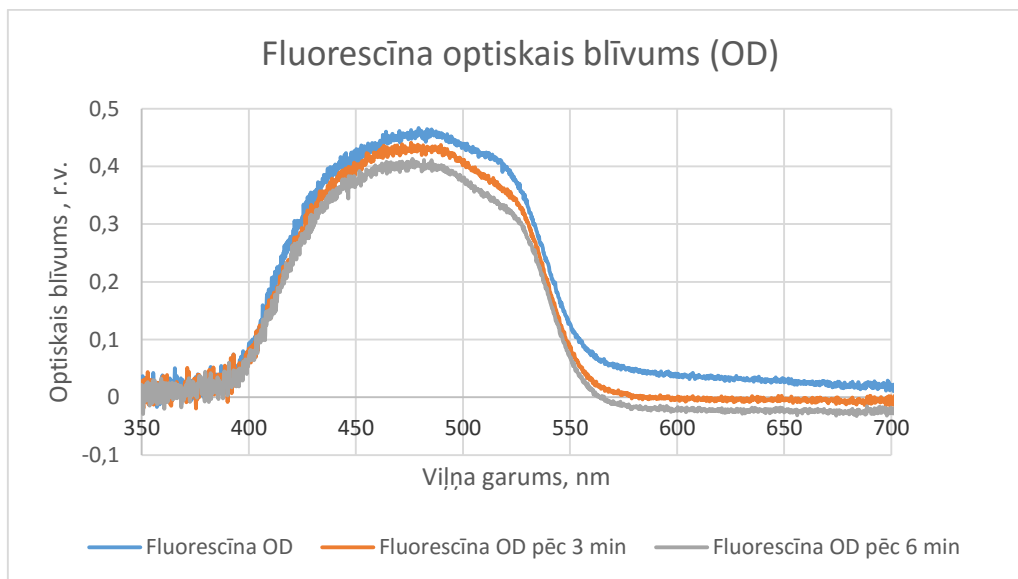
Bet, lai pierādītu metodes izmantojamību vielu noteikšanā dzīvos organismos, tiek izveidots vienkāršots modelis.

### **2.3.1. Fluorescīna spektra uzņemšana**

Par pamatu ņemta oftalmoloģijā izmantojama krāsvielas- fluorescīns, ar ko iekrāsota acs priekšējā daļa. Tiek izmantots firmas "Laboratoire Chauvin" fluorescīna strips, kas tiek samērcēts fizioloģiskajā šķīdumā (0,9% NaCl šķīdums Fresenius Kabi ražojums). Lai iegūtu sākotnējo krāsvielas referenci, viela tiek uznesta uz baltas daudz slāņu kartona loksnes un uzņemts vielas spektrs (2.16. attēls). Tiek fiksētas spektra izmaiņas salīdzinājumā ar gaismas referenci un noteikts izmantotās krāsvielas absorbcijas pārliekums punkts (2.17. attēls), kas ir pie 490nm, kas sakrīt ar literatūrā pieminēto. Dotā reference tiks izmantota tālākā darbā vielas atdalīšanā un identificēšanā.



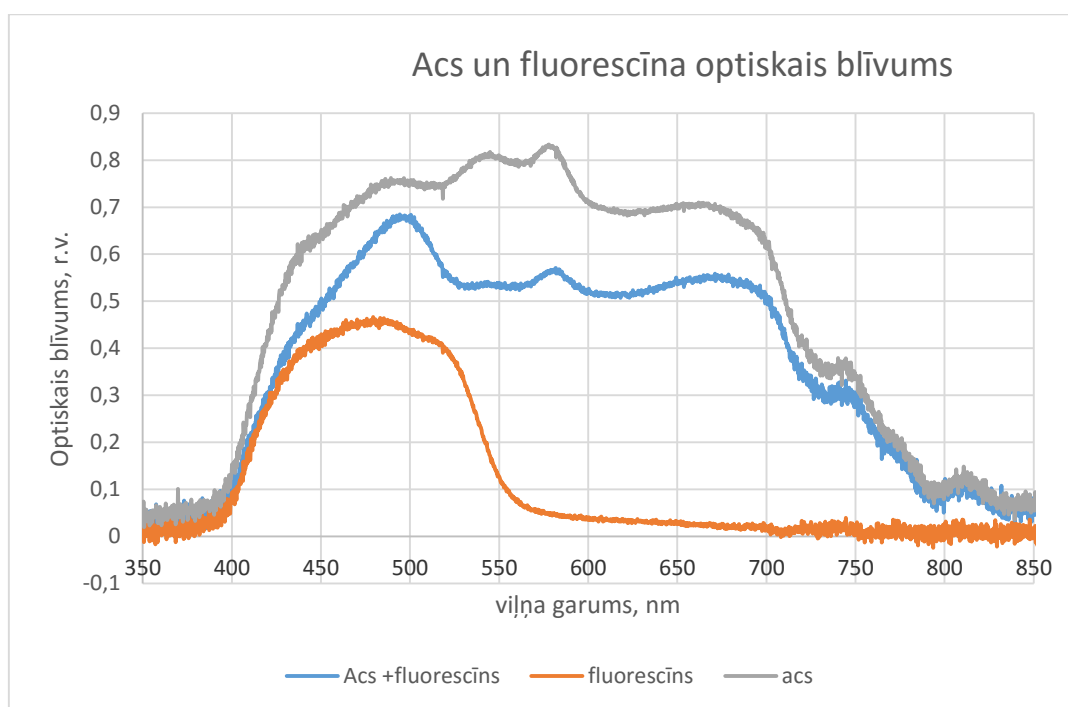
**2.16.attēls:** Fluorescīna referencs spektrs salīdzinājumā ar gaismas referenci un fluorescīna absorbcijas izmaiņas atkarībā no izžūšanas. Parādīts uzņemtais fluorescīna spektrs tajā pašā vietā uzreiz pēc uznešanas, pēc 3 un 6 min žūšanas.



**2.17. attēls:** Fluorescīna absorbcija un izmaiņas laikā. Lai gan nav izteikta maksimuma punkta, tomēr tiek noteikts pārlikuma maksimums pie 490nm, kas sakrīt ar literatūru un tiek identificēts kā fluorescīns.

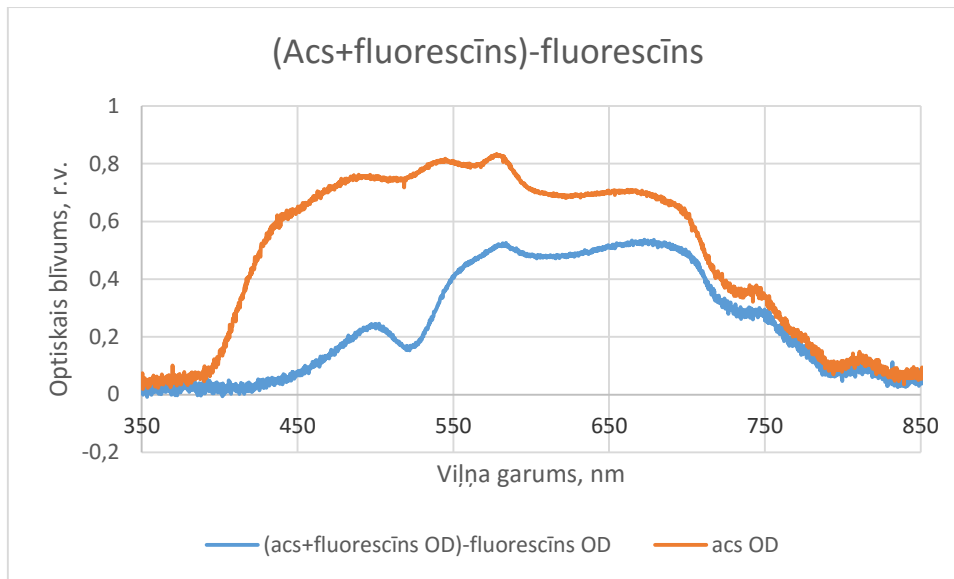
### 2.3.2. Acs un fluorescēna mijiedarbība, detektēšana

Ar fluorescēnu tiek nokrāsota acs priekšējā virsma un veikti mērījumi pēc 2.2. punktā aprakstītās shēmas. Pirms fluorescēna krāsošanas tiek uzņemts tā brīža acs konjunktīvas spektrs. Iegūtie rezultāti parādīti 2.18. attēlā. Redzams skaidri nosakāms hromoforu līknes maksimums uzņemtajā acs konjunktīvas spektrā pie hemoglobīna raksturlielumiem uz 545 un 580nm. Sakarā ar to, ka absorbcijas maksimumi abām vielām ir salīdzinoši tuvu (490nm fluorescēna gadījumā un 545nm hemoglobīnam) tiek stipri izmainīta kopējā acs konjunktīvas audu un fluorescēna absorbcija.



**2.18.attēls:** Fluorescēna, acs konjunktīvas un jaukta absorbcija. Acs konjunktīvas absorbcijas līknē skaidri pamanāmi hemoglobīna radītie pārlikuma maksimuma punkti.

Matemātiski atdalīšanai vajadzētu notikt pēc principa  $(A+B)-B=A$ , kur  $(A+B)$  ir acs konjunktīvas un fluorescēna absorbcija,  $B$ -fluorescēna absorbcija,  $A$ - acs konjunktīvas absorbcija. Pielietojot attiecīgo principu, tika veikta piemaisījumu absorbcijas atņemšana līdzīgi kā parādīts darba 1.2 attēlā. Tā kā vielas nav ideāli tīras un spektri ir samērā tuvu, tad dotais princips pilnībā neizpildās, bet ir nosakāms un identificējams rezultāts (2.19.attēls). Līdzīgs mērījums veikts bez dzīvas acs iesaistīšanās, bet ar asinīm, kas sajauktas ar fluorescēna krāsvielu. Rezultāts ir izteiksmīgāks un precīzāks (sk 1.pielikumu).



**2.19.attēls:** Fluorescēna atdalīšanas rezultāts no kopējās uzņemtās absorbcijas. Zilā līkne skaidri norāda uz hemoglobīna identifikāciju.

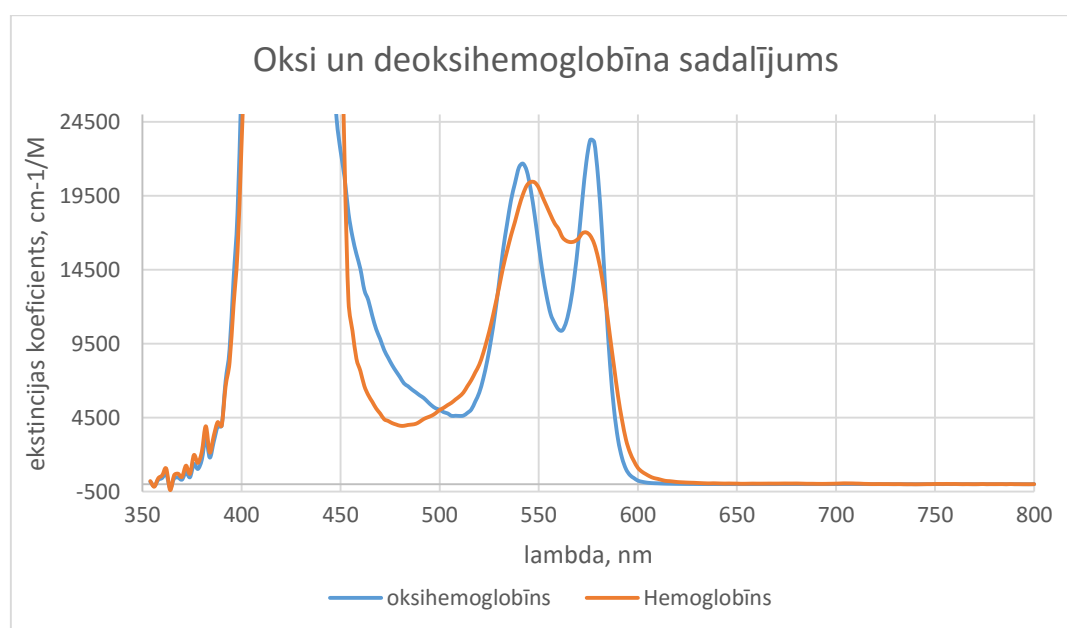
*Rezultātā var tikt uzskatīta kā pierādīta hipotēze, ka ar atstarošanās spektroskopijas metodi var identificēt fluorescēna klātbūtni acs ābola konjunktīvā. Metode var būt daudzsoļa sarežģītāku vielu konstatēšanai organismā, izmantojot acs konjunktīvu.*

## 2.4. Hemoglobīna oksigenācijas pakāpes noteikšana

Kā noteikts darbā iepriekš, visizteiksmīgāk nosakāmā hromofora dzīvajos audos ir asins sastāvā ietilpstošais hemoglobīns. Kā zināms, hemoglobīns var saturēt divas komponentes: oksihemoglobīnu- ar paaugstinātu skābekļa saturu (HbO), un deoksihemoglobīnu (DHb). Abu šo vielu koncentrāciju var izdalīt, zinot kopējo asins absorbciju. Tam lieto ekstincijas jeb molārās absorbcijas koeficientu  $\epsilon$ , kas ir noteikts lielums un atkarīgs no viļņa garuma  $\lambda$ , izejot no Bēra-Lamberta formulas:

$$OD = \lg \frac{I_0}{I} = \lg e \cdot \sum_n (\epsilon_i \cdot C_i)$$

Savukārt, uzzinot oksihemoglobīna un deoksihemoglobīna koncentrāciju var noteikt kopējo skābekļa saturu asinīs. Ekstincijas koeficienti hemoglobīnam parādīti darba 2.pielikumā. Asins spektrs tādā veidā var tikt sadalīts divās atsevišķās līknēs- oksihemoglobīna absorbcijas līkne un deoksihemoglobīna (2.20. attēls).



**2.20. attēls:** oksihemoglobīna un deoksihemoglobīna (hemoglobīna) absorbcija atkarībā no viļņa garuma.

Attiecīgo koncentrāciju var aprēķināt, ja zināms optiskais blīvums (OD). Tā kā iepriekš darbā uzņemti vairāki acs audu un asins absorbcijas spektri, tad šeit tiks analizēti un salīdzināti oksihemoglobīna un deoksihemoglobīna koncentrācijas trim no iegūtiem spektrāliem datiem:

1. Asins referencei, iegūtai uz kartona;
2. Acs ābola konjunktīvai;
3. Acs apakšējam plakstam.

Veicot aprēķinus Matlab Ra2016 programmā, izmantojot mazāko kvadrātu metodi (lsqr), iespējams iegūt koncentrāciju  $c$  relatīvās vērtības. Programmas kods parādīts 3.pielikumā. Programmā tiek ņemts vērā attiecīgais uzņemtais spektrs un aprēķini veikti viļņu garumiem no 500-700 nm, nevis visam dotajam ekstincijas koeficienta spektram (250-1000nm).

Kopējo skābekļa koncentrāciju asinīs procentos iegūst, izdalot oksihemoglobīna koncentrācijas relatīvo vērtību ar kopējā hemoglobīna (oksi+deoksihemoglobīns) koncentrāciju:

$$SpO_2 = HgO / (HgO + DHg) * 100$$

Pēc matemātiskām darbībām iznāk, ka skābekļa daudzums asinīs atšķiras un ir attiecīgi:

1. Asins uz papīra  $SpO_2$ - 59%
2. Acs ābola konjunktīvas mediālās daļas  $SpO_2$ - 53%
3. Apakšējā plaksta konjunktīvas  $SpO_2$ -78%

Iegūtie rezultāti atšķiras no literatūrā uzrādītajiem datiem, kas iegūti ar pirksta oksimetriem, jo abi mērījumi nav salīdzināmi, izmantoto dažādo metožu un mērāmo diapazonu dēļ.

## DISKUSIJA

Latvijas mērogā veikti dažādi biofizikāli pētījumi hromoforu noteikšanai no ādas, bet nav neviena pētījuma, kurā būtu izmantotas acis kā mērķa pētījuma objekts.

Darba gaitā veikti daudzi mērījumi un iegūti dažādi rezultāti gan modelējot bioloģiskos acs audus, gan mērot dzīvus audus. Tā kā acs audi sastāv no dažādām struktūrām, kas līdzīgas ādas struktūrai, tad principiāli ir iespējams salīdzināt pētījumus, kas veikti uz acs audiem, ar pētījumiem uz ādas. Var secināt, ka metodes, kas pielietojamas ādas pētījumos, ir piemērojamas acs audu pētījumos, ņemot vērā audu biežumu atšķirības.

Izmantojot bioloģisko acs modeli, kas aizgūts no mājas cūkas, netika sasniegts gaidītais rezultāts, jo netika apstiprināta hromoforu atrašana. Tas saistīts ar bioloģisko audu sabrukšanu un sadalīšanos īsā laikā pēc nāves, kad izmainās hromoforu ķīmiskā molekulārā struktūra, rodas citas vielas ar citām īpašībām. Līdz ar to tiek pieņemts, ka bioloģiskos acs audus no nedzīvām būtnēm nevar izmantot acs struktūru pētījumiem, jo notiek acs iekšējo struktūru sairšana (tīklenes slāņi, varavīksnene), ja vien mērījumi nenotiek ļoti īsā laikā pēc bioloģiskās nāves (līdz 2h laikā).

Veiktie mērījumi skābekļa daudzuma noteikšanai asinīs atšķiras no literatūrā minētiem skaitļiem. Tas izskaidrojams ar dažādām metodēm koncentrāciju noteikšanā, kā arī no dažādi ņemtiem parametriem. Ja šinī darbā skābekļa saturācijas procents iegūts, analizējot rezultātus no 500-700nm diapazonā, tad ar pirksta oksimetriem analizē izmanto 640 un 900 nm robežas, kas satur citus normēšanas parametrus. Līdz ar to šie rezultāti nav salīdzināmi savā starpā.

Iegūtie rezultāti saskan ar gaidīto, un apstiprinās hipotēze par acs audu izmantošanas iespējām dažādu vielu klātbūtnes noteikšanai organismā. Ņemot vērā mazo gaismas references spektra platumu, būtu nepieciešams turpināt pētījumu, veidojot citu mērījumu shēmu ar iespēju izmantot gaismas avotu ar plašāku spektrālo diapazonu, kas tajā pat laikā nav bīstams acs veselībai. Tad būtu iespējams noteikt citas bioķīmiskas vielas organismā (ūdens saturs, alkohols, narkotiskās vielas), kuru spektrālie pārliekumi atrodas IS diapazonā no 1000-2500 nm. Tieši nelielais gaismas avota spektrālais platums un uztverošā spektrometra diapazons neļāva veikt plašākus

eksperimentus, lai pilnībā apstiprinātu pieņēmumu, ka ar acs audu starpniecību iespējams noteikt dažādu vielu piemaisījumus organismā.

## SECINĀJUMI

1. Ar atstarošanās spektrometrijas metodi var noteikt hromoforas no acs audiem.
2. Ar atstarošanās spektrometrijas metodi, izmantojot redzamo gaismu, no acs audiem iespējams, galvenokārt, iegūt hemoglobīna raksturlielumus, noteikt oksihemoglobīna un deoksihemoglobīna relatīvās koncentrācijas ( $SpO_2$ ).
3. Acs audus var izmantot neinvazīvai vielu noteikšanai organismā, izmantojot atstarošanās spektroskopijas metodi.

## **NOBEIGUMS**

Darbā pierādīts, ka ar atstarošanās spektrometrijas metodi var izmantot acs struktūru pētījumos. Noteikts, ka var tikt identificētas dažādas vielas acs audos. Pēc principiālās mērījumu shēmas ir iespējams vienkāršoti iegūt dažādu hromofomu relatīvo koncentrāciju mērījumus, kā arī, hemoglobīna gadījumā, izteikt skābekļa piesātinājumu acs audos.

Lai varētu paplašināt meklēto vielu daudzumu, izmantojot pielietoto mērījumu shēmu, nepieciešams atrast gaismas avotu ar plašāku spektrālo joslu (200-2000nm), kā arī izmantot cita veida spektrometru, kura darbības apgabals sakristu vismaz ar radītā starojuma spektra platumu.

## **PATEICĪBAS**

Paldies darba vadītājam Prof. Mārim Ozoliņam par sapratni, veicinošiem komentāriem darba veidošanas gaitā.

Izsaku pateicību Prof. Ivaram Lācim par padomiem, kontaktiem un veltīto laiku konsultācijās.

Liels paldies Dr. fiz. Ingai Saknītei par visa veida palīdzību darba tapšanā.

## IZMANTOTĀ LITERATŪRA

1. Students. O. (1971) Optika. Rīga, Izdevniecība „Zvaigzne”
2. Gaismas atstarošanās un laušanas likumi (n.d) [atsauce 26.12.2015.]. Pieejams: [https://eduspace.lv/pluginfile.php/598/mod\\_resource/content/2/Gaismas\\_atstarosanas\\_lašanas\\_likumi.pdf](https://eduspace.lv/pluginfile.php/598/mod_resource/content/2/Gaismas_atstarosanas_lašanas_likumi.pdf)
3. Valters U. (1992). Viļņu optika un gaismas dispersija. [atsauce 26.12.2015] Pieejams: <https://estudijas.rtu.lv/mod/resource/view.php?id=87967&redirect=1>
4. Williams, M.(2011) Absorption of light. [atsauce 26.12.2015] Pieejams: <http://www.universetoday.com/87943/absorption-of-light/>
5. Harvey David,(2008) Analytical Chemistry 2,0, Chapter 10, pp544-668; Saylor.org,
6. Oleg Kim, John McMurdy, Gregory Jay, Collin Lines, Gregory Crawford, Mark Alber (2014)“Combined reflectance spectroscopy and stochastic modeling approach for noninvasive hemoglobin determination via palpebral conjunctiva”, *Physiological Reports*, Published 1 January 2014 Vol. 2 no. e00192 DOI: 10.1002/phy2.192
7. Mobley, J., Vo-Dinh, T.(2003) Chapter 2: Optical Properties of Tissue. In: Biomedical Photonics Handbook. CRC Press LLC, p. 1 – 76.
8. Michael J. Iuliano (2007), Method and apparatus for performing in-vivo blood analysis using raman spectrum. *Patent nr. US 7209773 B2*
9. Kristīne Šalma-Ancāne (2010)” Praktisko darbu materiāls „Ķīmiskā analīze”.”; RVT
10. Frederick J. Barrera, Brian Yust, Lawrence C. Mimun, Kelly L. Nash, Andrew T. Tsin, Dhiraj K. Sardar (2013). Optical and spectroscopic properties of human whole blood and plasma with and without Y2O3 and Nd3+:Y2O3 nanoparticles. *Lasers Med Sci* DOI 10.1007/s10103-013-1268-7.
11. Christopher G. Owen, E. Geoffrey Woodward (2004). A comparison of manual and automated methods of measuring conjunctival vessel widths from photographic and digital images. *Ophthalmic and Physiological Optics*, Volume 24, Issue 2, pages 74–81, March 2004

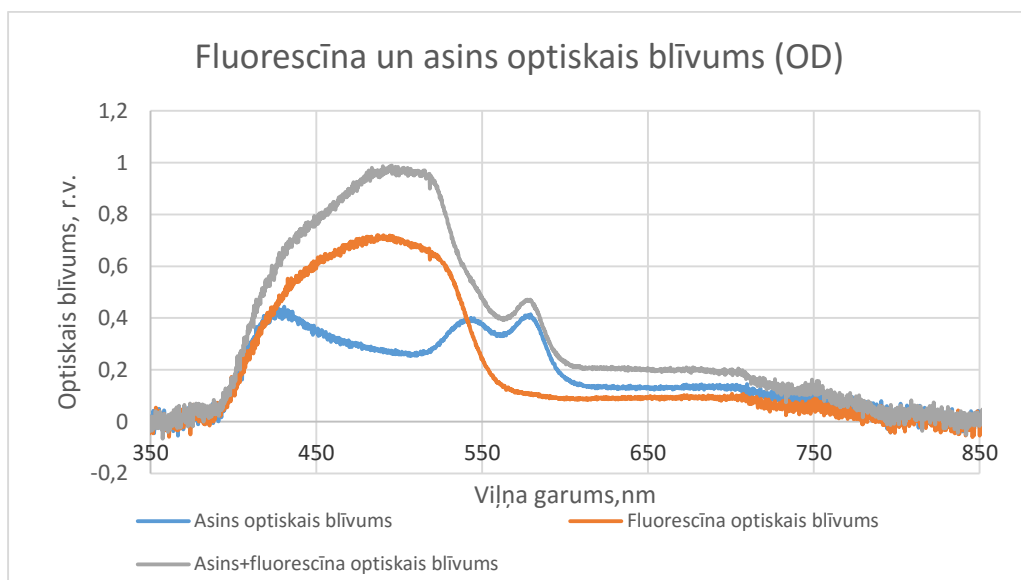
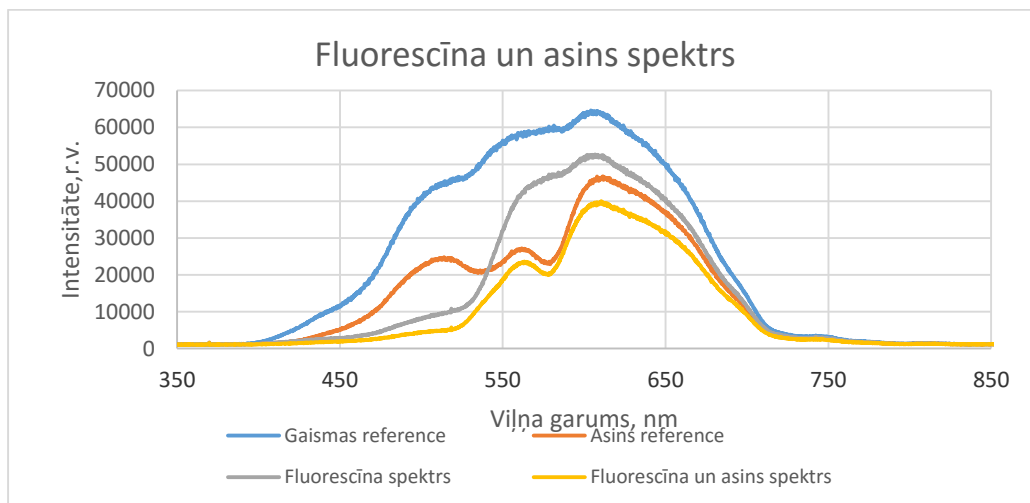
12. Häggblad, E.(2008). In Vivo Diffuse Reflectance Spectroscopy of Human Tissue. Doctoral thesis. Linköping : Linköping University, 151 p.
13. Fundamentals of UV-Visible spectroscopy (2000). Workbook. Agilent technologies. [atsauce 28.12.2015] . Pieejams:  
[www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5980-1398E.pdf](http://www.agilent.com/cs/library/primers/Public/5980-1398E.pdf)
14. Anterior segment blood supply. (n.d.). [atsauce 29.12.2015] Pieejams:  
[http://www.cybersight.org/bins/volume\\_page.asp?cid=1-2161-2163-2182](http://www.cybersight.org/bins/volume_page.asp?cid=1-2161-2163-2182)
15. Becker, Ch.A.,(n.d.) Composition of Blood . [ atsauce 29.12.2015]. Pieejams:  
<https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/the-blood>
16. Meyer, Paul A.R.(1988) “Patterns of Blood Flow in Episcleral Vessels Studied by Low-Dose fluorescein Videoangiography”, *The Eye ,edition 2*, pp 533-546
17. Park, J.D.J., Karesh, J (n.d.) Topografic Anatomy of the Eye: An Overview. [atsauce 28.12.2015]. Pieejams:  
<http://www.oculist.net/downaton502/prof/ebook/duanes/pages/v7/v7c001.html>
18. Tooke, J.E., Ostergren, J., Lins, P.E., Fagrell, B.,(1987) “Skin microvascular blood flow control in long duration diabetics with and without complication”, *Diabetes Research, Vol. 5*, pages 189–192
19. Minkovich, VP; Starodumov, AN; Marochkov, AV (2001). Changes in transmission spectrum of human venous blood under action of low-intensity He-Ne laser *LASER PHYSICS* 11(5), pp. 632-635
20. Prahl Sc. Optical Absorption of Hemoglobin (1999) [atsauce 27.12.2015]. Pieejams: <http://omlc.org/spectra/hemoglobin/>
21. USB4000 Fiber Optic spectrometer Installation and Operation Manual. (n.d.) Document Number 211-00000-000-02-0908 *Ocean Optics, Inc.* World Headquarters 830 Douglas Ave., Dunedin, FL, USA 34698
22. Allen, J., Murray, A. (1999) Modelling the relationship between peripheral blood pressure and blood volume pulses using linear and neural network system identification techniques, *Physiological measurment*, VOL.20, pp.287301

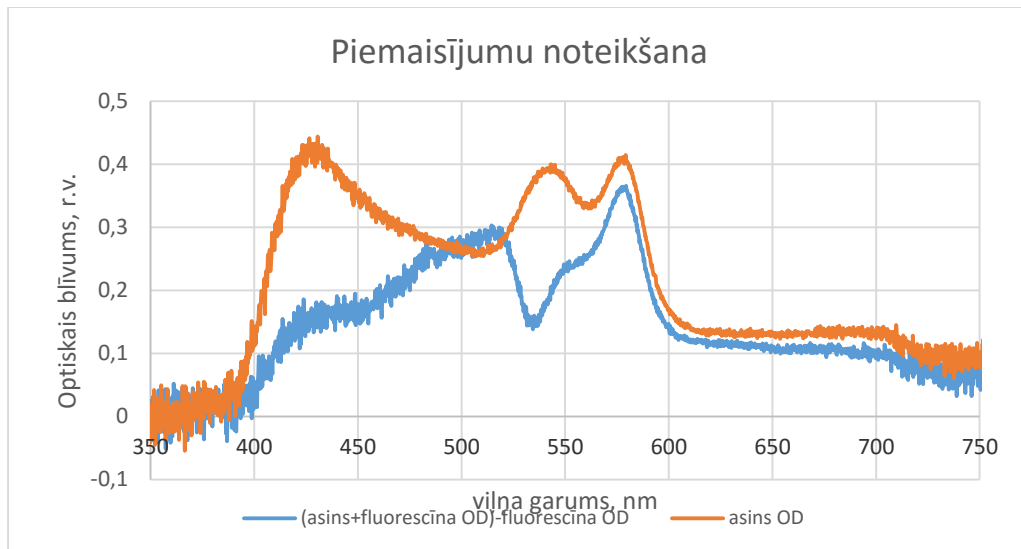
23. Anderson, R., Parrish, J. (1981). The Optics of Human Skin, *Journal of Investigative Dermatology*, pp.13-18.
24. Sanchez, I., Martin, R., Ussa, F., Fernandez-Bucno, I (2011). The parameters of the porcine eyeball, *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 249; pp 475-482
25. Saknīte I. (2015). Optical non-invasive estimation and mapping of skin bilirubin, hemoglobin and water, *Doctoral Thesis*, University of Latvia

# PIELIKUMI

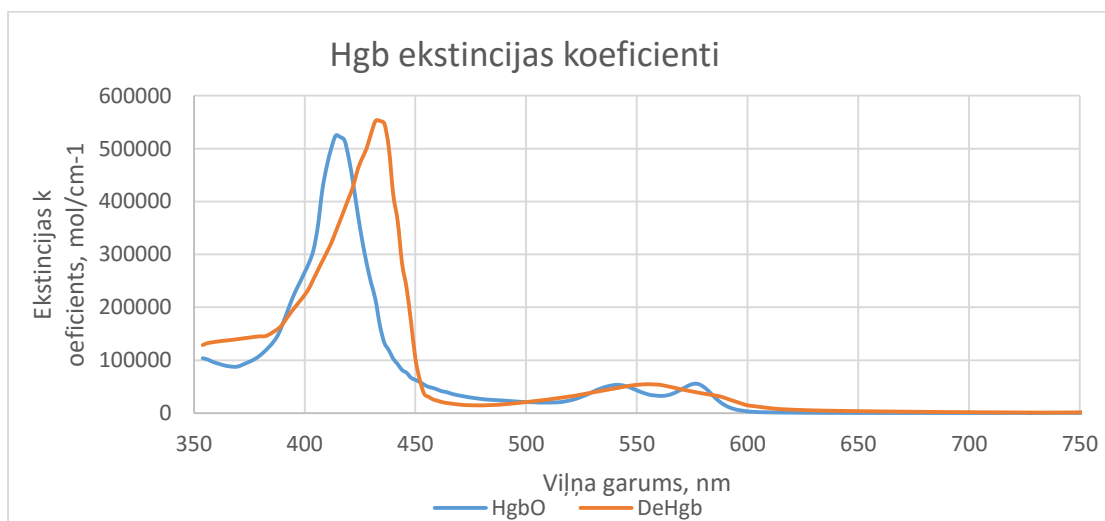
## 1. PIELIKUMS. Darbā neuzrādīto mērījumu rezultāti

1. Fluorescīna un asins šķīduma vielu savstarpēja sadalīšana, vielas uzklātas uz references papīra.

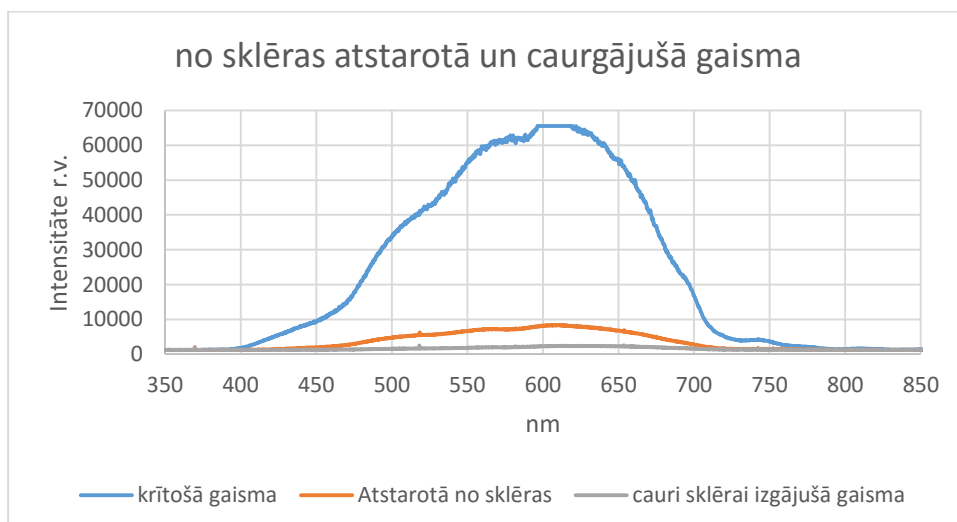




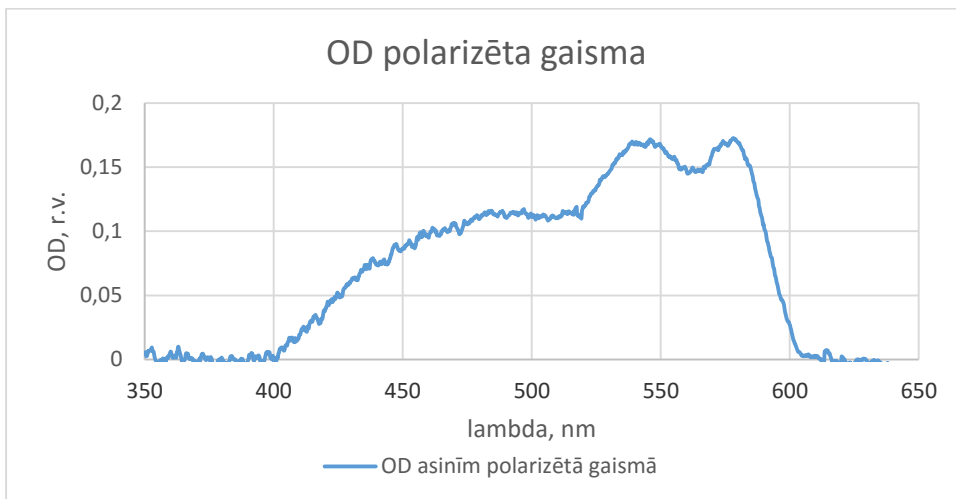
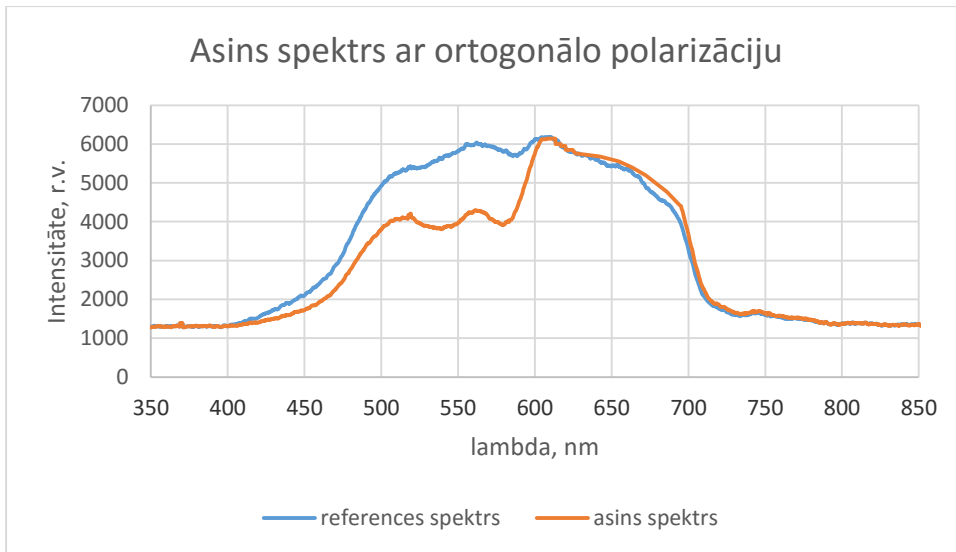
2. Hemoglobīna ekstincijas koeficienti. Koeficientu reizinājums ar asins referenci. Iegūtais esošais sadalījums.



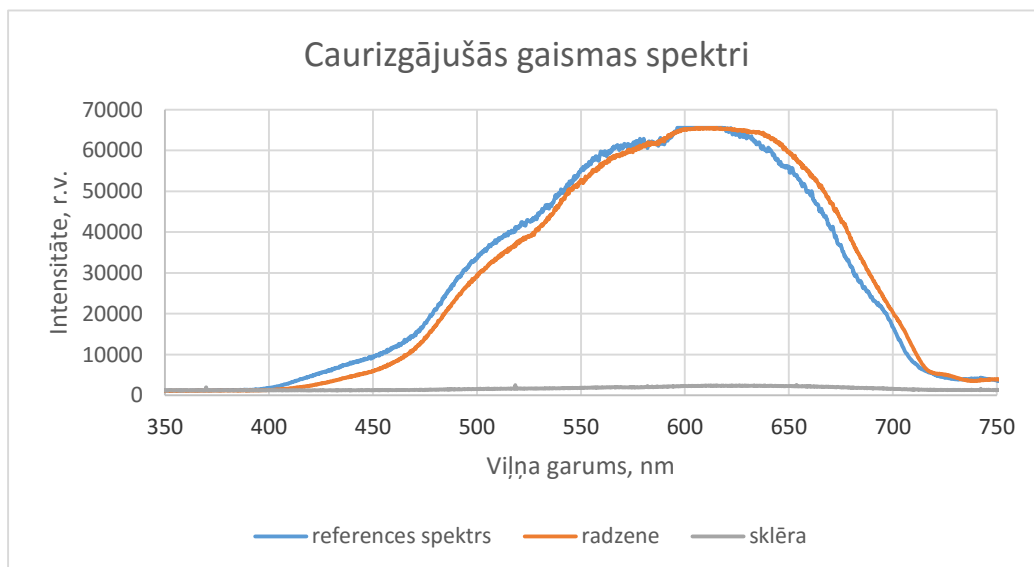
3. Sklēras mērījumi: no sklēras atstarotā un cauri izgājušās gaismas salīdzinājums

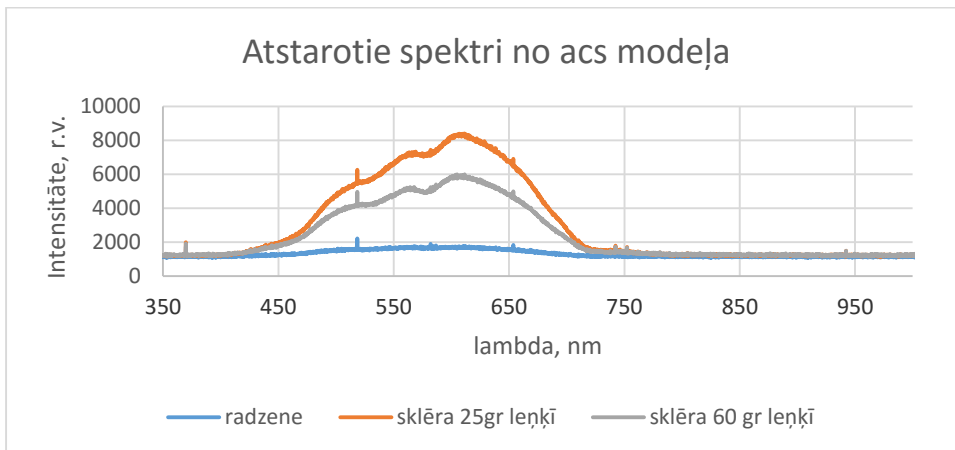


4. Mērījumi ar polarizētu gaismu, izmantojot ortogonālo polarizāciju.



5. Radzenes caurlaidības un atstarošanās salīdzinājums atkarībā no references spektra





## 2. PIELIKUMS. Hemoglobīna molārās ekstincijas koeficienta vērtības atkarībā no viļņa garuma

Hemoglobīna ekstincijas koeficienti [20]

lambda	HbO2	Hb		322	82256	78284				
nm	cm-1/M	cm-1/M		324	85972	82060		398	248404	212712
250	106112	112736		326	89796	85592		400	266232	223296
252	105552	112736		328	93768	88516		402	284224	236188
254	107660	112736		330	97512	90856		404	308716	253368
256	109788	113824		332	100964	93192		406	354208	270548
258	112944	115040		334	103504	95532		408	422320	287356
260	116376	116296		336	104968	99792		410	466840	303956
262	120188	117564		338	106452	104476		412	500200	321344
264	124412	118876		340	107884	108472		414	524280	342596
266	128696	120208		342	109060	110996		416	521880	363848
268	133064	121544		344	110092	113524		418	515520	385680
270	136068	122880		346	109032	116052		420	480360	407560
272	137232	123096		348	107984	118752		422	431880	429880
274	138408	121952		350	106576	122092		424	376236	461200
276	137424	120808		352	105040	125436		426	326032	481840
278	135820	119840		354	103696	128776		428	283112	500840
280	131936	118872		356	101568	132120		430	246072	528600
282	127720	117628		358	97828	133632		432	214120	552160
284	122280	114820		360	94744	134940		434	165332	552160
286	116508	112008		362	92248	136044		436	132820	547040
288	108484	107140		364	89836	136972		438	119140	501560
290	104752	98364		366	88484	137900		440	102580	413280
292	98936	91636		368	87512	138856		442	92780	363240
294	88136	85820		370	88176	139968		444	81444	282724
296	79316	77100		372	91592	141084		446	76324	237224
298	70884	69444		374	95140	142196		448	67044	173320
300	65972	64440		376	98936	143312		450	62816	103292
302	63208	61300		378	103432	144424		452	58864	62640
304	61952	58828		380	109564	145232		454	53552	36170
306	62352	56908		382	116968	145232		456	49496	30698.8
308	62856	57620		384	125420	148668		458	47496	25886.4
310	63352	59156		386	135132	153908		460	44480	23388.8
312	65972	62248		388	148100	159544		462	41320	20891.2
314	69016	65344		390	167748	167780		464	39807.2	19260.8
316	72404	68312		392	189740	180004		466	37073.2	18142.4
318	75536	71208		394	212060	191540		468	34870.8	17025.6
320	78752	74508		396	231612	202124		470	33209.2	16156.4

472	31620	15310		548	46660	52496		622	858	6193.2
474	30113.6	15048.4		550	43016	53412		624	774	5906.8
476	28850.8	14792.8		552	39675.2	54080		626	707.6	5620
478	27718	14657.2		554	36815.2	54520		628	658.8	5366.8
480	26629.2	14550		556	34476.8	54540		630	610	5148.8
482	25701.6	14881.2		558	33456	54164		632	561.2	4930.8
484	25180.4	15212.4		560	32613.2	53788		634	512.4	4730.8
486	24669.6	15543.6		562	32620	52276		636	478.8	4602.4
488	24174.8	15898		564	33915.6	50572		638	460.4	4473.6
490	23684.4	16684		566	36495.2	48828		640	442	4345.2
492	23086.8	17469.6		568	40172	46948		642	423.6	4216.8
494	22457.6	18255.6		570	44496	45072		644	405.2	4088.4
496	21850.4	19041.2		572	49172	43340		646	390.4	3965.08
498	21260	19891.2		574	53308	41716		648	379.2	3857.6
500	20932.8	20862		576	55540	40092		650	368	3750.12
502	20596.4	21832.8		578	54728	38467.6		652	356.8	3642.64
504	20418	22803.6		580	50104	37020		654	345.6	3535.16
506	19946	23774.4		582	43304	35676.4		656	335.2	3427.68
508	19996	24745.2		584	34639.6	34332.8		658	325.6	3320.2
510	20035.2	25773.6		586	26600.4	32851.6		660	319.6	3226.56
512	20150.4	26936.8		588	19763.2	31075.2		662	314	3140.28
514	20429.2	28100		590	14400.8	28324.4		664	308.4	3053.96
516	21001.6	29263.2		592	10468.4	25470		666	302.8	2967.68
518	22509.6	30426.4		594	7678.8	22574.8		668	298	2881.4
520	24202.4	31589.6		596	5683.6	19800		670	294	2795.12
522	26450.4	32851.2		598	4504.4	17058.4		672	290	2708.84
524	29269.2	34397.6		600	3200	14677.2		674	285.6	2627.64
526	32496.4	35944		602	2664	13622.4		676	282	2554.4
528	35990	37490		604	2128	12567.6		678	279.2	2481.16
530	39956.8	39036.4		606	1789.2	11513.2		680	277.6	2407.92
532	43876	40584		608	1647.6	10477.6		682	276	2334.68
534	46924	42088		610	1506	9443.6		684	274.4	2261.48
536	49752	43592		612	1364.4	8591.2		686	272.8	2188.24
538	51712	45092		614	1222.8	7762		688	274.4	2115
540	53236	46592		616	1110	7344.8		690	276	2051.96
542	53292	48148		618	1026	6927.2		692	277.6	2000.48
544	52096	49708		620	942	6509.6		694	279.2	1949.04
546	49868	51268								

696	282	1897.56		772	663.6	1262.44		848	1054	691.52
698	286	1846.08		774	677.2	1213		850	1058	691.32
700	290	1794.28		776	689.2	1163.56		852	1062	691.08
702	294	1741		778	699.6	1114.8		854	1066	690.88
704	298	1687.76		780	710	1075.44		856	1072.8	690.64
706	302.8	1634.48		782	720.4	1036.08		858	1082.4	692.44
708	308.4	1583.52		784	730.8	996.72		860	1092	694.32
710	314	1540.48		786	740	957.36		862	1101.6	696.2
712	319.6	1497.4		788	748	921.8		864	1111.2	698.04
714	325.2	1454.36		790	756	890.8		866	1118.4	699.92
716	332	1411.32		792	764	859.8		868	1123.2	701.8
718	340	1368.28		794	772	828.8		870	1128	705.84
720	348	1325.88		796	786.4	802.96		872	1132.8	709.96
722	356	1285.16		798	807.2	782.36		874	1137.6	714.08
724	364	1244.44		800	816	761.72		876	1142.8	718.2
726	372.4	1203.68		802	828	743.84		878	1148.4	722.32
728	381.2	1152.8		804	836	737.08		880	1154	726.44
730	390	1102.2		806	844	730.28		882	1159.6	729.84
732	398.8	1102.2		808	856	723.52		884	1165.2	733.2
734	407.6	1102.2		810	864	717.08		886	1170	736.6
736	418.8	1101.76		812	872	711.84		888	1174	739.96
738	432.4	1100.48		814	880	706.6		890	1178	743.6
740	446	1115.88		816	887.2	701.32		892	1182	747.24
742	459.6	1161.64		818	901.6	696.08		894	1186	750.88
744	473.2	1207.4		820	916	693.76		896	1190	754.52
746	487.6	1266.04		822	930.4	693.6		898	1194	758.16
748	502.8	1333.24		824	944.8	693.48		900	1198	761.84
750	518	1405.24		826	956.4	693.32		902	1202	765.04
752	533.2	1515.32		828	965.2	693.2		904	1206	767.44
754	548.4	1541.76		830	974	693.04		906	1209.2	769.8
756	562	1560.48		832	982.8	692.92		908	1211.6	772.16
758	574	1560.48		834	991.6	692.76		910	1214	774.56
760	586	1548.52		836	1001.2	692.64		912	1216.4	776.92
762	598	1508.44		838	1011.6	692.48		914	1218.8	778.4
764	610	1459.56		840	1022	692.36		916	1220.8	778.04
766	622.8	1410.52		842	1032.4	692.2		918	1222.4	777.72
768	636.4	1361.32		844	1042.8	691.96		920	1224	777.36
770	650	1311.88		846	1050	691.76		922	1225.6	777.04
924	1227.2	776.64								
926	1226.8	772.36								
928	1224.4	768.08								
930	1222	763.84								
932	1219.6	752.28								

934	1217.2	737.56							
936	1215.6	722.88							
938	1214.8	708.16							
940	1214	693.44							
942	1213.2	678.72							
944	1212.4	660.52							
946	1210.4	641.08							
948	1207.2	621.64							
950	1204	602.24							
952	1200.8	583.4							
954	1197.6	568.92							
956	1194	554.48							
958	1190	540.04							
960	1186	525.56							
962	1182	511.12							
964	1178	495.36							
966	1173.2	473.32							
968	1167.6	451.32							
970	1162	429.32							
972	1156.4	415.28							
974	1150.8	402.28							
976	1144	389.288							
978	1136	374.944							
980	1128	359.656							
982	1120	344.372							
984	1112	329.084							
986	1102.4	313.796							
988	1091.2	298.508							
990	1080	283.22							
992	1068.8	267.932							
994	1057.6	252.648							
996	1046.4	237.36							
998	1035.2	222.072							
1000	1024	206.784							

### 3. PIELIKUMS. Matlab programmas kods oksihemoglobīna un deoksihemoglobīna koncentrācijas aprēķināšanai

Ehb\_mod=ehb (1:200); [definē Hg ekstincijas koef. vērtības]

Edoh\_mod=edoh (1:200); [definē DeoksiHg ekstincijas koef. vērtības]

Od\_mod=OD (1:200); [definē optiskā blīvuma vērtības no rezultātiem]

E=[Ehb\_mod Edoh\_mod]; [definē masīvu ekstincijas koeficientam]

C=lsqr (E, Od\_mod) [izsaka vielu koncentrāciju ar mazāko kvadrātu metodi]

Maģistra darbs "Acs struktūru novērtēšana ar spektroskopijas metodi"  
izstrādāts LU Fizikas un Matemātikas fakultātē.

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

Autors:

St. apl. Nr. jb 14043

Jānis Bērziņš

2016.gada 30. maijā

Rekomendēju darbu aizstāvēšanai

Darba vadītājs:

prof. Dr.fiz. Māris Ozoliņš

2016.gada \_\_\_\_.

Recenzents: Dr. fiz. Varis Karitāns

Darbs iesniegts Optometrijas un redzes zinātnes nodaļā 2016.gada \_\_.majā

Dekāna pilnvarotā persona: metodiķe Dzintra Holsta

Darbs aizstāvēts Valsts pārbaudījuma komisijas sēdē

2016.gada \_\_\_\_ protokola Nr. \_\_\_\_\_

Komisijas sekretārs: \_\_\_\_\_