

**ზაზა ჯალიაშვილი**

**ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენცია ბიოლოგიურ  
ქსოვილებში**

წარდგენილია დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად

საქართველოს ტექნიკური  
უნივერსიტეტი  
თბილისი, 0175, საქართველო  
2008

© საავტორო უფლება ზაზა ჯალიაშვილი, 2008

# საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტი

## ინფორმატიკისა და მართვის სისტემების ფაკულტეტი

ჩვენ, ქვემოთ ხელისმომწერნი ვადასტურებთ, რომ გავეცანით ჯალაიაშილი ზაზას მიერ შესრულებულ სადისერტაციო ნაშრომს დასახელებით: “ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენცია ბიოლოგიურ ქსოვილებში” და ვაძლევთ რეკომენდაციას საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტის ინფორმატიკისა და მართვის სისტემების ფაკულტეტის სადისერტაციო საბჭოს მის განხილვას დოქტორის აკადემიური ხარისხის მოსაპოვებლად.

ხელმძღვანელი: ზ. მელიქიშვილი

ხელმძღვანელი: თ. მედოიძე

რეცენზენტი: \_\_\_\_\_

რეცენზენტი: \_\_\_\_\_

რეცენზენტი: \_\_\_\_\_

საქართველოს ტექნიკური უნივერსიტეტი  
2008

ავტორი: ზაზა ჯალიაშვილი  
დასახელება: ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენცია  
ბიოლოგიურ ქსოვილებში  
ფაკულტეტი: ინფორმატიკისა და მართვის სისტემების  
აკადემიური ხარისხი: დოქტორი  
სხდომა ჩატარდა:

ინდივიდუალური ან ინსტიტუტების მიერ შემომოყვანილი დასახელების დისერტაციის გაცნობის მიზნით მოთხოვნის შემთხვევაში მისი არაკომერციული მიზნებით კოპირებისა და გავრცელების უფლება მინიჭებული აქვს საქართველოს ტექნიკურ უნივერსიტეტს.

---

ავტორის ხელმოწერა

ავტორი ინარჩუნებს დანარჩენ საგამომცემლო უფლებებს და არც მთლიანი ნაშრომის და არც მისი ცალკეული კომპონენტების გადაბეჭდვა ან სხვა რაიმე მეთოდით რეპროდუქცია დაუშვებელია ავტორის წერილობითი ნებართვის გარეშე.

ავტორი ირწმუნება, რომ ნაშრომში გამოყენებული საავტორო უფლებებით დაცული მასალებზე მიღებულია შესაბამისი ნებართვა (გარდა იმ მცირე ზომის ციტატებისა, რომლებიც მოითხოვენ მხოლოდ სპეციფიურ მიმართებას ლიტერატურის ციტირებაში, როგორც ეს მიღებულია სამეცნიერო ნაშრომების შესრულებისას) და ყველა მათგანზე იღებს პასუხისმგებლობას.

წინამდებარე, მოკრძალებულ, ნაშრომს ვუძღვნი ჩემი პირველი სამეცნიერო ხელმძღვანელის და დამრიგებლის ფიზიკა–მათემატიკის მეცნიერებათა დოქტორის, პროფესორ გივი ცინცაძის ხსოვნას. ძალიან დასანანია, რომ დღეს იგი ჩვენს გვერდით აღარაა.

## რეზიუმე

ოპტიკური/ლაზერული სპექტროსკოპიის გამოყენებამ ძალზე მნიშვნელოვანი ტექნოლოგიების შექმნას დაუდო საფუძველი. განსაკუთრებით საინტერესოა მისი გამოყენება მედიცინაში. კერძოდ ბიოსტრუქტურების ოპტიკური თვისებების შესწავლა დღეს სწრაფად განვითარებადი მიმართულების – ოპტიკური (ლაზერული) სამედიცინო დიაგნოსტიკის საფუძველს წარმოადგენს, ხოლო ბიოქსოვილის ოპტიკა და სპექტროსკოპია ბოლო ათწლეულის განმავლობაში მეცნიერების ცალკე დარგად ჩამოყალიბდა.

ბოლო წლების მონაცემებით, მსოფლიოში, ავთვისებიანი სიმსივნით საშუალოდ წელიწადში 6.7 მილიონი ადამიანი კვდება. ეს ვითარება მკურნალობისა და დიაგნოსტიკის არსებული თანამედროვე ტექნოლოგიების განვითარებასთან ერთად ახალი ტექნოლოგიების შექმნასაც მოითხოვს. განსაკუთრებული მნიშვნელობა მიენიჭა პაციენტზე ორიენტირებული ეფექტური და ადრეული დიაგნოსტიკის ახალი ტექნოლოგიების შექმნას. აქედან გამომდინარე სიმსივნური წარმონაქმნების ადრეული და ზუსტი დიაგნოსტიკის მნიშვნელობაც კიდევ უფრო გაიზარდა. სამედიცინო პრაქტიკაში სიმსივნური წარმონაქმნების არსებული დიაგნოსტიკის ტრადიციული მეთოდები როგორც წესი სერიოზული პრობლემების წინაშე დგას დიაგნოზის დასმის სიზუსტის, სისწრაფის და არაინვაზიურობის (უზიანობის) თვალსაზრისით. მართლაც, კიბოს ადრეული სტადიის დადგენა ძირითადად ეფუძნება საექვო არეების ვიზუალურ აღმოჩენას, რომელსაც მოსდევს ინვაზიური ბიოფსია და გარკვეული დამუშავების შემდეგ ნიმუშის მიკროსკოპით გამოკვლევა. შესაბამისად დიაგნოზის დასმა დროში გაჭიმული პროცესია და ქსოვილის სერიოზულ დაზიანებასთანაა დაკავშირებული. ამ თვალსაზრისით ახალი მეთოდების შემუშავება კვლავაც ძალზე აქტუალურია. დღეისათვის მსოფლიოში ინტენსიურად მუშავდება ისეთი პრინციპულად ახალი დიაგნოსტიკური ტექნოლოგიები, ძირითადად ლაზერული, რომლებმაც უნდა უზრუნველყონ დიაგნოზის დასმა რეალური დროის რეჟიმში,

ბიოლოგიური ქსოვილის მინიმალური ან სრული დაუზიანებლობის პირობებში.

ამ საკითხებისადმი ჩვენი მიდგომა ფიზიკურია და ეფუძნება ლაზერის გამოსხივებით სხვადასვა ბიოქსოვილებში ფლუორესცენციის ინდუცირებას და მისი სპექტრის ანალიზს. მეთოდი საშუალებას იძლევა განვახორციელოთ ბიოქსოვილის პათოლოგიის მყისიერი დადგენა და ქირურგიული ოპერაციების დროს გადაგვარებული არის კონტროლი რეალური დროის რეჟიმში. ეს უკანასკნელი ოპერაციების ეფექტურობას მნიშვნელოვნად გაზრდის. რაც შეეხება არაინვაზიურობას იგი მიიღწევა ლაზერული გამოსხივების ნანოწამიანი იმპულსების გამოყენებით. ამ შემთხვევაში შესაძლებელია ინდუცირებული გამოსხივების (ფლუორესცენციის) საიმედოდ დაფიქსირება ქსოვილის უმნიშვნელოდ გათბობის პირობებში, რომელიც რეალობაში შეგვიძლია უგულვებელყოთ. ლაზერული ტექნოლოგიები ყველა შემთხვევაში ეყრდნობა ნივთიერებისა და გამოსხივების ურთიერთქმედების ფუნდამენტური პროცესების უშუალო ანალიზს. ეს პროცესებია ლაზერის გამოსხივების ერთჯერადი და მრავალჯერადი გაბნევა და ლაზერის დასხივებით ბუნებრივ ფლუოროფორებში, ანუ ბიომოლეკულებსა და მათ კომპლექსებში, ინდუცირებული ფლუორესცენცია. შესაბამისად შესაძლებელია ერთი ან ორივე მეთოდის გამოყენება, თუმცა, ჩვენის აზრით, ამ პროცესების შესწავლა *ex vivo* სტადიაზე ავლენს ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის იმ პრიორიტეტებს, რომლებიც საფუძვლად უნდა დაედოს ლაზერული დიაგნოსტიკის ეფექტური ტექნოლოგიებისა და შესაბამისი აპარატურის შექმნას. კერძოდ, ბიოქსოვილებში გაბნევისა და ფლუორესცენციის პროცესების შესწავლა დიაგნოსტიკის თვალსაზრისით სხვადასხვა ინფორმაციის მატარებელია. თუ გაბნევა ძირითადად უჯრედის ბირთვების ფორმის ცვლილებაზე რეაგირებს ფლუორესცენციის ანალიზი მაკრომოლეკულების კომპლექსების წარმოქმნასა და უჯრედში მიმდინარე ბიოქიმიურ პროცესებს ასახავს.

ამრიგად, განსახილველ ნაშრომში ძირითადი ყურადღება დათმობილი აქვს ბიოქსოვილებსა და მის უჯრედულ ფრაგმენტებში ფლუორესცენციის სპექტრების შესწავლას და მიღებულ შედეგებზე

დაყრდნობით ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციით დიაგნოსტიკის ტექნოლოგიების შემუშავებას. ამ შემთხვევაში გარკვეული ტალღის სიგრძის მქონე ლაზერის გამოსხივების ზემოქმედებით ბიოქსოვილი იწყებს ფლუორესცირებას და მისი სპექტრი დამოკიდებულია პათოლოგიის რაობაზე და მის სიმძიმეზე.

მიმოხილული პროცესების საფუძვლიანი კვლევა საშუალებას იძლევა შეიქმნას არაინვაზიური ან მინიმალურად ინვაზიური ბიოსამედიცინო დიაგნოსტიკის ტექნოლოგიები ბიოლოგიური ქსოვილების სხვადასხვა პათოლოგიების დასადგენად, მათ შორის სიმსივნეებისთვისაც. ასევე შესაძლებელია შეიქმნას ბიოქსოვილში, ცოცხალ უჯრედებში მორფოლოგიური და ფიზიოლოგიური პროცესების დინამიკის, მათზე სხვადასხვა ტოქსინების, კანცეროგენული და სამკურნალო ნივთიერებების ზემოქმედების კონტროლის ეფექტური ტექნოლოგიები და აპარატურა.

წარმოდგენილი სამუშაოს მიზანია სხვადასხვა მდგომარეობაში მყოფი ბიოქსოვილების ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრების შესწავლა, რაც ქსოვილში მიმდინარე ცვლილებების და ამ ცვლილებების რაობის დადგენისთვის არის აუცილებელი.

სადისერტაციო ნაშრომში გამოყენებულია სხვადასხვა მდგომარეობის ბიოქსოვილების ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტროსკოპია.

პირველად არის წარმოდგენილი სხვადასხვა პათოლოგიების ეტალონური სპექტრები.

ჩვენს მიერ ჩატარებულმა გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ არსებობს ცალსახა კავშირი ბიოქსოვილის ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრის ფორმასა და პათოლოგიის სახეს შორის. ნაჩვენებია, რომ ამ გზით შესაძლებელია სხვადასხვა მდგომარეობაში მყოფი ბიოქსოვილების პათოლოგიურობის ხარისხის შეფასება, რაც სიმსივნეების დიფერენციალური დიაგნოსტიკისთვის თვისობრივად ახალ საშუალებას იძლევა.

ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტროსკოპიის მეთოდის გამოყენებით გაზომილ იქნა, ვირთაგვებში ბუნებრივი გზით

შეყვანილი ეგზოგენური ფლუოროფორის ვიტამინი A-ს განაწილებისა და აკუმულირების დინამიკა.

აღნიშნული კვლევები ჩატარებულია ორი სახის დანადგარზე და გამოყენებულია მონაცემთა შეგროვების და დამუშავების თანამედროვე კომპიუტერული ტექნოლოგიები.

ფლუორესცენციის სპექტრების საშუალებით იდენტიფიცირებულია ადამიანის ფარისებრი ჯირკვლის ნორმალური ქსოვილის და ისეთი პათოლოგიების მახასიათებელი სპექტრალური ხაზები, როგორებიცაა ადენომა, პაპილური კარცინომა, ფოლიკულური კარცინომა და ჩიყვი.



## RESUME

Using optical/laser spectroscopy also provided a basis for creation of very important technologies. Especially interesting is its use in medical practice. Particularly, today studying optical properties of biological structures represents the basis for rapidly developing direction – optical (laser) medical diagnostic of biological tissues and spectroscopy has developed into separate field of science during the last decade.

As the recent investigations have shown, 6.7 million people are dying on average each year on cancer. These circumstances demand new methods and technologies of early cancer diagnostic and treatment. The main goal of the project was the development of patient-oriented, efficient and early cancer diagnostic methods. Proceed from these, the main goal of the project was the development of patient-oriented, efficient and early cancer diagnostic methods. The main problems of the traditional diagnostic methods are long diagnostic times, inaccurate diagnostics and that they damage biological tissue. The diagnostics of the early cancer stage is mainly based on the visual discovering of the suspicious tissue areas, their invasive biopsy and investigation under a microscope. Because of this, the traditional diagnostic methods are damaging the tissue and are long-term processes. Because of all these problems, the development of new diagnostic methods is very important. Actually, many new methods are based on the laser technologies, providing damage-free, real-time diagnosis

Our approach is physical and based on the spectral analysis of the fluorescence in different types of biological tissues induced by the laser irradiation (laser induced fluorescence – LIF for short). Our method makes possible the immediate determination of the pathologies of biological tissues and the real time control of abnormal area during a surgical operation that can importantly raise the success of the surgery invasion. One of the main advantages of our method is the noninvasivity reached by the nanosecond laser radiation. In this case it is possible to fix the laser induced fluorescence data without overheating and thermal damage of the tissue, that we can neglect. All the laser technologies are based on the analysis of the fundamental processes of laser-matter interactions. These processes are the single and multiple scattering of laser radiation and the laser induced fluorescence in biomolecules and

their clusters. Thus it is possible to use one or both of these processes, however, in our opinion, the investigations of these processes show *ex vivo* these priorities that must build the base for developing efficient technologies and equipments. The investigation of scattering and fluorescence in biological tissues carry different information from the diagnostic point of view. In contrary to the scattering that mainly reacts on the change of the form of the cell core, the fluorescence analysis provides information about the creation of macromolecule complexes and the biochemical processes inside the cells.

Thus, in the proceedings under consideration the basic attention is paid to studying spectrums of fluorescence in biological tissues and their cellular fragments and depended on the results received, to development of technologies of diagnostics by induced fluorescence. In this case, the spectra and duration of the fluorescence induced by a radiation of a laser beam of certain intensity and ultra short pulses depends on different kinds of the tissue pathology and its degree.

Thorough research of the considered processes allows creating non-invasive or minimally invasive medical and biomedical diagnostic technologies for statement of various pathologies, including tumors. Creation of effective technologies and equipment to control dynamics of morphological and physiological processes in bioplasts, and influence of various toxins, cancerogenic and medicinal substances is also possible.

The purpose of the presented proceedings is studying laser-induced fluorescence spectra of biological tissues in various states, which is necessary to determine current changes in tissues and essence of these changes.

For the first time the patterns for the LIF ( $\lambda=337\text{nm}$ ) spectra of normal and pathological biological tissues (thyroid gland) have been determined and are refining.

As our preliminary investigations have shown, there exists a one-to-one relation between the LIF spectra of thyroid gland tissues and the types of their pathology that gives us the possibility to determine the abnormality degree and to develop an effective, noninvasiv and innovative, based on the physical processes, cancer diagnostic method.

With method use laser induced fluorescence spectroscopy, distribution and dynamics of the accumulation of vitamin A have been measured in rats entered with natural way by endogenous fluorophore.

The described researches were spent on two spectroscopic installations and modern computer technologies of obtaining and data processing were used.

By means of characteristic spectra of fluorescence such pathologies as a Papillary carcinoma, Microfollicular carcinoma, Follicular carcinoma, Adenoma and Goiter are identified.

# შინაარსი

შესავალი.....	xix
1. ლიტერატურის მიმოხილვა.....	24
2. შედეგები და მათი განხილვა.....	37
2.1. ბიოლოგიური ქსოვილის ნიმუშები. ექსპერიმენტული დანადგარი და კვლევის მეთოდები.....	37
2.1.1. ბიოლოგიური ქსოვილის ნიმუშები.....	37
2.1.2. ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის კვლევის ექსპერიმენტული დანადგარი.....	40
2.1.2.1. სინათლის წყაროები.....	44
2.1.2.2. მონოქრომატორები.....	47
2.1.2.3. სხივთა სელა.....	48
2.1.2.4. რეგისტრაცია.....	49
2.1.3. მორგების პროცედურა.....	51
2.1.4. გაბნევისა და შთანთქმის სპექტრების გაზომვა და მონაცემების დამუშავება.....	53
2.1.5. ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენცია.....	61
2.2. ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენცია და დიაგნოსტიკის ფიზიკური საფუძვლები.....	64
2.2.1. ურთიერთქმედების მოდელის შესახებ.....	66
2.2.2. ბიოლოგიური ქსოვილის სინათლესთან ურთიერთქმედების მახასიათებელი ძირითადი სიდიდეები.....	69
2.2.3. ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენცია (LIF).....	73
2.2.4. $M(\lambda_x, \lambda_m)$ -ის გამოთვლა.....	76
3. დასკვნა.....	78
3.1. ექსპერიმენტების შედეგები და მათი განხილვა.....	78
3.1.1. წინასიტყვაობა.....	78
3.1.2. ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენცია ადამიანის ფარისებრი ჯირკვლის ნორმალური და პათოლოგიური უჯრედებიდან.....	82
3.1.3. ფარისებრი ჯირკვლის ნორმალური ქსოვილის ფლუორესცენციის სპექტრები.....	83
3.1.4. ფარისებრი ჯირკვლის პათოლოგიური ქსოვილის ფლუორესცენციის სპექტრები.....	85

3.1.5. კორელაცია სპექტრალური ხაზის ფორმასა და ქსოვილის “გადაგვარებულობას” შორის.....	91
3.1.6. ბიოლოგიური ქსოვილის გადაგვარებულობის განსაზღვრა ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციით.....	97
3.1.6.1. ბიოლოგიური ქსოვილის პათოლოგიურობის ხარისხის შესაფასებელი მოდელი.....	97
3.1.7. ადამიანის ხივეის LIF მიდელი.....	102
3.1.8. ვიტამინი A-ს განაწილების შესწავლა LIF სპექტროსკოპიით.....	109
3.1.8.1. ცხოველები.....	112
3.2. დასკვნები.....	120
გამოყენებული ლიტერატურა.....	122

## ცხრილების ნუსხა

- ცხრილი 1. ბუნებრივი (ენდოგენური) ფლუოროფორების შთანთქმისა და გამოსხივების მაქსიმალური მნიშვნელობები [12]. . . . . 28
- ცხრილი 2. სარკისებრი არეკვლის კოეფიციენტის ( $r_{sp}$ ) დამოკიდებულება ჰაერი/კვარცის მინა/ბიოქსოვილი გარემოზე დაცემული გამოსხივების ტალღის სიგრძეზე ( $\lambda$ ).  $T = 300K$  [80,114]. . . 56
- ცხრილი 3. მოცემულია ნახ.15-16 გამოსატული ღაზებით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრების ძირითად ნიშანთვისებათა უხეში დახასიათება. . . . . 96

## ნახაზების ნუსხა

- ნახ.1. ფარისებრი ჯირკვლის მიკროსტრუქტურა გამოსახულება  
მიღებულია ციფრული მიკროსკოპით  $\times 200$  გადიდებით. . . . . 38
- ნახ.2. ფლუორესცენციური ანალიზის ექსპერიმენტალური დანადგარი . .  
. . . . . 41
- ნახ.3. ექსპერიმენტული დანადგარი. L1, L2 – ლინზები; F – ოპტიკური  
ფილტრი; Ch – მწვევტარა; FM – სისშირის გამამრავლებელი  
არაწრფივი კრისტალები; PM – ფოტოელექტრონული  
გამამრავლებელი. სხვადასხვა სახის ნიმუშები მაგრდება მოძრავ  
სადგამზე. . . . . 43
- ნახ.4. ინტენსივობის გამტარებლობის ( $T_{coll}$ ) გაზომვის ექსპერიმენტი  
ბიოლოგიურ ქსოვილში კოლიმირებული სინათლის გავლისას. . .  
. . . . . 54
- ნახ.5. დამატებითი ტელესკოპური მოწყობილობა. . . . . 57
- ნახ.6.  $Cr^{3+}:Al_2O_3$  კრისტალის შთანთქმის სპექტრის ( $R_1$  და  $R_2$  ხაზები)  
მრუდის ჰიპოთეტური მრუდით აპროქსიმაცია. . . . . 59
- ნახ.7. ატომებიდან ორგანიზმისაკენ [84]. . . . . 65
- ნახ.8. ადამიანის ფარისებრი ჯირკვლის ნორმალური *ex vivo* ქსოვილების  
22 ნიმუშის 460 nm-ზე ნორმირებული სპექტრები. . . . . 84
- ნახ.9. ნორმალური ქსოვილის ფლუორესცენციის გასაშუალოებული  
სპექტრი. . . . . 85
- ნახ.10. პაპილური კარცინომის ქსოვილის ლაზერით ინდუცირებული  
ფლუორესცენციის სპექტრები. მიმდებარე ქსოვილი (წვევტილი  
ხაზი); კიბოს ქსოვილი (უწვევტი ხაზი). . . . . 87
- ნახ.11. მიკროფოლიკულური კარცინომის ქსოვილის ლაზერით  
ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრები. მიმდებარე  
ქსოვილი (წვევტილი ხაზი); კიბოს ქსოვილი (უწვევტი ხაზი). . 88
- ნახ.12. ფოლიკულური კარცინომის ქსოვილის ლაზერით ინდუცირებული  
ფლუორესცენციის სპექტრები. მიმდებარე ქსოვილი (წვევტილი  
ხაზი); კიბოს ქსოვილი (უწვევტი ხაზი). . . . . 89

ნახ.13. მიკრო და მაკროფოლიკულური ადენომის ქსოვილის ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრები. მიმდებარე ქსოვილი (წყვეტილი ხაზი); ადენომატოზური ქსოვილი (უწყვეტი ხაზი). . . . .	90
ნახ.14. ფოლიკულური ადენომის ქსოვილის ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრები. მიმდებარე ქსოვილი (წყვეტილი ხაზი); ადენომატოზური (უწყვეტი ხაზი). . . . .	91
ნახ.15. ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრები: ნორმალური (უწყვეტი), ადენომა (წყვეტილი) და კიბოს (წერტილოვანი). . . . .	93
ნახ.16. შერეული ხასიათის მქონე ორი ნიმუშის ფლუორესცენციის სპექტრები, რომლებიც აგებულია უკიდურესი შემთხვევების, ნორმალურის (უწყვეტი) და კიბოს (წერტილოვანი) კომბინაციის გზით. ზედა (უწყვეტი) რუხი მრუდის სპექტრი შედგება: 70% კიბოს და 30% ნორმალური ქსოვილისგან; ქვედა (უწყვეტი) რუხი მრუდის სპექტრი შედგება: 55% ნორმალური და 45% კიბოს ქსოვილისგან; წყვეტილი შავი ხაზებით ნაჩვენებია შესაბამისი “მორგებული” სპექტრები. . . . .	95
ნახ.17. პაპილარული კარცინომის ქსოვილის ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრები. მიმდებარე ქსოვილი (a), კიბოს ქსოვილი (b) და შერეული მდგომარეობების ქსოვილი (c,d). სპექტრები ნორმირებულია 465nm-ის შესაბამის ამპლიტუდაზე. . . . .	100
ნახ.18. პაპილური კარცინომის ქსოვილის ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრები. შერეული მდგომარეობების ქსოვილი (c,d), წარმოდგენილია სუფთა მდგომარეობების წრფივი სუპერპოზიციის შესაბამისი მრუდებით (c') და (d'). ქვედა (c') მრუდი: 50% მიმდებარე და 50% კიბოს ქსოვილი; ზედა (d') მრუდი: 20% მიმდებარე და 80% კიბოს ქსოვილი. . . . .	101
ნახ.19. ფარისებრი ჯირკვლის სხვადასხვა წერტილების <b>LIF</b> სპექტრები. . . . .	105



ნახ.20. ჩიყვის ქსოვილის ექსპერიმენტული (b) და მორგებული მრუდები,  $D_b = 0.43$  გადაგვარების ხარისხით. მორგებული მრუდი მიღებულია (a) და (d) მრუდების წრფივი სუპერპოზიციით. . . 106

ნახ.21. ჩიყვის ქსოვილის ექსპერიმენტული (c) და მორგებული მრუდები,  $D_b = 2.33$  გადაგვარების ხარისხით. მორგებული მრუდი მიღებულია ნახ.19. (a) და (d) მრუდების წრფივი სუპერპოზიციით. . . . . 107

ნახ.22. ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილში აღმოჩენილია ორი პათოლოგიის თანაარსებობა: ჩიყვი და ადენომა. . . . . 108

ნახ.23. ვიტამინი A-ს (a) (რეტინოლ აცეტატი) ზეთოვანი ხსნარის, **LIF** სპექტრი. . . . . 115

ნახ.24. საკონტროლო ჯგუფის ვირთაგვების ნაწლავის ილეუმის ნაწილის და ღვიძლის ქსოვილების **LIF** სპექტრები: **NADH**-ს დამატებული კოლაგენი (b) და **NADH** (c). . . . . 116

ნახ.25. ექსპერიმენტალური ვირთაგვების ნაწლავების ილეუმის ნაწილის **LIF** სპექტრები (d) და მორგებული სპექტრები (e), გამოთვლილი (a) და (b) მრუდებით. . . . . 117

ნახ.26. ექსპერიმენტალური ჯგუფის ვირთაგვების ღვიძლის ქსოვილის **LIF** სპექტრები (f) და მორგებული სპექტრები (g), გამოთვლილი (a) და (c) მრუდებით. . . . . 118

## მადლიერება

დიდი მადლობა მინდა გადავუხადო ჩემს სამეცნიერო ხელმძღვანელებს ზაზა მელიქიშვილსა და თამაზ მედლოძეს, მათი უანგარო და თავდადებული შრომისთვის. რომ არა მათი ძალისხმევა წარმოუდგენელი იქნებოდა ამ ნაშრომის შექმნა. ასევე მინდა გამოვხატო მადლიერება კიბერნეტიკის ინსტიტუტის დირექციის, საქართველოს ონკოლოგიის ნაციონალური ცენტრის, ქართულ-გერმანული სპეციალიზებული ონკოლოგიური კლინიკის ხელმძღვანელის, სახელმწიფო სამედიცინო აკადემიის ონკოლოგიის კათედრის გამგის, სახელმწიფო პრემიის ლაურეატის, მედიცინის მეცნიერებათა დოქტორის, პროფესორ კ. მარდაღეიშვილის, ფიზიოლოგიის ინსტიტუტის, ბიოქიმიური ნეიროფარმაკოლოგიის ლაბორატორიის გამგის, ბიოლოგიის მეცნიერებათა დოქტორის, პროფესორ რ. სოლომონიას, თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტის ბიოქიმიის დეპარტამენტის ხელმძღვანელის, პროფესორ პ. თუშურაშვილის და ინგლისის, კრამფილდის უნივერსიტეტის პროფესორ ჯ. რამსდენის მიმართ იმ მხარდაჭერისთვის, რომელსაც მუდმივად ვღებულობდით მათგან სამუშაოების მსვლელობისას.

დისერტაციის შექმნისას გამოყენებული მონაცემების მნიშვნელოვანი ნაწილის მოპოვება უზრუნველყო საქართველოს ეროვნული სამეცნიერო ფონდის (GNSF) მიერ დაფინანსებული გრანტის - “ლაზერული კანცეროსკოპი” (GNSF/ST06/4-041) ფარგლებში ჩატარებულმა კვლევებმა, რომლის მონაწილეც იყო ავტორი.

## შესავალი

ადამიანის ორგანიზმი  $10^{14}$  (100000 მილიარდი) რაოდენობის 210 განსხვავებული ტიპის უჯრედს შეიცავს. ასეთი რთული სისტემა დღევანდელი ახალშობილის სახით კარგად განვითარებულ ქვეყნებში დაახლოებით 100 წლის მანძილზე იფუნქციონირებს მუდმივი უჯრედული რეპროდუქციის, კონტროლირებადი დაყოფის, აპოფტოზისა (უჯრედის სიკვდილი) და ასევე ძალზე ეფექტური აღდგენითი პროცესების ხარჯზე. თუ აღდგენითი პროცესები მოიშალა ორგანიზმში დაავადება ვითარდება. დღეისათვის 30000 ზე მეტი დაავადებაა ცნობილი, რომელთა 2/3-ის წინაშე თანამედროვე სამედიცინო ტექნოლოგიები უძლურია [1]. ზოგადად, კიბოც ასეთ დაავადებებს განეკუთვნება.

ყველამ კარგად ვიცით, რომ კიბო მსოფლიო მნიშვნელობის პრობლემაა, ის არ სცნობს საზღვრებს და ყოველ ჩვენთაგანს პირდაპირ ან ირიბად მაინც ეხება. მსოფლიოს ჯანდაცვის საზოგადოებრივი სამსახურის მონაცემების თანახმად, დღეისათვის მსოფლოში კიბოთი დაავადებული დაახლოებით 25 მილიონი ადამიანია, ხოლო ყოველწლიურად ამ დაავადებისაგან 6.7 მილიონი ადამიანი იღუპება [2]. მაგალითად, ამერიკის შეერთებულ შტატებში პანკრეასის ჯირკვლის ადენოკარცინომა კიბოთი სიკვდილის ერთ-ერთი მთავარი მიზეზია. ბოლო ხუთი წლის მონაცემებით ამ შემთხვევაში გადარჩენის ალბათობა მხოლოდ 4%-ს შეადგენს [3].

ასეთ ვითარებაში, დიაგნოსტიკისა და მკურნალობის არსებულ ტექნოლოგიებთან ერთად აუცილებელია ახალი ტექნოლოგიებისა და მეთოდების შექმნა და მათი დანერგვა. მაგალითად, დიაგნოსტიკის ტრადიციული მეთოდები ვერ იძლევიან ზუსტ დიაგნოზს კიბოს განვითარების ადრეულ სტადიაზე. ასევე პრაქტიკულად გამორიცხულია რეალური დროის რეჟიმში ქსოვილის დიდი უბნების მონიტორინგი, მათ შორის ქირურგიული ოპერაციების დროსაც. სწორედ ამის გამო, ბოლო დროს, განსაკუთრებული ყურადღება ექცევა პაციენტზე ორიენტირებული ადრეული დიაგნოსტიკისა და მკურნალობის ახალი, ეფექტური ტექნოლოგიების შექმნას. თანამედროვე მსოფლიოში

მოთხოვნა ასეთ ტექნოლოგიებზე ძალზე მაღალია. ამ მიზნით 2002-2006 წლებში ევროკავშირმა დაახლოებით 475 მილიონი ევრო გამოყო [4].

ამრიგად, საბოლოო ჯამში, დიაგნოსტიკის არსებული კონვენციური მეთოდების გამოყენება მთელ რიგ შემთხვევებში, რბილად რომ ვთქვათ, “მოუხერხებელია”:

- **დღესდღეობით სამედიცინო პრაქტიკაში დომინირებს დამაზიანებელი, ინვაზიური ბიოფსია.** მიუხედავად იმისა, რომ უკვე 1895 წელს რენტგენის სხივებმა მოგვცეს ადამიანის შინაგანი ორგანოების პირველი არაინვაზიური გამოსახულება, მაინც ვერ მოხერხდა, რომ კომპიუტერულ და პოზიტრონულ-ემისიურ ტომოგრაფიას, მაგნიტურ-რეზონანსულ და ულტრაბგერით კვლევის მეთოდებს მიეღწიათ ისეთი გარჩევისუნარიანობისათვის, რომ მათი საშუალებით შესაძლებელი გამხდარიყო კიბოს განვითარების ადრეულ საფეხურზე აღმოჩენა. მაგალითად, მკერდის კიბო რენტგენის სხივების საშუალებით ფიქსირდება, როდესაც სიმსივნე დაახლოებით 100 მილიონ უჯრედს შეიცავს. ეს რიცხვი მხოლოდ ერთი რიგით აღემატება იმ უჯრედების რაოდენობას, რომელსაც გამოცდილი ექიმი მექანიკურად აფიქსირებს [1,5].
- **სირთულეები ადრეული ავთვისებიანობის დიაგნოზისას, განპირობებული დამკვირვებლებს შორის დაბალი შეთანხმების ხარისხით.** თანამედროვე კვლევის მეთოდები ზოგადად ქსოვილის საეჭვო ადგილების ვიზუალურ გამოკვლევას მოიცავს. შემდგომ შესაძლოა საჭირო გახდეს ინვაზიური ბიოფსია. ბიოფსიის ნიმუშებს უტარებენ ჰისტოპათოლოგიურ ანალიზს. ნიმუშის დისპლაზიურობის და ავთვისებიანობის მანვენებელია მისი მეტაბოლური აქტივობა, ეპითელიუმის სისქე, სტრომის არქიტექტურა (სიდრმე და სიმკვრივე) და უჯრედის ბირთვის მორფოლოგია (ზომა, სიმკვრივე, ფორმა). ამ მანვენებლების შესაბამისი სიდიდეების რეგისტრაცია გართულებულია ორი მიზეზის გამო: (i) დისპლაზია ყოველთვის არ დაიმზირება ვიზუალური გამოკვლევით, ასე რომ აუცილებელია უამრავი არასაჭირო ქსოვილის ამოკვეთა ბიოფსიის მასალის

ანალიზისთვის; (ii) დისპლაზიის დიაგნოზირება საკმაოდ რთულია დამკვირვებლებს შორის დაბალი შეთანხმების ხარისხის გამო [6,7]. უფრო მეტიც, ზოგჯერ ტრადიციული ციტოლოგია ერთმანეთისაგან ვერ ანსხვავებს კეთილთვისებიან და ავთვისებიან სიმსივნეებს, მაგალითად ფოლიკულურ ნეოპლაზიებს ფარისებრ ჯირკვალში [8].

- **სადღეისოდ არ არსებობს კიბოს უჯრედების განსაზღვრის “მყისიერი” მეთოდები.** როგორც წესი, ქირურგი ოპერაციის დროს, დაექვების შემთხვევაში ქსოვილის ნიმუშს საექვო უჯრედებით ლაბორატორიაში აგზავნის და თვითონ 10 – 15 წუთის განმავლობაში ელოდება ექსპრესს ანალიზის შედეგს. უჯრედების ონკოგენურობის დადასტურების შემთხვევაში ის ცვლის ოპერაციის სტრატეგიას. პირველი, ამ შემთხვევაში შეუძლებელია ზუსტად დაიგეგმოს ქირურგიული ჩარევის საზღვრები, ვინაიდან ის მოითხოვს ოპერაციის მსვლელობისას ექსპრესს ანალიზის მრავალჯერ ჩატარებას, ანუ ფართო არის კონტროლს. მეორე საექვო არეების გამოვლენა ვიზუალური დაკვირვებით ხორციელდება. ეს ქირურგის გამოცდილებაზეა დამოკიდებული და შესაბამისად სუბიექტური ფაქტორია. ეს გარემოებები საესებით საკმარისია რათა გააქარწყლოს სამედიცინო პერსონალის ყველა მცდელობა გადაარჩინოს პაციენტი.
- **თანამეწდროვე მსოფლიოში ძალზე მცირეა კიბოს პრევენციის გლობალური ტექნოლოგიები.** ერთ-ერთი ასეთი ტექნოლოგიაა ტელემედიცინის კომპლექსი – “Oncotest-WM01”, რომელიც სხვადასხვა ონკოლოგიური ტესტების კონტროლის ავტომატური მართვის სისტემას წარმოადგენს [9].

ზემოხსენებულ გამოწვევებს ჩვენის აზრით ყველაზე ადეკვატური პასუხი ოპტიკური სპექტროსკოპიის მიღწევებით შეიძლება გავცეთ (იხილეთ [10-20] და იქ ციტირებული ლიტერატურა). ეს მიღწევები საშუალებას იძლევა მოვიპოვოთ ინფორმაცია ნივთიერების აგებულების შესახებ სხვადასხვა მასშტაბებში, მიკროსკოპული დონიდან დაწყებული

და მაკროსკოპული დონით დამთავრებული. მართლაც, ჯაჭვი ატომიდან ორგანიზმისაკენ: ატომი – მოლეკულა – ბიომოლეკულა – სისტემა – უჯრედი – ორგანიზმი (ადამიანის სხეული) შეიცავს სავსებით განსხვავებულ სისტემებს და თუ ოპტიკურ სპექტროსკოპიას ვიყენებთ, როგორც ადამიანის ქსოვილების შემსწავლელ ინსტრუმენტს, მაშინ მისი კონკრეტული სახეობების გამოყენებით შესაძლებელია ინფორმაციის მიღება მოლეკულურიდან ქსოვილურ დონემდე (მაგალითებისათვის იხილეთ [21-28]). ვინაიდან დაავადების განვითარება კომპლექსური პროცესია, და ქსოვილში ის იწვევს მთელი რიგი ფიზიოლოგიური და მორფოლოგიური ხასიათის ცვლილებებს, გონივრულია ვივარაუდოთ, რომ თუ სპექტროსკოპიის რამოდენიმე შესაბამისი მოდალობის (აქ, სამედიცინო ხასიათის ფიზიკური მეთოდებით ზემოქმედებისა და ინფორმაციის მოპოვების ხერხი) კომბინაციას გამოვიყენებთ, ის საშუალებას მოგვცემს მივიღოთ სრულყოფილი ინფორმაცია ბიოლოგიური ქსოვილის მდგომარეობის შესახებ, რაც ზრდის ჩვენს შესაძლებლობებს აღმოვაჩინოთ დაავადება ადრეულ და განვითარების ნებისმიერ სტადიაზე [15].

სამი მოდალობის სპექტროსკოპიის კომბინაციის გამოყენება კლინიკაში უკვე უზრუნველყოფს ამ მიზნების შესრულების შესაძლებლობას. ოპტიკური გამოსხივების გადამტანი და შემგროვებელი ოპტიკურ-ბოჭკოვანი სისტემებით, მძლავრი სინათლის წყაროებით აღჭურვილი დანადგარები, რომლებიც იყენებენ საკუთარი ფლუორესცენციის სპექტროსკოპიის (IFS), დიფუზიური არეკვლის სპექტროსკოპიისა (DRS) და სინათლის გაბნევის სპექტროსკოპიის (LSS) მეთოდებს, სწრაფი და მგრძობიარე დეტექტორების ხარჯზე უზრუნველყოფენ მონაცემთა შეგროვებას, ისეთ დროებში, რომ თავიდან იქნეს აცილებული მექანიკური მოძრაობით გამოწვეული შეცდომები (მაგალითებისათვის იხილეთ [3, 14, 15]). მონაცემების ანალიზი შეიძლება რეალურ დროში განხორციელდეს, რაც თავის მხრივ, საბოლოოდ ამ მეთოდების, როგორც დამოუკიდებელი დიაგნოსტიკური ხერხების გამოყენების საშუალებას იძლევა, როგორც წესი, დამაზიანებელი ბიოფსიის გარეშე. ამ ხერხით შესაძლებელია პაციენტის მკურნალობა რეალურ დროში მონიტორინგის საშუალებით წარიმართოს.

წერტილოვანი სპექტროსკოპიის საფუძველზე შეიძლება ახალი მოდალობები შეიქმნას, კერძოდ ისეთი, რომელიც დიდი ზომის საგნების სპექტროსკოპიულ გამოსახულებას მოგვცემს (მაგალითებისათვის იხილეთ [3, 6, 29, 30]). მისი საშუალებით ქსოვილის დიდი არეების, საექვო დაავადებაზე გამოკვლევა გახდება შესაძლებელი. რადგანაც სამივე მეთოდს ინფორმაციის მოცემა იმ უმნიშვნელო ცვლილებებზეც კი შეუძლია, რომლებიც წინ უსწრებს ნებისმიერ მაკროსკოპულ ვიზუალურ ცვლილებებს, ამიტომ ასეთი მეთოდები არა მარტო გააუმჯობესებს ადრეული პათოლოგიური ცვლილებების აღმოჩენის შესაძლებლობებს, არამედ გააღრმავებს ჩვენს წარმოდგენებს ძირითადი ბიოქიმიური და მორფოლოგიური მოვლენების განვითარებაზე, მაგალითად, ნორმალური ეპითელიუმიდან დისპლაზიამდე და შემდგომ კიბომდე. ეს კი თავის მხრივ გააუმჯობესებს თერაპიული ზემოქმედების ხარისხს.

რეალური დროის, ბიოფსიისგან თავისუფალი მრავალმოდური სპექტროსკოპული ტესტები ადვილად შეიძლება ჩაერთოს კიბოს პრევენციულ გლობალურ ტექნოლოგიებში (ისეთი როგორიცაა [9]), რაც პრევენციულ მედიცინას ახალ საფეხურზე აიყვანს.

# 1. ლიტერატურის მიმოხილვა

კაცობრიობა არასოდეს ყოფილა განებივრებული დაავადებულთა თუ დაავადებათა ნაირსახეობების სიმცირით. ამ მხრივ არც თანამედროვე პერიოდია გამონაკლისი. უკანასკნელი ათწლეულებისათვის დამახასიათებელმა სამეცნიერო-სამრეწველო პროგრესმა დადებით მხარეებთან ერთად მრავალი უარყოფითი შედეგი გამოიღო. გარემო პირობების კატასტროფულმა ცვლილებებმა, პერმანენტული სტრესებით აღსავსე ცხოვრებამ თავისი შედეგები მოიტანა. მათ შორის ერთ-ერთი ყველაზე საყურადღებო, ავადობის მკვეთრი მატებაა, განსაკუთრებით კი სიმსივნური პათოლოგიების.

ამ პრობლემებისადმი გაზრდილმა ყურადღებამ, ბოლო წლების განმავლობაში, მკურნალობისა და დიაგნოსტიკის ტრადიციული მეთოდების მოდერნიზაციის და ახალი მეთოდების შემუშავების აუცილებლობის წინაშე დაგვაყენა. განსაკუთრებით ეს ეხება დიაგნოსტიკას, ვინაიდან სწორად დასმულ დიაგნოზს გადამწყვეტი როლი ეკუთვნის სათანადო მკურნალობის დროულად და წარმატებით დასრულებაში. ქირურგიული ჩარევის ტაქტიკის არჩევისას ავთვისებიანი სიმსივნის შემთხვევაში უნდა იყოს გათვალისწინებული დაავადების სტადია, სიმსივნის ფუნქციონალურ-მორფოლოგიური თავისებურებები და მეტასტაზირება. დიაგნოსტიკის შეცდომები, პაციენტთა ისედაც დაგვიანებული მიმართვების ფონზე, იწვევენ სიმსივნეებით ავადობის რაოდენობისა და გართულებული ფორმების ზრდას. მაღალია პოსტოპერაციული რეციდივების პროცენტი, რაც თავის მხრივ კიდევ ერთხელ მიუთითებს დიაგნოსტიკის სფეროში არსებულ პრობლემებზე.

ბიოქსოვილების ოპტიკა, ბოლო წლების, ერთ-ერთი ინტენსიურად განვითარებადი მიმართულებაა, რომელიც სამედიცინო ოპტიკური ტექნოლოგიების, კერძოდ კი ეფექტური დიაგნოსტიკური მეთოდების შექმნის სფეროში მომუშავე ფიზიკოსებისათვის დიდი ინტერესის საგანს წარმოადგენს.

როდესაც ვახსენებთ ბიოქსოვილების ოპტიკას დიაგნოსტიკის სფეროში, ვგულისხმობთ ბიოქსოვილების სპექტროსკოპიას. სპექტროსკოპიული მეთოდებით შესაძლებელია მივიღოთ ბიოქსოვილის



შესახებ ბიოქიმიური და მორფოლოგიური ინფორმაცია მოლეკულურ, უჯრედულ და ქსოვილურ დონეებზე, ბიოობიექტის დაუზიანებლად [15]. რადგანაც სპექტროსკოპიულ მონაცემთა ანალიზი შესაძლებელია განხორციელდეს რეალური დროის რეჟიმში. ქსოვილის *in vivo* მდგომარეობაში, ქირურგიული ჩარევის, ბიოფსიის ან მკურნალობის შედეგების მონიტორინგისას, ოპტიკურ-ლაზერული სპექტროსკოპია გამოიყენება ქსოვილის მდგომარეობის შეფასების მძლავრ ინსტრუმენტად [6]. ოპტიკური მეთოდების წყალობით, ხშირ შემთხვევაში, შესაძლებელია ბიოფსიაზე უარის თქმაც რაც გვაძლევს შესაძლებლობას ერთი ოპტიკური მანიპულაციით, კომბინირებულად, მოვახდინოთ დეტექტირებაც და დაზიანებების მკურნალობაც [15]. სპექტროსკოპიული მეთოდები ასევე გამოიყენება *ex vivo* რეჟიმში დიაგნოსტიკისას, სადაც ძირითადი აქცენტი გადატანილია დიაგნოზის დასმის სიზუსტეზე [3].

ძირითადი სპექტროსკოპიული მეთოდებიდან სამი განსხვავებული მეთოდი გამოიყენება ნორმალურ და დაავადებულ ქსოვილებში მკაფიოდ განსხვავებული სპექტრალური მახასიათებლების დასადგენად. ემპირიული მეთოდები იღებენ ინფორმაციას გამოსხივების გარკვეული ტალღის სიგრძეებზე ან სპექტრის ცალკეული უბნების ინტენსივობებზე. ასეთი მეთოდები ადვილი გამოსაყენებელია, მაგრამ ამ შემთხვევაში არ არსებობს ინფორმაცია მთელი სპექტრის შესახებ, რომელიც მნიშვნელოვანია რადიკალიზაციის ანალიზისათვის. სტატისტიკური მეთოდები, ისეთი როგორცაა კორელაციური ანალიზის მეთოდი, იყენებს მრავალპარამეტრული გამოსხივების მთელი სპექტრის ანალიზს. მაგრამ ეს მიდგომა ვერ უზრუნველყოფს სპექტრში გამოწვეული ცვლილებების მიზეზების დადგენას, ვინაიდან იგი ბევრ სირთულეებთანაა დაკავშირებული [39].

ზოგიერთმა ავტორმა კორელაციური ანალიზის მეთოდში, ფიქსირებული ტალღის სიგრძის ნაცვლად, კვლევა ტალღის სიგრძეების გარკვეული დიაპაზონისათვის ჩაატარა. მაგალითად, გაბნევის ნორმირებული სპექტრის მრუდის 540-580nm ინტერვალის ფარდობა 400-420nm ინტერვალზე გამოიყენება ნაწლავის ნეოპლაზიის და ჩვეულებრივი ქსოვილების გასარჩევად [31]. იგივე ავტორებმა

გამოიყენეს გაბნევის სპექტრის მრუდის დახრა 330-320nm ინტერვალში შარდის ბუშტის კიბოს და ნორმალური ქსოვილის განსასხვაებლად [32]. პარამეტრების კომბინაცია, რომელიც დაკავშირებულია გაბნევის სპექტრალური ხაზის გარკვეულ ინტერვალთან, მისი დახრა და საშუალო ინტენსივობა გარკვეულ ტალღის სიგრძეზე, გამოიყენებოდა [33] ავთვისებიანი მეღანომისა და პიგმენტაციით დაზიანებული კანის გასარჩევად. კორელაციური მეთოდები ასევე გამოიყენება კანის [34], მკერდის [35] და მსხვილი ნაწლავის [36] ახალწარმონაქმნების გაბნევის სპექტრის მახასიათებლებით იდენტიფიკაციისათვის.

ჩვენი აზრით, ამჟამად, დიაგნოსტიკაში ყველაზე უფრო პერსპექტიულია ბიოლოგიურ ქსოვილში სინათლის გავრცელების სტატისტიკური ანუ ფოტონების მიგრაციის მოდელი [20]. ეს მოდელი რაოდენობრივად აღწერს ქსოვილის ოპტიკურ, მორფოლოგიურ და ბიოქიმიურ თვისებებს. ფოტონების მიგრაციის მოდელზე დაფუძნებული მეთოდებით მიღებული პარამეტრები შეიძლება გამოვიყენოთ ქსოვილის მდგომარეობის კლასიფიკაციისათვის (მაგალითად, ნორმალურის და დაავადებულის) ან ქსოვილის კომპონენტების გამოსათვლელად (მაგალითად, სისხლის შემადგენლების კონცენტრაციები).

განვიხილოთ, თუ როგორაა შესაძლებელი სხვადასხვა სპექტროსკოპიული მეთოდით მივიღოთ რაოდენობრივი ინფორმაცია ქსოვილის ბიოქიმიური შედგენილობის, მორფოლოგიური და მოლეკულური სტრუქტურის და დაავადების განვითარების დროს არსებული შესაბამისი ცვლილებების შესახებ.

ფლუორესცენციული სპექტროსკოპია, ერთ-ერთი ყველაზე ფართოდ გამოყენებადი მეთოდია მედიცინასა და ზოგადად საბუნებისმეტყველო მეცნიერებაში [37]. იგი გამოიყენება როგორც ენდოგენური (საკუთარი) და ეგზოგენური (გარედან შეტანილი) ფლუოროფორების დეტექტირების ინსტრუმენტი. ეს უკანასკნელი ფოტოდინამიკური თერაპიით [38] მკურნალობისას დაავადებული არეების ლოკალიზაცია-მონიტორინგსა და ფოტოდესტრუქციული დოზების დადგენას ემსახურება. ეს საკითხი არ წარმოადგენს წინამდებარე ნაშრომის კვლევის საგანს და შესაბამისად ძირითად ყურადღებას ქსოვილის ენდოგენურ ფლუორესცენციას დაუთმობთ.

ამ მიმართულებით ეფექტურად მიმდინარეობს მთელი რიგი კვლევები. ამ კვლევებში გამოყენებულია სტაციონარული და დროში გარჩევის უნარიანი ფლუოროსცენტური სპექტროსკოპია, რომელიც თავს იმკვიდრებს როგორც დიაგნოსტიკის ერთ-ერთი მეთოდი, ანუ მოდალობა. შესაბამისი ტიპის ექსპერიმენტები ჩატარდა მრავალ განსხვავებულ ქსოვილში, მათ შორისაა კუჭ-ნაწლავის ტრაქტი [39-41], საშვილოსნოს ყელი [42-44], კანი [42-45], სისხლი [46], პირის ღრუ [46-48], ფილტვი [46-49].

უმრავლეს ეპითელურ ქსოვილებში არსებობს ენდოგენური ფლუოროფორები, რომელთა აღგზნება ხდება ტალღის სიგრძეთა 300-დან 600nm უბანში. ესენია: ტრიფტოფანი, კოლაგენი, ელასტინი, **NAD(P)H** (*in vivo*), **NADH** (*ex vivo*), **FAD** და პორფირინები. ცხრილი 1-ში მოყვანილია ბუნებრივი ფლუოროფორების შთანთქმისა და გამოსხივების მაქსიმუმები.

აღგზნების ტალღის სიგრძის შერჩევით, მხოლოდ ორი ან სამი მათგანი აღიგზნება ერთდროულად. ამ გარემოების მიუხედავად რაოდენობრივი ინფორმაციის მიღება თითოეული ფლუოროფორის წვლილის შესახებ არატრივიალურია. ყველაზე დიდ სიძნელეს წარმოადგენს ის, რომ გაზომილი ფლუორესცენცია შეიძლება ძლიერ იყოს მოდიფიცირებული ქსოვილის გაბნევით და შთანთქმით.

ცხრილი 1. ბუნებრივი (ენდოგენური) ფლუოროფორების შთანთქმისა და გამოსხივების მაქსიმალური მნიშვნელობები

Endogenous fluorophores	Excitation maxima (nm)	Emission maxima (nm)
<i>Amino acids</i>		
Tryptophan	280	350
Tyrosine	275	300
Phenylalanine	260	280
<i>Structural proteins</i>		
Collagen	325	400, 405
Elastin	290, 325	340, 400
<i>Enzymes and coenzymes</i>		
FAD, flavins	450	535
NADH	290, 351	440, 460
NADPH	336	464
<i>Vitamins</i>		
Vitamin A	327	510
Vitamin K	335	480
Vitamin D	390	480
<i>Vitamin B<sub>6</sub> compounds</i>		
Pyridoxine	332, 340	400
Pyridoxamine	335	400
Pyridoxal	330	385
Pyridoxic acid	315	425
Pyridoxal 5'-phosphate	330	400
Vitamin B <sub>12</sub>	275	305
<i>Lipids</i>		
Phospholipids	436	540, 560
Lipofuscin	340–395	540, 430–460
Ceroid	340–395	430–460, 540
Porphyryns	400–450	630, 690

FAD , ფლავინ ადენინ ნუკლეოტიდი; NADH, ადღგენილი ნიკოტინამიდ ადენინ დინუკლეოტიდი; NAD(P)H, ადღგენილი ნიკოტინამიდ ადენინ დინუკლეოტიდ ფოსფატი [12];

ხშირ შემთხვევებში გამოიყენება ემპირიული მეთოდები. მათი გამოყენებით, ფლუორესცენციის მახასიათებლებზე დაყრდნობით, შეიძლება განგასხვავოთ ქსოვილის სხვადასხვა მდგომარეობები და დაავიქსიროთ მათი ცვლილებების დინამიკა. ემპირიული მეთოდები ჩვეულებრივ ეყრდნობა ფლუორესცენციის ინტენსივობების მნიშვნელობებს ან მათ შეფარდებებს განსაზღვრულ ადგენებ-გამოსხივების ტალღის სიგრძეებზე ან გარკვეული ტალღის სიგრძეების უბანში [39]. ამ მიდგომას იყენებენ უმრავლეს კლინიკური დიაგნოსტიკების სისტემებში, რომლებიც იყენებენ ფლუორესცენტულ მეთოდს [49,50].

ეს მეთოდები ხშირად სასარგებლოა ისეთი სპექტრალური უბნების გამოსაგენად, სადაც დიაგნოსტიკის თვალსაზრისით სასარგებლო ფლუორესცენციული ცვლილებები ხდება და მათ შეუძლიათ უზრუნველყონ ცვლილებების არსში თვისობრივი გარკვევა. ამგვარად, როგორც ამას ამტკიცებენ ავტორები [60], დაავადებისას ქსოვილში მიმდინარე ბიოქიმიური ცვლილებების შესახებ რეალური ინფორმაციის მისაღებად აუცილებელია მოდიფიცირებული ფლუორესცენციიდან საკუთარი ფლუორესცენციის მიღება. ამისათვის იქმნება მრავალი მოდელი.

Richards-Kortum და სხვ. [51] ნაშრომში შემოთავაზებულ მოდელში გაზომილ ფლუორესცენციას გვთავაზობენ, როგორც ორი ფაქტორის ნამრავლს: 1) ფლუორესცენციის პროცესში მონაწილე ყველა ფლუოროფორის საკუთარი ფლუორესცენციების სპექტრების წრფივი კომბინაცია და 2) შესუსტების ფაქტორი, რომელიც წარმოადგენს ფართოხაზოვან შესუსტებას გამოწვეულს, გაბნევით და სისხლში ჰემოგლობინის შთანთქმით. ეს მოდელი გამოიყენება ადამიანის არტერიის ჯანმრთელი და დაავადებული *ex vivo* ქსოვილების საკუთარი ფლუორესცენციის შესასწავლად (476nm ადგენებისას). აქ შემოთხსენებული ორი ფაქტორის როლში გამოდიან სტრუქტურული ცილები (კოლაგენი და ელასტინი) და ცეროიდი (**CEROID**) ფლუორესცენციით და შემასუსტებელ ფაქტორებად გვევლინებიან ჰემოგლობინი და სტრუქტურული ცილები მრავალჯერადი გაბნევითა და შთანთქმით [51]. ამ კონკრეტულ შემთხვევაში ცეროიდისა და

სტრუქტურული ცილების ფლუორესცენციის წვლილების გამოყენებით დიაგნოსტიკების ალგორითმი იმდენად დაიხვეწა, რომ პათოლოგიურ ქსოვილს ნორმალურისგან ანსხვავებს 91% საიმედოობით და 85% სპეციფიკაციით.

იგივე მოდელი და აღზნების ტალღის სიგრძე (476nm) გამოიყენეს საშვილოსნოს ყელის ნორმალური და პათოლოგიური ქსოვილების ფლუორესცენციის სპექტრების, *in vivo* კოლპოსკოპური გამოკვლევებისას [52]. ამ შემთხვევაში მიღებული ფლუორესცენცია აღიწერება კოლაგენის, ელასტინის, **NAD(P)H** და **FAD** საკუთარი ფლუორესცენციით და მოდიფიცირდება ჰემოგლობინის შთანთქმით. მას შემდეგ, რაც მრავალი პაციენტის ქსოვილების კოლაგენის ფლუორესცენციის სპექტრი გაასაშუალოეს და დაანორმირეს, აღმოაჩინეს, რომ კიბოსწინა სტადიის ქსოვილებში ნორმალურ ქსოვილებთან შედარებით კოლაგენის ფლუორესცენცია მცირდებოდა.

აღმოჩნდა, რომ ფლუორესცენციასთან ერთად გაზომილ დიფუზური გაბნევის სპექტრს შეუძლია მოაშოროს შთანთქმით და გაბნევით გამოწვეული ქსოვილის ფლუორესცენციული სპექტრის მოდიფიკაციები და ამგვარად გამოყოფს საკუთარი ფლუორესცენცია. ეს ხერხი შემუშავებული იყო ადრეულ ფლუორესცენციულ კვლევებში, როდესაც მეტაბოლურად აქტიურ ქსოვილებში, როგორებიცაა ტვინი, გული და ღვიძლი, აწარმოებდნენ **NAD(P)H**-ის კონტროლის სამუშაოებს. ამ მიდგომის ძირითადი არსი იმაში მდგომარეობს, რომ ფლუორესცენტული და მრავალჯერადად გაბნეული ფოტონები, დიფუზური გაბნევის და შთანთქმის მხრივ განიცდიან ერთნაირ ზეგავლენას [53].

სამწუხაროდ ეს მოდელები გამოსადეგია მხოლოდ გარკვეული ტალღის სიგრძის რეჟიმისათვის, რომლებზეც ისინი გამოიცადნენ და არ არიან საკმარისი იმისთვის, რომ ადაღინონ საკუთარი ფლუორესცენციის სპექტრის ხაზის მთლიანი ფორმა და ინტენსივობა. ამის მისაღწევად საჭიროა უფრო მკაცრი ფორმით გავეთვალისწინოთ ქსოვილის ოპტიკური თვისებების დამოკიდებულება ტალღის სიგრძეზე.

საკუთარი ფლუორესცენციის გამოყოფის მიზნით, მონტე-კარლოს მეთოდით მოდელირების გამოყენებით შეიქმნა ფოტონის მიგრაციაზე

დაფუძნებული ანალიტიკური მოდელი [54,55]. ფაქტიურად მისი საშუალებით მიიღება მოდიფიკაციის ფუნქცია  $M(\lambda)$ . ამ ანალიტიკურად მიღებული გამოსახულებიდან მიიღეს საკუთარი ფლუორესცენციის გამოსახულება. Durkin და სხვ. [56] ნაშრომში საკუთარი ფლუორესცენციის სპექტრის მისაღებად გამოიყენეს კუბელკა-მუნკის შთანთქმის და გაბნევის კოეფიციენტები, რომლებიც დიფუზური გაბნევის და გამტარებლობის ექსპერიმენტებიდან მიიღეს. ასეთი მოდელი ძალიან გამოსადეგია *ex vivo* კვლევებისთვის, თუმცა პარამეტრების მიღების სირთულე ამ მიახლოებას *in vivo* გაზომვებისთვის არაპრაქტიკულს ხდის.

კვლევების უმრავლესობა [54,55,57,58,59] ჩატარებულია ტალღის სიგრძეთა იმ სპექტრალურ დიაპაზონში, რომელშიც წყალი და ჰემოგლობინი სუსტად შთანთქავენ, თუმცა ქსოვილის მნიშვნელოვანი ლუმინოფორები, როგორებიცაა კოლაგენი და **NAD(P)H** გამოსხივების 400nm არეში ძლიერად ფლუორესცირებენ [37,38]. ჰემოგლობინის შთანთქმაც აგრეთვე ამ სპექტრალურ უბანშია პიკით 420nm-ის მახლობლობაში. ეს შთანთქმა ფლუორესცენციის სპექტრში ქმნის უღელს და გაზომილი ფლუორესცენციის სპექტრი აღარ იქნება შემადგენელი ენდოგენური ფლუოროფორების (კოლაგენი, **NAD(P)H**, ელასტინი და სხვა) ფლუორესცენციების სპექტრების ჯამი. რიგ მკვლევართა მოსაზრებით, ამგვარი ზეგავლენა იწვევს არა მარტო ფლუორესცენციის გზით მოწოდებული ბიოქიმიური პროცესების არასწორ გაგებას, არამედ იგი ასევე ნიღბავს იმ მცირე ბიოქიმიურ ცვლილებებს, რომლებსაც ადგილი აქვს დაავადებულ ქსოვილებში [51].

ფოტონის მიგრაციაზე დაფუძნებულმა მოდელმა განიცადა შემდგომი ტრანსფორმაცია იმისთვის, რომ გაეზარდათ მოდელის შესაძლებლობები [19]. ამ მოდელის უნარი აღადგინოს საკუთარი ფლუორესცენციის ხაზის ფორმა და ინტენსივობა დამტკიცდა ქსოვილის ფანტომების გამოყენებით, რომლებსაც აქვთ ქსოვილის შესატყვისი გაბნევისა და შთანთქმის მახასიათებლები [60]. ეს მოდელი გამოყენებულ იქნა კლინიკაში ისეთი ტიპის ქსოვილების საკუთარი ფლუორესცენციის მისაღებად, როგორებიცაა საყლაპავი [61], საშვილოსნოს ყელი [44] და პირის ღრუ [48].

ქსოვილის ოპტიკური თვისებების სრულად დახასიათება შეუძლებელია დიფუზური გაბნევის სპექტროსკოპიის გამოყენების გარეშე.

დიფუზური გაბნევის სპექტრი მიიღება ქსოვილის ზედაპირის იმ დასხივებული ფოტონებით, რომლებიც ქსოვილის შიგნით მრავალჯერ გაიბნევიან და დაცემის საწინააღმდეგო მიმართულებით გამოდიან ქსოვილიდან. ქსოვილიდან დიფუზურად გაბნეული სინათლის სპექტრალური თვისებები დამოკიდებულია ქსოვილის გამბნევე და მშთანთქმელ თვისებებზე. დიფუზური გაბნევის სპექტროსკოპია შეისწავლის ამ ოპტიკური თვისებების ცვლილებებს, რომლებიც დაკავშირებული არიან დაავადებებთან ან თერაპიასთან. არეკვლადობის გაზომვები შეიძლება ჩატარდეს სინათლის ძალიან მოკლე იმპულსებით (დროითი სელექცია), მოდულირებული ინტენსივობის წყაროთი (სიხშირული სელექცია) ან მონოქრომატული წყაროებით.

მრავალი კლინიკური გამოკვლევა ჩატარებული ისეთ ქსოვილებზე, როგორებიცაა ნაწლავი [36,62], შარდის ბუშტი [32], სარძევე ჯირკვალი [35], საკვერცხე [63] და კანი [34,64-67] აჩვენებს, რომ დიფუზური გაბნევის სპექტრები შეიცავენ დიაგნოსტიკისათვის სასარგებლო ინფორმაციას. როგორც წესი არეკვლადობის გასაზომად მძლავრი ნათურების თეთრი სინათლე ოპტიკური ბოჭკოების საშუალებით მიყავთ ქსოვილამდე და მათვე იყენებენ დიფუზური არეკვლის სინათლის შესაკრებად. სხვადასხვა მდგომარეობაში მყოფი ბიოლოგიური ქსოვილების დიფუზური გაბნევის სპექტრებით აღწერის მიზნით შემუშავებულ იქნა რამოდენიმე ალგორითმი, რომლებიც ეფუძნებიან ემპირიულ მიდგომებს.

მედცინაში, კერძოდ დიაგნოსტიკაში, მესამე ოპტიკური ტექნოლოგია სინათლის გაბნევის სპექტროსკოპიაა (**LSS**). მისი საშუალებით შესაძლებელია სხეულის ეპითელური შრის სუბუჯრედული ორგანოების ვიზუალიზაცია და მორფოლოგიის დახასიათება [16,17]. **LSS** სპექტროსკოპია დაფუძნებულია იმ ფაქტზე, რომ გაბნეული სინათლის სპექტრალური და კუთხური განაწილება დამოკიდებულია გამბნევი ნაწილაკის ზომაზე, ფორმაზე და მის შინაგან სტრუქტურაზე. ამგვარად, ქსოვილიდან ერთჯერადი



უკუგაბნევის აქტით დაბრუნებული და დაფიქსირებული სინათლის ანალიზით შესაძლებელია მივიღოთ რაოდენობრივი და მორფოლოგიური ინფორმაცია გამბნევი ნაწილაკის შესახებ. უკუგაბნეული სინათლის გაზომვით შესაძლებელია დაადგინო გამბნევი ნაწილაკების ზომების ცვლილება. მაგალითად, გაბნევა უკუმიმართულებით შეიცავს დეტალურ ინფორმაციას ბირთვების შესახებ [16,17,44,61,68]. ბირთვების მორფოლოგიის ისეთი ცვლილებები, როგორებიცაა: ზომების გაზრდა, პლემორფიზმი (ზომებისა და ფორმის ცვლილება), შემჭიდროვება (ერთეულ მოცულობაში ბირთვების რაოდენობის გაზრდა) და ჰიპერქრომატიზმი (ქრომატინის შემცველობის ან ბირთვის ნივთიერების გაზრდა) იძლევიან მნიშვნელოვან ინფორმაციას. ამ ჰისტომორფოლოგიურ ნიშანთვისებებს დიდი მნიშვნელობა აქვთ კიბოს წინა სტადიისა და კიბოს დიაგნოსტიკისათვის. ამგვარად, ამ მეთოდს დიდი პერსპექტივა აქვს, როგორც ქსოვილის მნიშვნელოვანი მორფოლოგიური მახასიათებლების აღმწერს და შესაბამისად დაავადებების გამომვლენ ინსტრუმენტს.

ჩვეულებრივ, სინათლის გაბნევის გაზომვები ჭავალურ ციტომეტრიაში გამოიყენება უჯრედის ზომების დასადგენად [69]. მრავლადაა კვლევები, რომლებშიც შეისწავლიან გაბნეული სინათლის გონიომეტრიულ განაწილებას ანუ სინათლის გაბნევის დამოკიდებულებას გაბნევის კუთხეზე. ეს კვლევები [12,70,71,72] ძირითადად შესრულებულია 2–170<sup>0</sup> დიაპაზონში, უჯრედების და სუბუჯრედული ორგანელების სუსპენზიებისათვის, მათი გაბნევის თვისებების დასახასიათებლად. ბიოლოგიურ ქსოვილში ერთჯერადად უკუგაბნეული სინათლე რთული გამოსაყოფია დიფუზური არეკვლის სიგნალიდან, რადგან დაცემული სინათლის მხოლოდ ძალიან მცირე ნაწილი, ბრუნდება უკუგაბნევის ერთი აქტის შემდგომ [73]. დანარჩენი სინათლე აღწევს ქსოვილში და ქსოვილის სხვადასხვა შემადგენელი კომპონენტისგან განიცდის მრავალჯერად გაბნევას. როგორც შედეგი, შესული სინათლე ნაწილდება შემთხვევით მიმართულებებზე და წარმოქმნის დიფუზურად გაბნეული სინათლის დიდ ფონს (ეს არის, ზემოთ განხილული, დიფუზური გაბნევის კომპონენტი - **DRS**). ამ დიფუზური გაბნევის კომპონენტზე მნიშვნელოვნად ზემოქმედებს

ჰემოგლობინის შთანთქმა და უჯრედებზე გაბნევა, ისევე როგორც არაბირთვული სტრუქტურები, როგორცაა კოლაგენი. როგორც უკვე აღინიშნა მთლიანი ქსოვილის ოპტიკური თვისებების შესახებ მნიშვნელოვანი ინფორმაციის მიღება შეიძლება დიფუზური გაბნევის სპექტრის ანალიზის საფუძველზე. ერთჯერადი უკუგაბნეული სინათლის შესასწავლად საჭიროა მთლიან არეკვლილ სინათლეს მოვაცილოთ დიფუზური გაბნევის კომპონენტი.

გამბნევეების თვისებების მისაღებად საჭიროა ერთჯერადი უკუგაბნეული კომპონენტის სპექტრის ანალიზი [70,74,75]. გაბნევის სიგნალის სიდიდე დამოკიდებულია შემკრები სისტემის გეომეტრიაზე. მაგალითად, ტალღის სიგრძესთან შედარებით დიდი ზომის ნაწილაკებისათვის უკუგაბნევა ბევრად უფრო სუსტია ვიდრე წინ გაბნევა [76]. უჯრედები და ბირთვები სწორედ ასეთი ტიპის გამბნევეებს წარმოადგენენ. სინათლის გაბნევის ექსპერიმენტებმა ჩატარებულმა HeLa უჯრედების, ჩინური ზაზუნას ოციციტების (არაზრდასრული კვერცხუჯრედი) და სისხლის თეთრი უჯრედების სუსპენზიებზე აჩვენა, რომ გაბნევის გაზომილი დიაგრამა კარგად აღიწერება მი-ს თეორიით, კერძოდ გაბნევით მკვირვ სფეროებზე, რომლებიც მოთავსებული არიან ნაკლებად მკვირვ სფეროებში [77]. მაგრამ, ვინაიდან ქსოვილში უჯრედები ერთმანეთთან მჭიდროდ არიან განლაგებული, ამიტომ მეზობელი უჯრედების შემზარანებს შორის არსებობს გარდატეხის მაჩვენებელთა თანხვედრა, რის გამოც ბირთვები ხდებიან ყველაზე დიდი ზომის გამბნევეები.

ამას გარდა, მსხვილი ნაწილაკებიდან უკუგაბნეული სინათლის ინტენსივობა ოსცილირებს, როგორც ტალღური რიცხვის ფუნქცია (ვან-დერ-ჰალსტის მიახლოება) [76,78]. ნაწილაკები, რომლებიც ტალღის სიგრძესთან შედარებით მცირე ზომის არიან, როგორცაა ენდოპლაზმური ბადის მილაკები, სინათლეს ყველა მიმართულებით, თითქმის იზოტროპულად გააბნევენ. ამგვარად, გამბნევეების ზომების განაწილება და გარდატეხის მაჩვენებელი შესაძლებელია განისაზღვროს ამ ნაწილაკებიდან უკუგაბნეული სინათლის სპექტრის შესწავლით. თუ, ცნობილია ნაწილაკთა ზომების განაწილება და გარდატეხის მაჩვენებელი მაშინ შესაძლებელია მივიღოთ ეპითელური

უჯრედების მორფოლოგიური ცვლილებების რაოდენობრივი მახვენებლები და ასევე შესაძლებელია შესაბამისი დიაგნოსტიკური ალგორითმის შემუშავება. რამოდენიმე განსხვავებული ორგანოს ქსოვილზე ჩატარდა წინასწარი, *in vivo*, კვლევები. სამუშაოების მიზანი მდგომარეობდა იმაში, რომ შეფასებულიყო ამ მეთოდის შესაძლებლობები, როგორც კიბოსწინა და კიბოს სტადიებზე მომხდარი ცვლილებების აღმოჩენი ინსტრუმენტისა. ეს კვლევები ჩატარდა ხუთ განსხვავებულ ორგანოზე სამი განსხვავებული ტიპის ეპითელიუმით: მსხვილი ნაწლავის ცილინდრულ ეპითელიუმზე, ბარეტის საყლაპავზე [17,61,68], შარდის ბუშტის გარდამავალ ეპითელიუმზე [17], პირის ღრუს სკვამოზურ ეპითელიუმზე [60,63] და საშვილოსნოს ყელის ეპითელიუმზე [44].

ამგვარად, ზემოთ განხილული შრომების ანალიზი შემდეგი დასკვნების გაკეთების საშუალებას იძლევა:

1) სპექტროსკოპიას შეუძლია მოგვცეს ბიოქიმიური და მორფოლოგიური ინფორმაცია ქსოვილის მდგომარეობის შესახებ, როგორც მისი ამოკვეთის ასევე ამოკვეთის გარეშე.

2) **LSS** მეთოდით მიღებული უჯრედის ბირთვის მორფოლოგიის მახასიათებლები ემთხვევა ამოკვეთილი ქსოვილის მორფოლოგიაზე ჰისტოპათოლოგიური გამოკვლევით მიღებულ შედეგებს.

3) სპექტროსკოპიული მეთოდი, როგორცაა საკუთარი ფლუორესცენციის სპექტროსკოპია, იძლევა ინფორმაციას ქსოვილის ბიოქიმიაზე, რისი *in vivo* რეჟიმში, უშუალოდ სხვა გზით მიღება შეუძლებელია. მიუხედავად იმისა, რომ ქსოვილის ამოკვეთა და შემდგომი დამუშავება გარკვეულწილად შეცვლის მის ბიოქიმიურ მდგომარეობას, *in vivo* მდგომარეობასთან შედარებით, მაინც ადვილია მისი შედარება ციტო და ჰისტომორფოლოგიურ შედეგებთან და შესაბამისი დიაგნოსტიკის ალგორითმის შემუშავება.

4) ისეთი მეთოდი, როგორცაა **LSS** კუთხური დამოკიდებულებით, ძალიან მგრძობიარეა მორფოლოგიური სტრუქტურის და მისი ცვლილებების მიმართ, რომლებიც შეუძლებელია ინახოს ტრადიციული, ინვაზიური მიკროსკოპული გამოკვლევებითაც კი.

5) შესაძლებელია ანალიტიკური მოდელების გამოყენება ქსოვილის გაზომილი სპექტრის აღსაწერად და რაოდენობრივი ინფორმაციის მისაღებად.

ყოველივე ამის გათვალისწინებით, ნათელია, რომ სპექტროსკოპია ძლიერი ინსტრუმენტია იმ ზოგიერთი ფუნდამენტალური პროცესის უკეთ გაგებისათვის, რომლებიც მიმდინარეობს დაავადების განვითარების, როგორც ძალიან ადრეულ ასევე შემდგომ სტადიებზე. ამ სპექტროსკოპიული მეთოდებით მიღებულ ინფორმაციათა შეჯერება საშუალებას იძლევა მივიღოთ უფრო დეტალური სურათი ქსოვილის მდგომარეობის შესახებ, რაც თავის მხრივ უფრო ზუსტი დიაგნოზის გარანტიას. ქსოვილის პატარა და დიდი არეების გამოკვლევის შეუზღუდავი შესაძლებლობა კიდევ უფრო ზრდის ამ მეთოდების კლინიკებში გამოყენების ფასეულობას. ბიოლოგიური ქსოვილების სპექტროსკოპიის მიმართულებით უკვე არსებულ კვლევებზე დაყრდნობით, თავისუფლად შეიძლება ითქვას, რომ სპექტროსკოპია ძალიან მალე გახდება მნიშვნელოვანი დამატებითი, დამხმარე საშუალება დაავადებების განვითარების კლინიკური და ჰისტომორფოლოგიური შეფასების საქმეში.

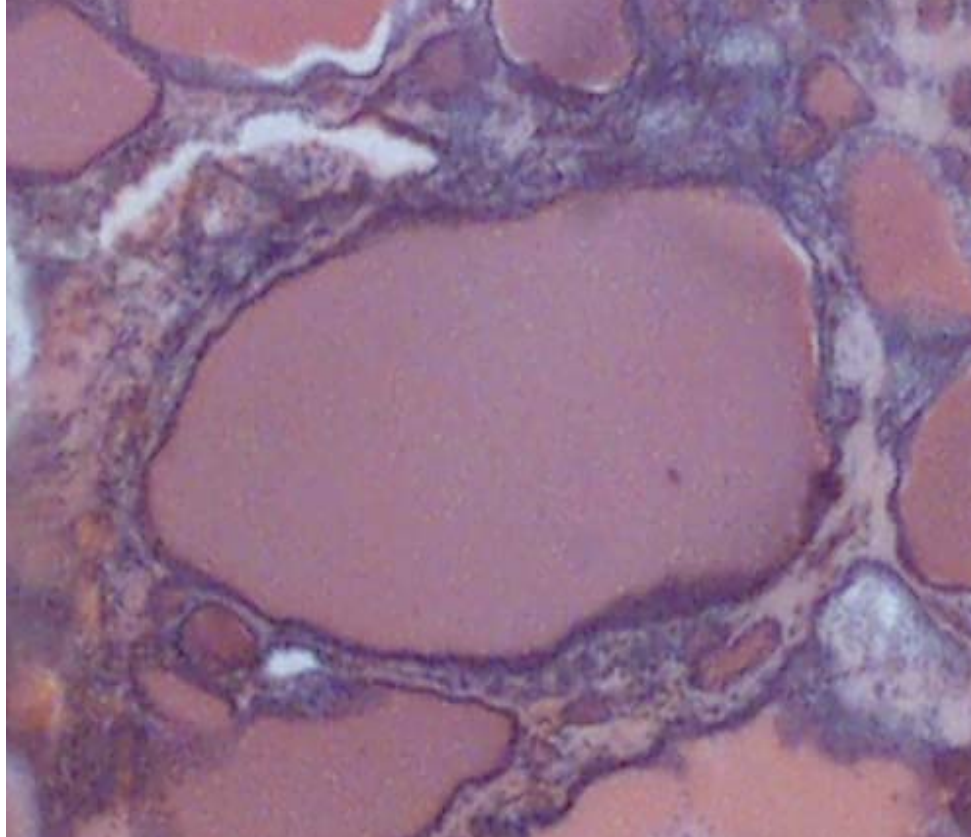
## 2. შედეგები და მათი განსჯა

### 2.1. ბიოლოგიური ქსოვილის ნიმუშები. ექსპერიმენტული დანადგარი და კვლევის მეთოდები

#### 2.1.1. ბიოლოგიური ქსოვილის ნიმუშები

მომზადებული და კვლევებში გამოყენებული ბიოლოგიური ქსოვილის ნიმუშები ძირითადად ლაზერის გამოსხივებით ინდუცირებული ბუნებრივი ფლუორესცენციის დამზერისათვის იყო გამოიზნული. ძირითადად ეს იყო ფარისებრი ჯირკვლის ამონაკეთი ქსოვილები. როგორც წესი, ისინი წარმოადგენდნენ 0.5 – 1.0 cm<sup>2</sup> ზედაპირის ფართობისა და 1 - 3 mm სისქის მქონე მთლიანი ქსოვილის ნაჭრებს. თითოეული ასეთი ნიმუში თავსდებოდა სპექტროსკოპიული კვარცის მინის კიუვეტაში. ეს კიუვეტა მოწმდებოდა შთანთქმაზე სპექტრის ულტრაიისფერ 250 - 380 nm (UV-C ნაწილობრივ, UV-B, UV-A) და ხილულ 380-750 nm (Vis) დიაპაზონებში. კიუვეტა ასევე მოწმდებოდა საკუთარ ფლუორესცენციაზე ულტრაიისფერი გამოსხივების მქონე ლაზერით დასხივებისას (266 nm, 337 nm, 354 nm).

მდგომარეობის თვალსაზრისით საკვლევი ნიმუშები ორ ძირითად ჯგუფად შეიძლება დავეყოთ: 1. ჯანმრთელი ქსოვილი, 2. პათოლოგიური ქსოვილი. პათოლოგიური ქსოვილი თავის მხრივ მრავალფეროვანია, თუმცა ეს ჯგუფი ორ ძირითად ქვეჯგუფად შეგვიძლია დავეყოთ: 2.1. სიმსივნეები, 2.2. სხვა პათოლოგიები. ქსოვილის მდგომარეობა, ლაზერული გამოკვლევის პარალელურად, ტრადიციული (conventional) მეთოდით – ჰისტომორფოლოგიის გამოყენებით ხორციელდებოდა.



ნახ. 1. ფარისებრი ჯირკვლის მიკროსტრუქტურა გამოსახულება მიღებულია ციფრული მიკროსკოპით  $\times 200$  გადიდებით.

ვინაიდან ფიზიკური კვლევებისათვის ბიოლოგიური ქსოვილი კვლავ რჩება "უცხო" ობიექტად, ამიტომ მოკლედ შევეხეთ ნიმუშების, კერძოდ კი ფარისებრი ჯირკვლის აგებულებას. ფარისებრი ჯირკვალის რთული არქიტექტურის ქსოვილია (ნახ. 1). ფარისებრი ჯირკვლის მიკროსტრუქტურა წარმოდგენილია დასშული ბუშტუკებით - ფოლიკულებით, რომლებიც მისი მოფუნქციონირე ელემენტებია. ფარისებრი ჯირკვლის ფოლიკულები  $40-150\mu\text{m}$  დიამეტრის, უმეტესად მომრგვალო ფორმის ღრუა, რომელიც იოლით მდიდარი კოლოიდური მასით არის ამოვსებული. ფოლიკულის კედელი ამოფენილია ჯირკვლოვანი ერთშრიანი ეპითელიუმით, რომლის უჯრედები (თიროციტები) ჯირკვლის ფუნქციური აქტივობისას (რაც გამოიხატება ფოლიკულიდან კოლოიდის გაძლიერებული გამოტანით) ცილინდრულ ფორმას ღებულობს, მოსვენებისას კი ბრტყელია. ფოლიკულებს შორის

თავისუფალ სივრცეს იკავებს ფაშარი, შემაერთებული ქსოვილი, რომელშიც გადის მრავლობითი სისხლისა და ლიმფური კაპილარები [79].

ქირურგიული ოპერაციის შედეგად ამოკვეთილი, ადამიანის ფარისებრი ჯირკვლის, ქსოვილებიდან იჭრებოდა რამოდენიმე მილიმეტრის სისქის მყარი ნაჭრები. ყოველი ნიმუში იყოფოდა სამ ნაწილად, რომელთაგან ერთი იგზავნებოდა ჰისტომორფოლოგიურ გამოკვლევაზე, მეორე ბიოქიმიურ ლაბორატორიაში, ხოლო მესამე ოპტიკურ ლაბორატორიაში ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრების შესასწავლად. უნდა აღინიშნოს, რომ უმრავლეს შემთხვევაში, პათოლოგიურ ქსოვილთან ერთად, ანალოგიური ფორმით, ასევე მზადდებოდა “ნორმალური” ანუ პათოლოგიური არის მიმდებარე ქსოვილების ნიმუშებიც.

მიკროსკოპით გამოკვლევის მიზნით, ჰისტომორფოლოგიურ ლაბორატორიაში საკვლევი ნიმუში გადის დამუშავების რამოდენიმე ეტაპს, ისეთებს როგორებიცაა: ფიქსაცია, გაუწყლოვება, პარაფინირება, ანათლების გაკეთება, შეღებვა და სასაგნე მინაზე დამაგრება. დეტალური გამოკვლევებისთვის მასალა მუშავდება მთელი რიგი საღებავებით, რათა გამოვლინდეს და იდენტიფიცირდეს ქსოვილის სხვადასხვა სტრუქტურები.

ბიოქიმიურ ლაბორატორიაში ქსოვილის ნიმუშები იგზავნებოდა ჰომოგენატისა და შესაბამისი უჯრედული ფრაქციების მისაღებად, მათი შემდგომი, ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრების, გამოკვლევის მიზნით.

ქსოვილის ჰომოგენიზაცია ხორციელდება ჰომოგენიზატორის საშუალებით, რომელშიც თავსდება ქსოვილის ნიმუში და ემატება სამჯერადი მოცულობის 0,32M საქაროზას ხსნარი (0,32M საქაროზას ხსნ. + 20mM Tris HCl pH7,5 + 3mM MgCl<sub>2</sub> – ორგ.ნაერთი). ასეთი მეთოდით მიღებული ჰომოგენატი უკვე მზადაა LIF სპექტროსკოპიისთვის.

ქსოვილის უჯრედული ფრაქციების მისაღებად საჭიროა ჰომოგენატის შემდგომი მრავალჯერადი დამუშავება. კერძოდ, 10 წუთის განმავლობაში 1000g ბრუნით მას ათავსებენ ცენტრიფუგაში და იღებენ

სუპერნატანტს (გამოლექვის შედეგად ნალექზე ზემოდან დარჩენილი სითხე). ამის შემდეგ სუპერნატანტიდან უნდა გამოიყოს მემბრანები და ციტოპლაზმა. ამ მიზნით მას კვლავ 20 წუთის განმავლობაში 17000g ბრუნით, აცენტრიფუგირებენ. მიღებული სუპერნატანტი ციტოპლაზმას წარმოადგენს, ხოლო ნალექი – მემბრანებს.

ბირთვების გამოყოფის პროცესი მრავალსაფეხურიანია. ამისათვის პირველადი ცენტრიფუგირების შემდეგ დარჩენილ ნალექს ხსნიან 1,2M საქაროზას ხსნარში (1,2M საქაროზას ხსნ. + 20mM Tris HCl pH7,5 + 1mM MgCl<sub>2</sub>). ეს ნაერთი ჯერ სუსპენზირდება და შემდეგ ცენტრიფუგირდება 80 წუთის განმავლობაში, 15000g ბრუნით. მიღებული სუპერნატანტი აღარ გამოიყენება, ხოლო ნალექი სუსპენზირდება 0,25M საქაროზას ხსნარში (0,25M საქაროზას ხსნ. + 20mM Tris HCl pH7,5 + 5mM MgCl<sub>2</sub>), რის შემდეგაც ეს სუსპენზია კიდევ ერთხელ ცენტრიფუგირდება 20 წუთის განმავლობაში, 4000g ბრუნით. მიღებული სეპარირებული ნაერთიდან ჩვენთვის საინტერესოა ნალექი, სადაც გროვდება უჯრედების ბირთვები.

ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრების ანალიზისათვის, ოპტიკურ ლაბორატორიაში მოტანილი ქსოვილის და მისგან მიღებული ჰომოგენატისა და უჯრედული ფრაქციების, ნიმუშები თავსდებოდა კვარცის კიუვეტებში.

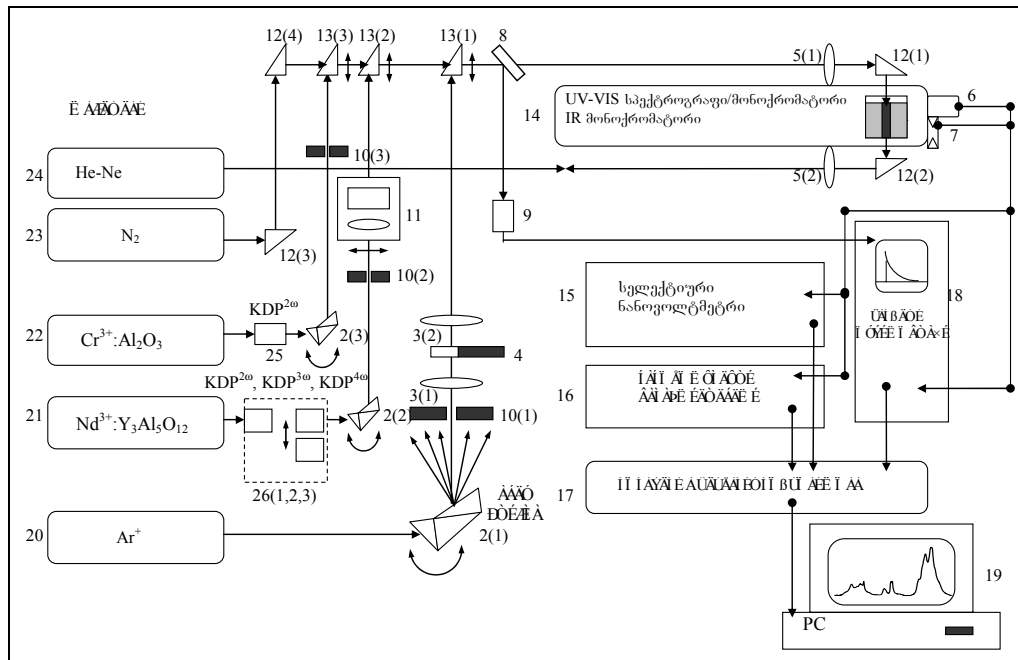
### ***2.1.2. ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის კვლევის ექსპერიმენტული დანადგარი***

ფლუორესცენციური ანალიზის ექსპერიმენტული დანადგარის ძირითადი სქემა მოცემულია ნახ.2.-ზე. დანადგარი აწყობილია ორ ოპტიკურ მაგიდაზე. მისი მთავარი შემადგენელი ნაწილებია:

1. სინათლის წყაროები (ლაზერები და ლაზერული სხივების ჯერადების მისაღები ოპტიკის ელემენტები).
2. ფლუორესცენციური გამოსხივების სპექტრალურად გაშლის საშუალებები (სპექტროგრაფი, მონოქრომატორი).
3. სხივთა სფლის ოპტიკური ელემენტები.
4. ოპტიკური გამოსხივების მიმღები და ელექტრული სიგნალების



რეგისტრაციის მოწყობილობები (როგორც სტაციონარული, ასევე იმპულსურ და იმპულსურ-პერიოდული რეჟიმებისათვის)



ნახ. 2. ფლუორესცენციური ანალიზის ექსპერიმენტალური დანადგარი

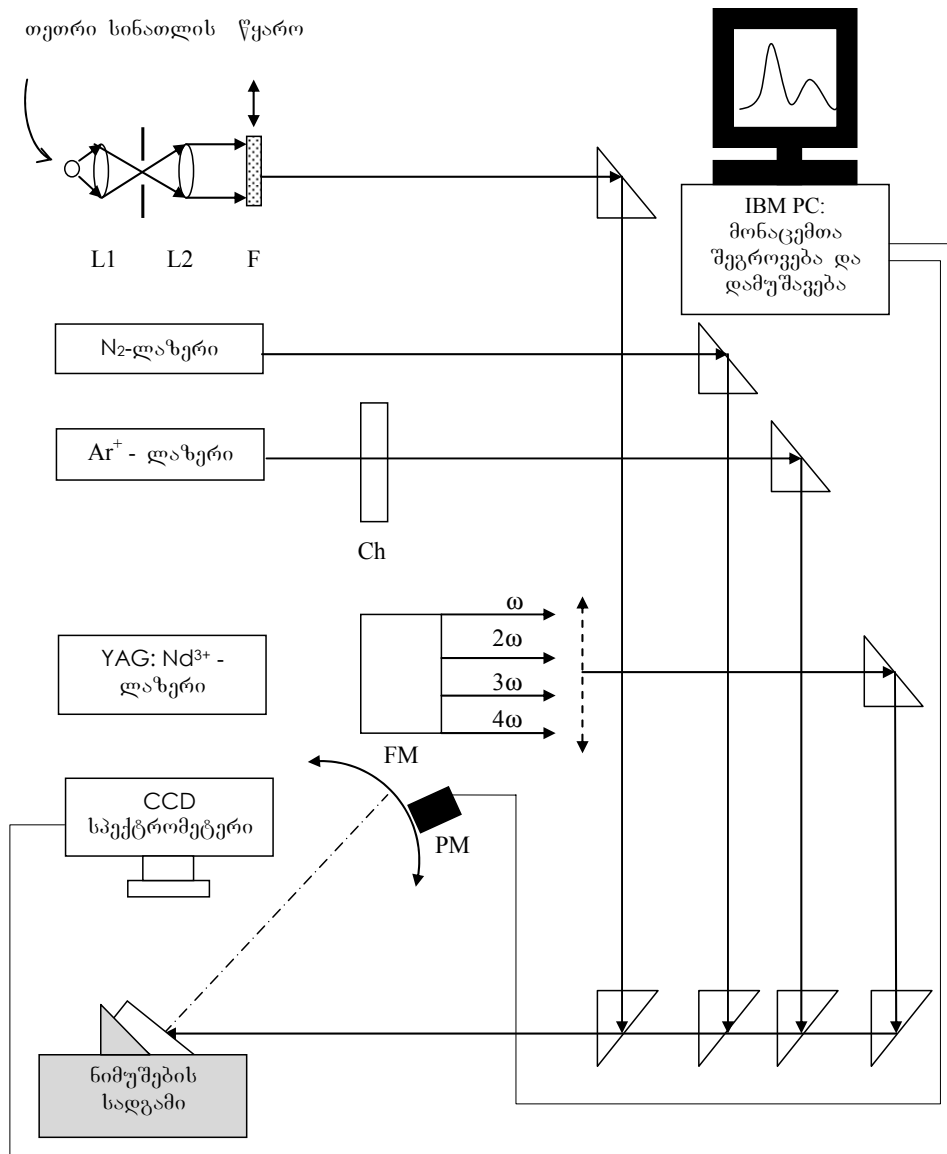
ნახატის წარწერები:

- |                |  |
|----------------|--|
| 1              | ნიმუში                                   |
| 2(1),2(2),2(3) | აბეს პრიზმა                              |
| 3(1),3(2)      | შემკრები ლინზები საერთო ფოკუსით          |
| 4              | მწვეტარა                                 |
| 5(1),5(2)      | შემკრები ლინზები საერთო ფოკუსით          |
| 6              | ფოტოგამამრავლებელი                       |
| 7              | PbS-ის ფოტორეზისტორი                     |
| 8              | გამყოფი ფირფიტა                          |
| 9              | ოსცილოგრაფის გამშვები ფოტოგამამრავლებელი |
| 10(1),10(2)    | ხვრელი                                   |
| 11             | ორგანული საღებარების ლაზერული ბლოკი      |

- 12(1,2,3,4),13(1,2,3) მახრუნებელი პრიზმები
- 14 მონოქრომატორი, სპექტროგრაფი (ИКМ-1, ДФС-452)
- 15 სელექტიური ნანოვოლტმეტრი (UNIPAN-233)
- 16 მუდმივი ძაბვის ციფრული ნანოვოლტმეტრი (B2-34)
- 17 კომპიუტერში მონაცემთა შემყვანი მოწყობილობა
- 18 ჩამწერი ოსცილოგრაფი (C8-14)
- 19 პერსონალური კომპიუტერი
- 20 Ar<sup>+</sup>-ის ლაზერი ЛГН-106М
- 21 Nd<sup>3+</sup>:Y<sub>3</sub>Al<sub>5</sub>O<sub>12</sub>-ის ლაზერი (ლაბორატორიაში აგებული)
- 22 Cr<sup>3+</sup>:Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-ის ლაზერი ОГМ-20
- 23 N<sub>2</sub>-ის ლაზერი ЛГИ-21
- 24 He-Ne-ის ლაზერი ЛГ-38
- 25 კალიუმის დიგიდროფოსფატის არაწრფივი
- 26 კრისტალი  $\theta_c=50.6^\circ$
- 26(1,2,3) კალიუმის დიგიდროფოსფატის არაწრფივი  
კრისტალები: 1. ( $\theta_c = 41.2^\circ$ ), 2. ( $\theta_c = 60^\circ$ ), 3. ( $\theta_c = 76.8^\circ$ )

სამუშაოების საწყის ეტაპზე სპექტროსკოპიული კვლევები ტარდებოდა დანადგარზე რომელიც დღეისათვის სრულიად მოდიფიცირებულია და წარმოდგენილია ნახ. 3-ზე. ის ოთხი ძირითადი ბლოკისაგან შედგება: სინათლის წყაროების ბლოკი, ნიმუშის განთავსების ბლოკი, რეგისტრაციის ბლოკი და მონაცემთა შეგროვებისა და დამუშავების ბლოკი.

კვლევის მოცემულ ეტაპზე, ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის მისაღებად ძირითადად გამოიყენებოდა აზოტის (N<sub>2</sub>) ლაზერი. მისი პარამეტრებია: ტალღის სიგრძე  $\lambda=337\text{nm}$  (ნანომეტრი); გამოსხივების იმპულსების სიხშირე 100Hz (ჰერცი); ერთი იმპულსის ხანგრძლივობა 10nsec (ნანოწამი); ენერგია ერთ იმპულსში 0.04mj (მილიჯოული). ლაზერის სხივი ფოკუსირდებოდა ნიმუშის ზედაპირზე 100 $\mu\text{m}$  (მიკრომეტრი) დიამეტრის მქონე ლაქის სახით.



ნახ. 3. ექსპერიმენტული დანადგარი. L1, L2 – ლინზები; F – ოპტიკური ფილტრი; Ch – მწვევტარა; FM – სისშირის გამამრავლებელი არაწრფივი კრისტალები; PM – ფოტოელექტრონული გამამრავლებელი. სხვადასხვა სახის ნიმუშები მაგრდება მოძრავ სადგამზე.

ქსოვილის ზედაპირის სკანირებისათვის, ლაზერის სხივის ნაცვლად, სიბრტყეში მოძრაობს ნიმუშების სამაგრი, რომელიც სპეციალურად აღჭურვილია მიკრომეტრული ხრახნებით.

ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის ფოტონების ნაკადის ის ნაწილი, რომელიც პირველი შემკრები ლინზით ფორმირდებოდა, შემდგომში ლინზების სისტემით ფოკუსირდებოდა სპექტრომეტრის შემავალ ხვრელზე. სპექტრომეტრი გამოიყენება ფირმა

“Spectra Physics”-ის Oriel LineSpec CCD სპექტრომეტრი, MS125<sup>TM</sup> სპექტროგრაფითა და მონაცემთა შეკრების, მართვისა და დამუშავების პროგრამული პაკეტებით. ფლუორესცენციის სპექტრების ჩაწერა ხდებოდა 300-500nm სპექტრალურ უბანში, დაიმზირებოდა IBM PC ტიპის კომპიუტერის მონიტორზე და ინახებოდა ASCII ფაილების სახით. თითოეული ექსპერიმენტი მოიცავდა 2000-მდე გაზომვას ყოველი ნიმუშის ყოველ წერტილში.

სპექტრების შემდგომი დაციფრული დამუშავება და სხვა სპექტრებთან შედარება ხორციელდებოდა “Origin Software” პროგრამული პაკეტით.

CCD-სპექტრომეტრის შესაბამის სამუშაო რეჟიმში გაყვანით (ინტეგრაციის დროისა და ელექტრონული სკანირებების რაოდენობის შერჩევისა და ა.შ.) კომპიუტერის მონიტორის ეკრანზე განხორციელდა ქსოვილების ლიფ სპექტრებზე დაკვირვება რეალური დროის რეჟიმში.

### **2.1.2.1. სინათლის წყაროები**

წარმოდგენილ ფლუორესცენციური ანალიზის ექსპერიმენტალურ დანადგარში გათვალისწინებულია ფლუორესცენციის აღგზნება სელექტიურად, მძლავრი მონოქრომატული ლაზერული გამოსხივებით. სელექტიური აღგზნება საშუალებას გვაძლევს დავასახლოთ მხოლოდ ჩვენთვის საინტერესო აღგზნებული დონე და დავაკვირდეთ იქედან მიმდინარე პროცესებს. ლაზერული აღგზნება საშუალებას იძლევა აგრეთვე ულტრა მოკლე იმპულსების საშუალებით გამოსხივების ურთიერთქმედება გარემოსთან გაგხადოთ ფაქტიურად მყისიერი.

ექსპერიმენტალურ დანადგარში გამოყენებულია 5 ლაზერი, რომლებიც არაწრფივ ოპტიკურ გარდამქმნელებთან ერთად 226nm-დან 1064nm-მდე დიაპაზონში 16 სხვადასხვა ტალღის სიგრძის მონოქრომატულ გამოსხივებას იძლევიან:

#### **1. He-Ne-ის გაზური ლაზერი ЛЛ-38**

უწყვეტი, ერთმოდინი, ტალღის სიგრძე  $\lambda = 633\text{nm}$ , სიმძლავრე  $P=60\text{mW}$ . გამოიყენება, როგორც ფლუორესცენციის აღსაგზნებად, ასევე ოპტიკური იუსტირებისათვის, ამიტომ დანადგარში

განთავსებულია იმდგვარად, რომ ის ასხივებს ყველა დანარჩენი ლაზერის შემხვედრი მიმართულებით.

2. Ar<sup>+</sup>-ის გაზური ლაზერი ЛГ-106М

უწყვეტი, ერთმოდინი, პოლიქრომატული, ასხივებს ერთდროულად

6 ტალღას, შემდეგი შესაბამისი სიმძლავრეებით:

ტალღის სიგრძე λ(nm)	457.9	476.5	488	496.5	501.7	514.5
სიმძლავრე P(mW)	50	125	350	100	50	350

თითოეული ტალღის სელექცია ხდება 2(1) აბეს პრიზმის საშუალებით.

3. N<sub>2</sub> - გაზური ლაზერი ЛГИ-21

ტალღის სიგრძე - λ = 337nm. იმპულსურ-პერიოდული (სიხშირით - 1100Hz). იმპულსის ხანგრძლივობა - 10ns. ენერგია ერთ იმპულსში - 0.5mj.

4. Cr<sup>3+</sup>:Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, ლალის ლაზერი ОГМ-20

ტალღის სიგრძე - λ = 694nm. ლაზერი მუშაობს ერთჯერად იმპულსურ და იმპულსურ-პერიოდულ (სიხშირით - 0.5-1 Hz) რეჟიმებში. გიგანტური იმპულსების რეჟიმი რეალიზებულია რეზონატორის ვარგისიანობის ჩართვით. ამ მიზნით გამოყენებულია ნიტრობენზოლში გახსნილი ვანადიუმის ფტოლოციანინის თვითინდუცირებული გამჭვირვალობის ეფექტი. გიგანტური იმპულსების რეჟიმში იმპულსის ხანგრძლივობა 20ns, ენერგია კი 100mj-ს შეადგენს. ალიუმის დიგიდროფოსფატის (KDP) არაწრფივი კრისტალის გამოყენებით ნახ.2.-ზე 25-ით (სინქრონიზმის კუთხე  $\theta_c=50.6^\circ$ ) მიღებულია ლაზერული გამოსხივების მეორე ჰარმონიული სიხშირე, შესაბამისად λ=347nm. ენერგია ერთ იმპულსში - 10mJ.

5.  $\text{Nd}^{3+}:\text{Y}_3\text{Al}_5\text{O}_{12}$ -ის ლაზერი (ლაბორატორიაში აგებული)  
 ტალღის სიგრძე -  $\lambda = 1064\text{nm}$ . ლაზერი მუშაობს იმპულსურ-პერიოდულ რეჟიმში (სიხშირით - 3-100 Hz). იგანტური იმპულსების რეჟიმი რეალიზებულია რეზონატორის ვარგისიანობის ჩართვით. ამ მიზნით გამოყენებულია LiF კრისტალის შეღებვის ცენტრების თვითინდუცირებული გამჭვირვალობის ეფექტი. იმპულსეს ხანგრძლივობაა 20ns. ენერგია - 25mJ. კალიუმის დიგიდროფოსფატის (KDP) 3 არაწრფივი კრისტალის გამოყენებით ნახ.2.-ზე 26(1,2,3), რომლებიც სინქრონიზმის შესაბამისი კუთხეებით იყო დაჭრილი ( $\theta_c - 41.2^\circ; 60^\circ; 76.8^\circ$ ) მიღებულია ძირითადი ლაზერული გამოსხივების მე-2 -  $\lambda = 532\text{nm}$ ,  $E = 5\text{mJ}$ , მე-3 -  $\lambda = 354.7\text{nm}$ ,  $E = 0.8\text{mJ}$  და მე-4 -  $\lambda = 266\text{nm}$ ,  $E = 1.0\text{mJ}$  ჰარმონიული სიხშირეები. აქვე აღსანიშნავია, რომ გიგანტური იმპულსების რეჟიმში ჰარმონიულების გენერაცია ხდება სხივთა პარალელურ კონაში (ფოკუსირების გარეშე). KDP-ს სამივე არაწრფივი კრისტალი განთავსებულია ერთ საიუსტირებო მაგიდაზე, რომელიც საშუალებას იძლევა პარალელური გადანაცვლებებით (დამატებითი იუსტირების გარეშე) სხივთა სვლაში განვალაგოთ ჩვენთვის საჭირო კრისტალი. მე-2 ჰარმონიულის შემთხვევაში ეს არის  $\text{KDP}^{2\omega}$ . მე-3 ჰარმონიული მიიღება უკვე ორი კრისტალით  $\text{KDP}^{2\omega} + \text{KDP}^{3\omega}$ , აქედან პირველში ხდება მე-2 ჰარმონიულის წარმოქმნა, ხოლო  $\text{KDP}^{3\omega}$ -ში ძირითადი და გაორმაგებული სიხშირეების შეკრება ( $\omega+2\omega$ ). მე-4 ჰარმონიულს ვიღებთ ორჯერ გაორმაგებით, რაც შესაბამისად მიიღება თანამიმდევრულად ასევე ორი კრისტალით  $\text{KDP}^{2\omega} + \text{KDP}^{4\omega}$ . ამას გარდა აღწერილ დანადგარს გააჩნია აგრეთვე ორგანული საღებარების ლაზერული ბლოკი 11, რომლის გამოყენებითაც  $\lambda = 532\text{nm}$  აღზნებით მიღებულია კიდევ ორი ლაზერული სიხშირე, კერძოდ:  $\lambda = 572\text{nm}$  (Rodamine 6G) და  $\lambda = 639\text{nm}$  (Oxazine 120).

### 2.12.2. მონოქრომატორები

ფლორესცენციურ დანადგარში გამოყენებულია სტანდარტული ინფრაწითელი მონოქრომატორი ИКМ-1 და დიფრაქციული სპექტროგრაფი ДФС-452 ნახ. 2.- 14.

ახლოინფრაწითელ უბანში, გამოსხივების სპექტრალურად გასაშლელად, სამუშაოდ (1000 nm-5000 nm) იხმარება ИКМ-1 (LiF-ის პრიზმითა და დიფრაქციული მესრით (200 შტრიხი/მმ) გარჩევისუნარიანობა 1nm).

სპექტრის ულტრაიისფერ-ხილულ დიაპაზონში (180nm-1100nm) გამოიყენება დიფრაქციული სპექტროგრაფი ДФС-452, რომელიც მცირედი გადაკეთების შემდეგ მუშაობს მონოქრომატორის რეჟიმში. ამისათვის მას მოხსნილი აქვს ფოტოფირის დამჭერი მოწყობილობა და მის ადგილზე, რეგისტრაციის სიბრტყეში, მოთავსებულია გამოსხივების გამოსასვლელი ვერტიკალური ხვრელი და მიმღები. ეს ორივე ერთად მოთავსებულია ორკოორდინატულ საიუსტირებო მაგიდაზე, რისი მეშვეობითაც ხდება ხვრელისა და მიმღების იმ მდგომარეობაში მოყვანა, რომ ტალღის სიგრძის ჩვენება სპექტროგრაფის სკალაზე შეესაბამებოდეს მიმღებში მოხვედრილი სინათლის ტალღის სიგრძეს. სპექტროგრაფის დაკალიბრება ხორციელდება ცნობილი ლაზერული ტალღის სიგრძეებით. სპექტროგრაფი ДФС-452 აღჭურვილია ორი დიფრაქციული მესრით (600 და 12000 შტრიხი/მმ). მაქსიმალური გარჩევისუნარიანობა შეადგენს 0.1nm-ს. გაზომილი ტალღის სიგრძის აბსოლუტური ცდომილება მთელ სამუშაო დიაპაზონში (180nm – 1100nm) არ აღემატება 0.2nm-ს.

ბიოლოგიური ქსოვილების ფლორესცენციის რეგისტრაციის მოდიფიცირებულ დანადგარში მონოქრომატორის ფუნქციას ასრულებს დიფრაქციული მესერი 1200 შტრიხი/მმ, 10 $\mu$ m დრეჩოს პირობებში გარჩევისუნარიანობა შეადგენს 0.22nm. დიფრაქციული მესერი ინტეგრირებულია MS125<sup>TM</sup> სპექტროგრაფის კორპუსში. მას გააჩნია დასაკალიბრებელი მიკრომეტრული ხრახნი, რომლის საშუალებითაც ხდება დეტექტორების დიაპაზონის შერჩევა.

### 2.12.3. სხივთა სელა

ფლუორესცენციური ანალიზის დანადგარის სქემა მოცემულია ნახ.2.-ზე. გასაზომი ნიმუში 1 მოთავსებულია მონოქრომატორის შესასვლელი ხერხელის წინ სამკოორდინატიან საიუსტირებო მაგიდაზე. 5(1) ლინზით ფოკუსირებული ფლუორესცენციის აღმგზნები ლაზერული გამოსხივება 12(1) მაბრუნებელი პრიზით მიმართულია მონოქრომატორის შესასვლელი ხერხელის გასწვრივ ნიმუშზე. 12(1) მაბრუნებელი პრიზისა და ნიმუშის მაგიდის რეგულირებით ხდება ხერხელისა და ნიმუშის აღგზნებული არის სიგრძივი თანხვედრა. ამ დროს მონოქრომატორის შესასვლელი ხერხელის მთელი სიგრძე განათებულია გასაზომი გამოსხივებით, რაც საგრძნობლად ზრდის სინათლის ძალას.

12(2) მაბრუნებელი პრიზმა და 5(2) ლინზა განკუთვნილია He-Ne-ის ლაზერის ოპტიკური ღერძის გასწვრივ შემხვედრი მიმართულებით მისამართად და სხივის ნიმუშზე დასაფოკუსირებლად. He-Ne-ის ლაზერი იმავდროულად ასრულებს საიუსტირებო ლაზერის ფუნქციას. 12(3) და 12(4) პრიზმები შესაბამისად მიმართავენ N<sub>2</sub>-ლაზერს.

მაბრუნებელი პრიზმები 13(1), 13(2), 13(3) განთავსებულია სპეციალურ, მოძრავ მაგიდებზე, ისე რომ რიგრიგობით ხდება მათი დაყენება ფიქსირებულ ადგილებზე, რაც თავის მხრივ უზრუნველყოფს ოპტიკური ღერძის გასწვრივ შესაბამისად Ar<sup>+</sup>-ის, Nd<sup>3+</sup>-ისა და Cr<sup>3+</sup>-ის ლაზერებისა და მათი ჰარმონიულების შემოყვანას. ლალის ლაზერისა და კალიუმის დიგიდროფოსფატის (KDP) არაწრფივი კრისტალის 25 გამოყენებისას მიიღება სივრცულიად თანხვედრილი ორი სხივი (ლაზერის ძირითადი გამოსხივება -  $\lambda = 694\text{nm}$  და მისი მეორე ჰარმონიული -  $\lambda = 347\text{nm}$ ). მათი გამოყოფა ხდება მბრუნავ მაგიდაზე მოთავსებული აბეს პრიზმის 2(3) საშუალებით. აბეს პრიზმის გამოყენება, მისი მაღალი დისპერსიულობის გამო, საშუალებას იძლევა მოკლე მანძილებზე მოხდეს საჭირო სხივის 10(3) ხერხელით გამოყოფა. ამავე დროს აბეს პრიზმა ასრულებს მაბრუნებელი პრიზმის როლს.



$\text{Nd}^{3+}$ -ის ლაზერის 21 და არაწრფივი კრისტალების 26(1, 2, 3) შემთხვევაში მიიღება სხივები შემდეგი ტალღის სიგრძეებით: 1064nm; 532nm; 354.7nm; 266nm. 2(2) პრიზმითა და 10(2) ხვრელით ანალოგიურად ხდება საჭირო ტალღის სიგრძის შერჩევა. ამავე დროს აღსანიშნავია, რომ ერთი სხივიდან მეორეზე გადასვლა ხდება მხოლოდ 2(2) აბეს პრიზმის მოტრიალებით და სხვა დამატებით იუსტირებას არ საჭიროებს. ორგანული საღებარების ლაზერული ბლოკი 11, რომელიც მაფოკუსირებელი ლინზისა და საღებარიანი კიუვეტისაგან შედგება, მოთავსებულია ერთ სადგამზე. ის მხოლოდ საჭიროების შემთხვევაში იდგმება ნახ.2.-ზე აღნიშნულ ადგილზე.

$\text{Ar}^+$ -ის გაზური ლაზერი 20 პოლიქრომატულია, იგი ასხივებს ერთდროულად 6 ტალღას. მათი სელექციისათვის ანალოგიურად გამოყენებულია აბეს პრიზმა 2(1) და ხვრელი 10(1). განსხვავებით დანარჩენი სამუშაო ლაზერებისაგან  $\text{Ar}^+$ -ის გაზური ლაზერი უწყვეტია. ზოგიერთი ექსპერიმენტი კი, როგორებიცაა: აღზნებული დონეების სიცოცხლის ხანგრძლივობის გაზომვა, რეგისტრაცია სისშირული სელექციის რეჟიმში, აუცილებლად საჭიროებს ფლუორესცენციის აღზნებას იმპულსურ-პერიოდული გამოსხივებით. ამისათვის 10(1) ხვრელში გამავალი სხივი მოდულირებულია 4 მწყვეტარას საშუალებით. მიღებული მართკუთხა იმპულსების ფლანგების ხანგრძლივობა  $\approx 300\mu\text{s}$ -ს შეადგენს. ლაზერის სხივის 3(10) და 3(2) ლინზებით ტელესკოპირებისა და 4 მწყვეტარას ლინზების საერთო ფოკუსში მოთავსებით იმპულსების ფლანგების ხანგრძლივობა მცირდება  $\approx 0.5\mu\text{s}$ -მდე, რაც უკვე სწრაფ რელაქსაციურ პროცესებზე დაკვირვების საშუალებას იძლევა.

#### **2.1.2.4. რეგისტრაცია**

ფლუორესცენციური გამოსხივების მიმღებებად ნახ.2.-6, 9 სპექტრის ულტრაიისფერ, ხილულ, ახლოინფრაწითელ უბნებში გამოიყენება შესაბამისი დიაპაზონის დაკალიბრებული ფოტოელექტრული გამამრავლებლები (ФЭУ-18А, ФЭУ-51, ФЭУ-62). შუაინფრაწითელი გამოსხივების რეგისტრაცია ხდება PbS-ის

ფოტოწინაღობით 7 (77K გაცივებით). ლაზერული იმპულსების სიმძლავრისა და ენერჯის აბსოლუტური მნიშვნელობების გასაზომად და ფოტოგამამრავლებლების დასაყალიბებლად გამოყენებულია სიმზლავრის გამზომი ИМО-2H.

ფლუორესცენციური ანალიზის მოცემული ექსპერიმენტალური დანადგარი გათვალისწინებულია: ა) სტაციონარულ, ბ) იმპულსურ-პერიოდულ და გ) იმპულსურ რეჟიმებში სამუშაოდ. სამუშაო რეჟიმის შესაბამისად ხდება ფოტოგამამრავლებლების ელექტრული სიგნალების რეგისტრაცია.

ა) სტაციონარული რეჟიმი. გამოიყენება ფლუორესცენციის სპექტრების ჩასაწერად. ფლუორესცენცია აღიზნება უწყვეტი ლაზერით ( $Ar^+$ -ის ლაზერი მოდულაციის გარეშე, He-Ne-ის ლაზერი). 6 და 7 მიმღებებიდან გამომავალი ელექტრული სიგნალები მუდმივია. სიგნალების მიღება და გაძლიერება ხდება მუდმივი ძაბვის ციფრული ნანოვოლტმეტრის 16 საშუალებით. 17 მოწყობილობით მონაცემები შედის 19 პერსონალურ კომპიუტერში.

ბ) იმპულსურ-პერიოდული რეჟიმი. ძირითადი სამუშაო რეჟიმია ფლუორესცენციის სპექტრების ჩასაწერად. აღიზნები ლაზერები მუშაობენ სიხშირულ რეჟიმში (ლაზერები  $N_2$ ,  $Nd^{3+}$ ,  $Ar^+$  მოდულაციით). იმპულსების სიხშირე  $6 \pm 100 Hz$ . დრო ორ უახლოეს იმპულსს შორის ბევრად მეტია აღიზნებული სიციცხლის ხანგრძლივობაზე. იტომ 6 და 7 მიმღებებიდან გამომავალი ელექტრული სიგნალების რეგისტრაცია შესაძლებელია, როგორც ინერციული მუდმივი ძაბვის ნანოვოლტმეტრის 16 საშუალებით, ასევე სიხშირული სელექციის რეჟიმში. ეს უკანასკნელი ხორციელდება სელექტიური ნანოვოლტმეტრის 15 საშუალებით. სელექტიური ნანოვოლტმეტრი 15 (UNIPAN – 233) ზომავს მხოლოდ იმ იმპულსებს, რომლებიც მეორდებიან ლაზერის იმპულსების განმეორებადობის სიხშირით. ამით უზრუნველყოფილია

ხმაურის მნიშვნელოვანი შემცირება და ფლუორესცენციის სპექტრების ზუსტად გაზომვა.

გ) იმპულსურ რეჟიმი: გამოიყენება ფლუორესცენციის დინამიური მახასიათებლების დასადგენად. მართალია აღმზნები ლაზერები მუშაობენ ისევე იმპულსურ ან იმპულსურ-პერიოდულ რეჟიმში (ლაზერები:  $Ar^+$  მოდულაციით,  $N_2$ ,  $Cr^{3+}$ ,  $Nd^{3+}$ ), მაგრამ ამ დროს დაკვირვება ხდება მხოლოდ ერთი იმპულსით აღმზნებულ ფლუორესცენციაზე. 6 და 7 მიმდებების ელექტრული სიგნალის რეგისტრაცია ხდება ჩამწერი ოსცილოგრაფის 18 (C8-14)-ის საშუალებით. 18 ოსცილოგრაფის ერთჯერადი გაშვება ხდება ჩვენთვის საჭირო შეყოვნებით 9 გამშვები ფოტოგამამრავლებლის საშუალებით. 9 ფოტოგამამრავლებელზე ეცემა აღმზნები გამოსხივების ნაწილი, რომელიც 8 ფირფიტითაა გამოყოფილი. ოსცილოგრაფზე ჩაწერილი ფლუორესცენციის იმპულსის გადაღება ხდება ფოტოფირზე, რომლის დამუშავების შემდეგ მონაცემები ცხრილის სახით შეიყვანება 19 პერსონალურ კომპიუტერში.

ბიოლოგიური ქსოვილების ფლუორესცენციის რეგისტრაციის მოდიფიცირებულ დანადგარში სიგნალის რეგისტრაცია ხდება 2048 პიქსელიანი CCD დეტექტორით. დეტექტორის მინიმალური ინტეგრაციის დრო 10 მილიწამს შეადგენს.

### **2.1.3. მორგების პროცედურა**

ექსპერიმენტული მონაცემებისათვის მისაღები თეორიული მოდელის შესამოწმებლად ძალზე მოსახერხებელია ამ მოდელით გამოთვლილი თეორიული მრუდის ექსპერიმენტულ მონაცემებზე წარმატებული მორგება. განვიხილოთ ეს პროცედურა.

ნებისმიერი მორგების პროცედურა შეგვიძლია დავყოთ ორ ძირითად ნაწილად. პირველი: უნდა ვივარაუდოთ, რომ ექსპერიმენტში რაიმე სიდიდე ან სიდიდეები, რომლებიც გარკვეულ დიაპაზონში კონტროლირებადად იცვლებიან, წარმოადგენენ დამოუკიდებელ

ცვლადებს. შემდგომში განვიხილოთ, მხოლოდ ჩვენთვის საინტერესო, ერთი ცვლადის შემთხვევა და იგი  $x$ -ით აღვნიშნოთ. შემდეგ  $x$  დამოუკიდებელი ცვლადის კონტროლირებადი ცვლილებების ვიდეო (ვზომავთ) მასზე დამოკიდებულ  $y$  ცვლადს. მოდელი: ვთვლით, რომ

$$y = f(x; p_1, p_2, p_3, \dots) \quad (1)$$

გამოსახულება იმ თეორიულ მოდელს წარმოადგენს, რომელიც ექსპერიმენტულად დამზერილ შედეგებს აღწერს. მოდელი, როგორც წესი, ასევე რამოდენიმე პარამეტრზეა დამოკიდებული:  $p_1, p_2, p_3, \dots$ . მორგების პროცედურის არსი ხსენებული პარამეტრების ისეთი მნიშვნელობების პოვნაა, რომლის დროსაც (1) მრუდი საუკეთესოდ ერგება ექსპერიმენტულ წერტილებს, ანუ თეორიული მრუდის ექსპერიმენტული წერტილებიდან გადახრის კვადრატების ჯამი  $x$

$$\chi^2(p_1, p_2, \dots) = \frac{1}{n-p} \sum_i w_i [y_i - f(x_i; p_1, p_2, \dots)]^2 \quad (2)$$

დამოუკიდებელი ცვლადის ცვლილების არეში მინიმალურია. ამ გამოსახულებაში  $n$  მორგების პროცედურაში გამოყენებული ექსპერიმენტული წერტილების რაოდენობაა, ხოლო  $p$  კი მორგებაში მონაწილე პარამეტრების სრული რაოდენობაა. აქედან

$$\text{DoF} = n - p \quad (3)$$

თავისუფლების ხარისხია, ხოლო  $w_i$  – თითოეული ექსპერიმენტული წერტილის წონაა. ჩვენს შემთხვევაში ექსპერიმენტული წერტილის აწონის ორი მეთოდი გამოიყენება:

1) ხელსაწყოს წონა

$$w_i = 1/\Delta y_i^2, \quad (4)$$

სადაც  $\Delta y_i$  ექსპერიმენტული წერტილების ცდომილებაა.

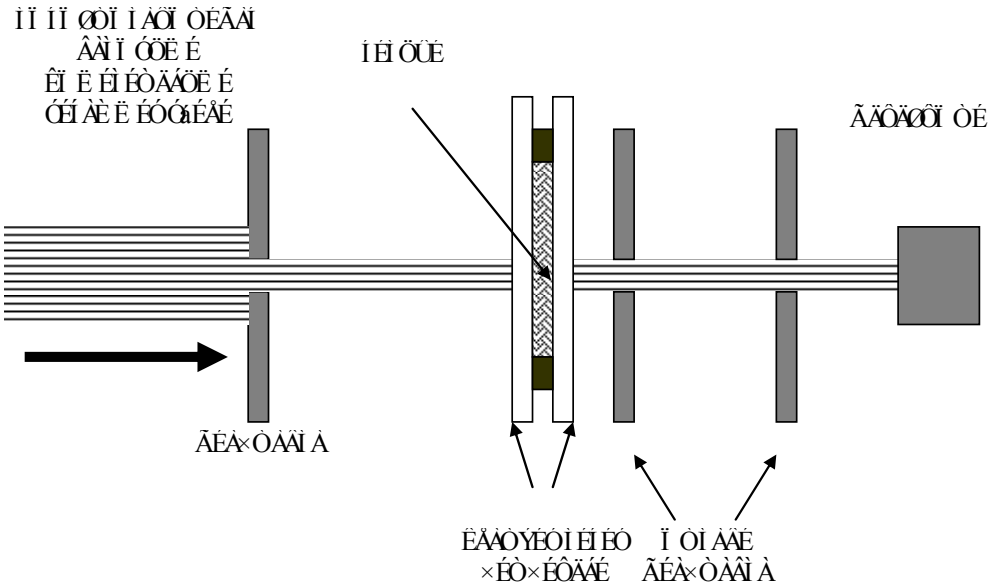
2) სტატისტიკური წონა

$$w_i = 1/y_i. \quad (5)$$

#### **2.1.4. გაბნევისა და შთანთქმის სპექტრების გაზომვა და მონაცემების დამუშავება**

ნათელი ფიზიკური სურათის მისაღებად კვლევებში განსაკუთრებული მნიშვნელობა შთანთქმისა და ერთჯერადი გაბნევის კოეფიციენტების, უფრო სწორედ კი მათი სპექტრების გაზომვას ენიჭებოდა.

ბიოლოგიურ ქსოვილს, მისი არქიტექტურული სირთულისაგან გამომდინარე ვუდგებოდით, როგორც ერთგვაროვანს. შესაბამისად არანაირი პოლარიზაციული გაზომვები არ ტარდებოდა. შთანთქმის სპექტრის გაზომვა ხორციელდებოდა ქსოვილის ძალიან თხელ ნიმუშებში ( $\leq 100\mu\text{m}$ ). ამასთან ყველგან გამოიყენებოდა სინათლის კოლიმირებული სხივი (ნახ.4). როგორც უკვე აღვნიშნეთ, კოლიმირებული სინათლის სხივის ინტენსივობა  $z$  სისქის ბიოქსოვილში გაგლისას, თუ ეს სისქე მცირეა, სუსტდება შთანთქმისა და ერთჯერადი გაბნევის ხარჯზე (გამტარებლობა).



ნახ. 4. ინტენსივობის გამტარებლობის ( $T_{coll}$ ) გაზომვის ექსპერიმენტი ბიოლოგიურ ქსოვილში კოლიმირებული სინათლის გავლისას.

ბიოლოგიურ ქსოვილში სინათლის გავრცელების თეორიის ძირითადი პარამეტრების საპოვნელად კი შემდეგი გამოსახულება გამოიყენებოდა:

$$I_{coll.}(z, \lambda) = I_{0;coll.} \exp \left\{ - [\mu_a(\lambda) + \mu_s(\lambda)] z \right\}, \quad (6)$$

სადაც

$$I_{0;coll.} = (1 - R) I_{inc;coll.} \quad (7)$$

და საიდანაც

$$\mu_a(\lambda) + \mu_s(\lambda) = \frac{-\ln [I_{coll.}(z, \lambda) / I_{0;coll.}]}{z} = \frac{-\ln T_{coll.}(z, \lambda)}{z}. \quad (8)$$

უპირატესი შთანთქმისას ( $\mu_a \gg \mu_s$ ) ან გაბნევისას ( $\mu_s \gg \mu_a$ ) ამ უკანასკნელი გამოსახულებიდან შესაბამისად ვპოულობთ შთანთქმის –

$\mu_a(\lambda)$  და გაბნევის –  $\mu_s(\lambda)$  კოეფიციენტებს. ვინაიდან საკვლევი ბიოლოგიური ნიმუშები თავსდებოდა კვარცის კიუვეტაში და აღზნება ხდებოდა სპექტრის ულტრაიისფერ უბანში, ამიტომ კორექტული გამოთვლებისთვის (8) გამოსახულებაში აუცილებლად ვითვალისწინებდით არეკვლის კოეფიციენტს (შესაბამისი მონაცემები მოყვანილია ცხრილში 2). თხელი ნიმუშით ოპერირებისას ბიოლოგიური ქსოვილის გამყოფი ზედაპირიდან ჰაერის არეკვლის კოეფიციენტი სარკისებრი (specular) არეკვლით განისაზღვრება, ანუ  $R = r_{sp}$ , ხოლო კიუვეტაში მოთავსებული ნიმუშისათვის კი შემდეგი ზედაპირებით: ჰაერი/მინა(კვარცის)/ბიოქსოვილი. რიცხობრივად ეს სიდიდე შესაბამისად გარდატეხის მაჩვენებლების ფარდობით განისაზღვრება და (7) ფორმით ჩაწერილი ტოლია:

$$r_{sp} \approx \left( \frac{n_{air}/n_{glass} - 1}{n_{air}/n_{glass} + 1} \right)^2 + \left( \frac{n_{glass}/n_{tissue} - 1}{n_{glass}/n_{tissue} + 1} \right)^2, \quad (9)$$

სადაც გამოყენებულია შემდეგი მიახლოებითი ტოლობა:

$$r_{sp}(air/glass/tissue) = [1 - r_{sp}(air/glass)] \times [1 - r_{sp}(glass/tissue)] \\ \approx \{1 - [r_{sp}(air/glass) + r_{sp}(glass/tissue)]\}$$

ჩვენს კვლევას მიესადაგება გარდატეხის მაჩვენებლების შემდეგი მნიშვნელობები:  $n_{air}/n_{glass}/n_{tissue} = 1/(1.47 \div 1.56)/1.37$ . კვარცის მინის გარდატეხის მაჩვენებლები აღებულია [80]-დან, ხოლო ბიოლოგიური ქსოვილისა კი [114]-დან. (9)-ით გამოთვლის შედეგები მოცემულია ცხრილში 2.

ცხრილი 2. სარკისებრი არეკვლის კოეფიციენტის ( $r_{sp}$ ) დამოკიდებულება ჰაერი/კვარცის მინა/ბიოქსოვილი გარემოზე დაცემული გამოსხივების ტალღის სიგრძეზე ( $\lambda$ ).  $T = 300K$ .

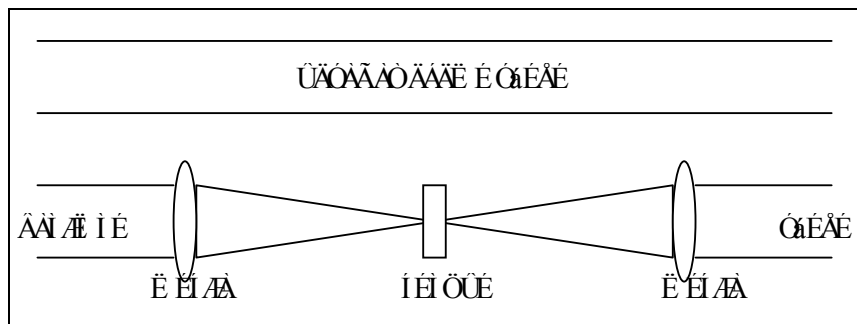
$\lambda$ , nm	n	$r_{sp}$ , %
200	1.56	5.2
203	1.55	5.0
214	1.53	4.7
226	1.52	4.5
250	1.51	4.4
257	1.50	4.2
303	1.49	4.0
340	1.48	3.9
396	1.47	3.7

ზოგადად შთათქმის სპექტრები იზომებოდა სპექტროფოტომეტრის “SPECORD M40”-UV-Vis-NIR-ის საშუალებით და იმ დამხმარე მოწყობილობების გამოყენებით, რომლებსაც სკვლევი ნიმუშის სპეციფიკა მოითხოვდა. დანადგარში არაკოჰერენტული წყაროდან გამოსხივებული სინათლის დისპერსია ხორციელდება დიფრაქციული მესრით, რომლის გარჩევისუნარიანობაა 1200 შტრიხი/მმ-ზე. სინათლის მონოქრომატული კომპონენტები 75Hz-ის სიხშირით ორ სხივად იყოფა. ერთი გამზომი სხივია, ხოლო მეორე კი შესადარებელი. სპექტროფოტომეტრი წინასწარ დაკალიბრებული იყო ცნობილი შთათქმის სპექტრებით ( $\approx 5\text{cm}^{-1}$ -ის სიზუსტით).

მცირე ზომის ნიმუშების გასაზომად სპექტროფოტომეტრში გათვალისწინებულია გამზომი სხივის დიაფრაგმირება, რომლის გამოყენებითაც შეიძლება სხივის დიამეტრიც შემცირება 3-4 mm-მდე. უფრო მეტად დიაფრაგმირების შემთხვევაში სპექტროფოტომეტრი ვეღარ მუშაობს (სინათლის ძალა აღარ არის საკმარისი). ამ



პრობლემის გადაწყვეტა მოხერხდა გამზომი სხივის სპეციალურ ტელესკოპში გატარებით, რომელიც ერთ საყრდენზე აწყობილი, ორი ფოკუსებით თანხვედრილი, შემკრები ღინზებისა და ნიმუშის დამჭერისაგან შესდგება. ამ შემთხვევაში ნიმუში სხივის ფოკუსშია მოთავსებული (იხილე ნახ. 5). აღნიშნული მოწყობილობა სინათლის ძალის შემცირების გარეშე, საშუალებას იძლევა გაიზომოს უმცირესი ზომის ბიოლოგიური ქსოვილების ფრაქციები: სისხლის პლაზმა, ფარისებრი ჯირკვლის კოლოიდური ხსნარი.



ნახ. 5. დამატებითი ტელესკოპური მოწყობილობა

სპექტროფოტომეტრიდან მიღებული შთანთქმის სიგნალის ამპლიტუდისა და ტალღის სიგრძის შესატყვისი ციფრული მონაცემები ცხრილების სახით შეიყვანება IBM PC-ტიპის ე.გ.მ.-ში, სადაც პროგრამული პაკეტის “ORIGIN software”-ის საშუალებით ხდება მათი შემდგომი დამუშავება და ანალიზი. აღნიშნული პროგრამული პაკეტის “ORIGIN software” საშუალებას იძლევა აიგოს შთანთქმის სპექტრი. საჭიროების შემთხვევაში შესაძლებელია სპექტრის გარკვეული უბნის მთელ ფორმატზე გაჭიმვა, სპექტრის აგება გასაშუალებით (მინიმალური კვადრატული გადახრის მეთოდი, გასაშუალება ორ ან რამოდენიმე წერტილზე), სპექტრის ნორმირება, როგორც აბსოლუტური მნიშვნელობით, ასევე ფარდობით.

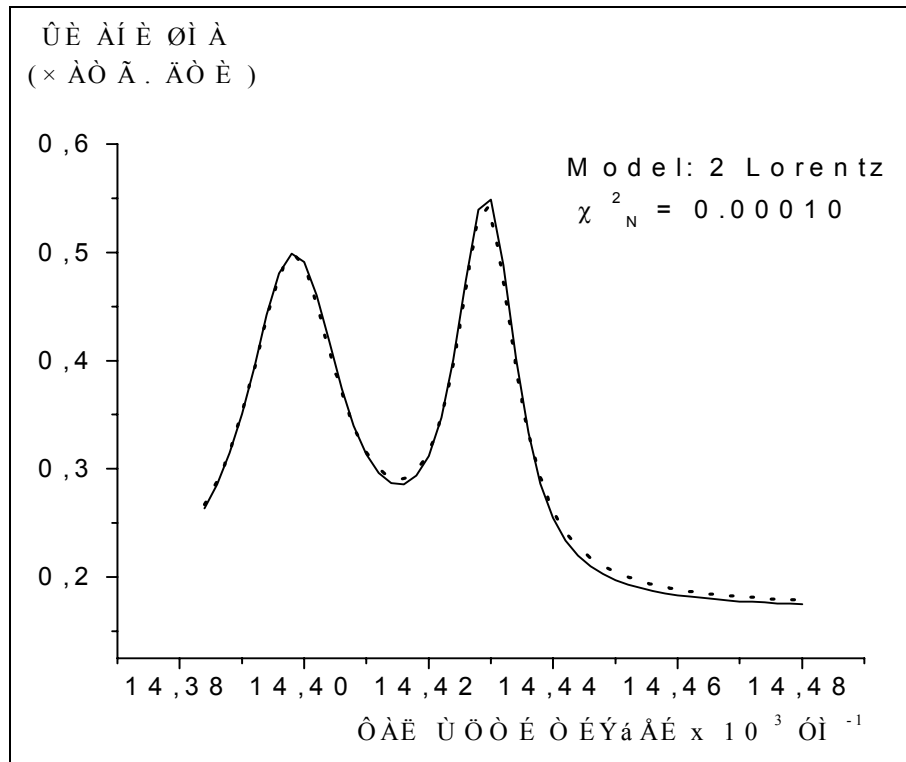
პროგრამული პაკეტი იძლევა შთანთქმის ხაზის მათემატიკური ფუნქციონალური ანალიზის საშუალებას. კერძოდ შესაძლებელია მოცემული ექსპერიმენტალური მრუდის აპროქსიმაცია ნებისმიერი ფუნქციით. იმავდროულად დგინდება აპროქსიმაციის სიზუსტე, ანუ

ექსპერიმენტალური მონაცემების ჰიპოთეტური თეორიული კანონით აპროქსიმაციის სიზუსტე –  $\chi^2$ -კრიტერიუმი [81]. ვთქვათ ერთსა და იმავე  $x$  ფიზიკურ სიდიდეს  $n$ -ჯერ ვზომავთ. თუ ეს სიდიდე უწყვეტად იცვლება, მაშინ  $x$ -ის მიღებული  $n$  მისვნილობა შეიძლება რამდენიმე, თანატოლ  $\Delta x$  კლასად დავეყოთ. ასეთ შემთხვევაში თითოეული  $x_i \pm \Delta x / 2$  ინტერვალში მოხვედრილი გაზომვის შედეგების რიცხვი  $n_i$ -ის ტოლი იქნება. ვივარაუდოთ, რომ  $x$ -ის დამოუკიდებელი კლასების რაოდენობა  $k$ -ს ტოლია. ამ შემთხვევაში ექსპერიმენტულ (ემპირიულ) და თეორიულ განაწილებებს შორის განსხვავება ტოლი იქნება შემდეგი ჯამისა:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(n_i - nP_i)^2}{nP_i} = \sum_{i=1}^k \frac{n_i^2}{nP_i} - n, \quad (10)$$

სადაც  $n_i$  სიდიდე  $i$ -ური კლასის ემპირიული სიხშირეა, ხოლო  $nP_i$  კი ჰიპოთეტური  $P_i$  (თეორიული) ალბათობით გამოთვლილი სიხშირე. (10) გამოსახულებიდან ნათლად ჩანს, რომ თუ  $\chi^2 = 0$ , მაშინ ექსპერიმენტული და გამოთვლილი სიხშირეები ერთმანეთს ემთხვევა, რაც ჰიპოთეზის სამართლიანობაზე მიუთითებს. სხვა შემთხვევაში  $\chi^2 \neq 0$  და ჰიპოთეზა მით უფრო ალბათურია, რაც უფრო მცირეა შესაბამისი  $\chi^2$ -კრიტერიუმი. ე.გ.მ.-ის გამოყენებით შედარებით ადვილად შესაძლებელია ჰიპოთეტური განაწილებების პარამეტრების ვარირება ისე, რომ  $\chi^2$ -კრიტერიუმის მნიშვნელობა მინიმალური აღმოჩნდეს. მაშინ ამ მინიმალური მნიშვნელობის შესაბამისი ჰიპოთეტური განაწილება ყველაზე უფრო ალბათური იქნება.

ჩვენი ფიზიკური გაზომვებისათვის, რომელიც თავისი არსით სხვადასხვა სპექტრალური ფორმების რეგისტრაციას წარმოადგენს უფრო მოსახერხებელია  $\chi^2$ -კრიტერიუმის ნაცვლად მისი ნორმირებული მნიშვნელობის –  $\chi^2_N$ -ის გამოყენება, რომელიც  $\chi^2$ -ისა და სპექტრალური მრუდის მაქსიმალური ამპლიტუდის კვადრატის ფარდობით გამოითვლება.



ნახ. 6.. Cr<sup>3+</sup>:Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> კრისტალის შთანთქმის სპექტრის (R<sub>1</sub> და R<sub>2</sub> ხაზები) მრუდის ჰიპოთეტური მრუდით აპროქსიმაცია

ნახ.6.ზე მოყვანილია მათემატიკური მოდელირების მეთოდის გამოყენების ერთ-ერთი მარტივი მაგალითი, რომელიც სპექტროფოტომეტრის დაყალიბებისათვის იქნა გამოყენებული. ნახაზზე უწყვეტი ხაზით აღნიშნულია “SPECORD M40”-ით გაზომილი Cr<sup>3+</sup>:Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> კრისტალის შთანთქმის სპექტრი (R<sub>1</sub> და R<sub>2</sub> ხაზები). ექსპერიმენტალური მრუდი (11) ფორმულით წარმოდგენილია ორი ლორენცის ფუნქციის ჯამის სახით.

$$Y(x) = \frac{P_1}{\left[1 + \frac{4(x-P_6)^2}{P_2^2}\right]} + \frac{P_3}{\left[1 + \frac{4(x-P_7)^2}{P_4^2}\right]} + P_5, \quad (11)$$

სადაც x ცენტრი ტალღურ რიცხვს შეესაბამება, ხოლო Y კი შთანთქმას. ფორმულაში P<sub>1</sub>, P<sub>2</sub>, P<sub>3</sub>, P<sub>4</sub>, P<sub>5</sub>, P<sub>6</sub> და P<sub>7</sub> თავისუფალი

პარამეტრებია, რომელთა დადგენაც მოდელირების პროცესში ხორციელდება.

შთანთქმის მრუდის (11) ფორმულით მოდელირების შედეგები ნახ.6-ზე წყვეტილი ხაზითაა წარმოდგენილი. ამ ორი მრუდის თანხვედრა მიუთითებს მოდელირების მაღალ სიზუსტეზე. ქვემოთ მოყვანილია გამოთვლის შედეგები, რომლებიც თავის მხრივ შემდეგ ფიზიკურ სიდიდეებს წარმოადგენენ:

- $\chi_N^2 = 0.00010$  (ნორმირებული  $\chi_N^2$ -კრიტერიუმი)
- $P_5=0.1703$  (შთანთქმის ფონი, ფრენელის ანარეკლები + გაბნევა)
- $P_1=0.3154$   $P_3=0.3489$  ( $R_1$  და  $R_2$  შთანთქმის ხაზების ძალა)
- $P_2=18.05$   $P_4=11.55$  ( $R_1$  და  $R_2$  ხაზების სიგანეები  
ნახევარსიმაღლეზე  $cm^{-1}$ )
- $P_6=14399$   $P_7=14429$  ( $R_1$  და  $R_2$  ხაზების ტალღური რიცხვები  $cm^{-1}$ )

$R_1$  და  $R_2$  ხაზების ტალღური რიცხვების ლიტერატურული მონაცემები შესაბამისად შეადგენენ  $14403cm^{-1}$  და  $14432cm^{-1}$ -ს [82]. მათი კარგი თანხვედრა  $P_6$  და  $P_7$ -ის მნიშვნელობებთან მიუთითებს როგორც გამოთვლის, ასევე სპექტროფოტომეტრის დაკალიბრების სიზუსტეზე.

სპექტროფოტომეტრ “SPECORD M40 – UV-Vis-NIR”-ის პერსონალურ კომპიუტერთან დაკავშირება და “ORIGIN software”-ის პროგრამული პაკეტის გამოყენებით მონაცემთა დამუშავება სპექტრების აგებისა და მათი შემდგომი ანალიზის ფართო შესაძლებლობებს იძლევა. რაც თავის მხრივ მოიცავს როგორც მონაცემთა გასაშუალებას (მინიმალური კვადრატული გადახრის მეთოდი, გასაშუალება ორ ან რამოდენიმე წერტილზე), ასევე სპექტრების ნორმირებასა და ფორმატირებას. მნიშვნელოვანია აგრეთვე შთანთქმის მრუდის ფუნქციონალური ანალიზის და მათემატიკური მოდელირების შესაძლებლობა.

სპექტროფოტომეტრის დამატებითი მოწყობილობებით აღჭურვა პოლარიზაციული აბსორბციული სპექტროსკოპიის ჩატარების საშუალებას იძლევა. ასევე შესაძლებელი ხდება ოპტიკურად მღვრიე

გარემოსათვის კოლიმირებული კომპონენტის გამოყოფით სინათლის შთანთქმისა და ერთჯერადი გაბნევის მახასიათებლების (შთანთქმის და გაბნევის კოეფიციენტები) სპექტრების გაზომვაც.

CCD დეტექტორით შთანთქმის სპექტრის ჩაწერა შესაძლებელია ტალღის სიგრძეთა მთელ სამუშაო დიაპაზონში ერთდროულად, ერთი გაზომვით.

### 2.1.5. ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენცია

სტაციონარულ პირობებში, თუ ლაზერის გამოსხივების შთანთქმა  $\ell$  მონაკვეთში ხორციელდება, მაშინ დროის ერთეულში შთანთქმული ფოტონების რაოდენობა ( $n_{ax}$ ) ტოლი იქნება შემდეგი სიდიდისა:

$$n_{ax} = n_x p_{ax}, \quad (12)$$

სადაც

$$p_{ax} = 1 - \exp(-\mu_{ax}\ell). \quad (13)$$

ამ გამოსახულებებში  $n_x$  – ლაზერის მიერ ერთ წამში გამოსხივებული ფოტონების რაოდენობაა, ხოლო  $p_{ax}$  ერთ წამში  $\ell$  სიგრძის მონაკვეთზე ფოტონების შთანთქმის ალბათობაა.

ფლუოროფორის მიერ ერთ წამში გამოსხივებული ფოტონების რაოდენობა ტოლია

$$n_m = n_{ax} \phi_{xm} \quad (14)$$

სადაც  $\phi_{xm}$  ფლუორესცენციის კვანტური გამოსავალია.

ბუნებრივია, რომ ექსპერიმენტში მხოლოდ სპონტანურად გამოსხივებული ფოტონების ნაწილი ხვდება მიმღებს, ანუ  $\eta_{coll} n_m$ . თუ მიმღების მიერ ფოტონების დეტექციის ეფექტურობას აღვნიშნავთ, როგორც  $\eta_{det}$ , მაშინ ერთ წამში დარეგისტრირებული ფოტონების რიცხვი (12) და (14) გამოსახულებების გათვალისწინებით ტოლი იქნება:

$$n_{FD} = \eta_{coll} \eta_{det} n_m = n_x p_{ax} \phi_{xm} \eta_{coll} \eta_{det}. \quad (15)$$

თხელი ნიმუშისათვის, ანუ როდესაც  $\mu_{ax} \ell \ll 1$  (13) და (15) გამოსახულებიდან ვიღებთ:

$$n_{FD} = \mu_{ax} \ell \varphi_{xm} \eta_{coll} \eta_{det} n_x. \quad (16)$$

ყოველ ერთ წამში ფლუორესცენციის ფოტონი ან ფოტონები საიმედოდ რომ დავარეგისტრირთ, რასაც შეესაბამება  $n_{FD} \geq 1 \text{ s}^{-1}$ , ამისათვის უნდა შესრულდეს შემდეგი პირობა:

$$n_x \geq \frac{1}{\mu_{ax} \ell \varphi_{xm} \eta_{coll} \eta_{det}} [\text{photon} \times \text{s}^{-1}]. \quad (17)$$

შევაფასოთ ღაზურით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტროსკოპიის ეფექტურობა ამ თვალსაზრისით ერთ-ერთი ყველაზე არახელსაყრელი შემთხვევისათვის. განვიხილოთ მეთოდის ეფექტურობა დნმ-ის მოლეკულისათვის. როგორც ცნობილია ამ მოლეკულის კვანტური გამოსავალი  $10^{-4} - 10^{-5}$ -ია [83]. შეფასებისათვის ავიღოთ სიდიდე  $10^{-5}$ . თანამედროვე ფოტოდეტექტორების ფოტოელექტრონული გამამრავლებლების ეფექტურობა  $\eta_{det} = 0.2$  [10]. საგულდაგულოდ შერჩეული ოპტიკური ელემენტების შემთხვევაში კი ფლუორესცენციის ფოტონები შეგვიძლია შევაგროვოთ შემდეგი ეფექტურობით  $\eta_{coll} = 0.1$ . ამ შემთხვევაშიც დავამძიმოთ მდგომარეობა და  $\eta_{det}$  და  $\eta_{coll}$  დან თითოეული შევაფასოთ როგორც  $10^{-2}$ . თავის დაზღვევის მიზნით  $\mu_{ax} \ell$  შევაფასოთ როგორც  $10^{-3}$ . შერჩეული სიდიდეების გათვალისწინებით (17) გამოსახულებიდან მივიღებთ

$$n_x \geq 10^{12} [\text{photon} \times \text{s}^{-1}]. \quad (18)$$

თუ განვიხილავთ ლაზერს, რომელიც 266 nm ტალღის სიგრძეზე გენერირებს, და მისი ფოტონის ენერჯია  $10^{-18}$  J (ჯოული) მაშინ (17) პირობა რომ შესრულდეს ლაზერს სულ მცირე 1  $\mu$ W-ის ტოლი სიმძლავრე უნდა გააჩნდეს. ლაზერში ასეთი სიმძლავრეების მიღება არანაირ ტექნიკურ სირთულეს არ წარმოადგენს.

ამრიგად ცხადია, რომ ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტროსკოპია ბიოლოგიური ქსოვილების ფლუორესცენციის სპექტრების რეგისტრაციისა და კვლევის საიმედო მეთოდს წარმოადგენს.

ზემოთ აღწერილი ფლუორესცენციური ანალიზის ექსპერიმენტალურ დანადგარში ფლუორესცენციის აღზნება სელექტიურად, მონოქრომატული ლაზერული გამოსხივებით ხორციელდება. 16 ლაზერული სიხშირით უზრუნველყოფილია სპექტრის მთელი ხილულ – ულტრაიისფერი დიაპაზონის გადაფარვა.

ფლუორესცენციური გამოსხივების რეგისტრაცია შესაძლებელია ფართო ოპტიკურ დიაპაზონში (180nm - 5000nm) აღზნების სტაციონარულ, იმპულსურ-პერიოდულ და იმპულსურ რეჟიმებში. ფლუორესცენციის სპექტრების ჩაწერა ხდება მაღალი გარჩევისუნარიანობით ( $\Delta\lambda = 0.2$  nm).

დანადგარში გათვალისწინებულია ფლუორესცენციის აღზნებისა და რეგისტრაციის დინამური რეჟიმები, რაც ითვალისწინებს გამოსხივების დროზე დამოკიდებულების გადაღებას. დროის გარჩევისუნარიანობა შეადგენს 10ns-ს.

ფლუორესცენციური გაზომვების ექსპერიმენტალური მონაცემების დამუშავება ხორციელდება “ORIGIN software”-ის პროგრამული პაკეტით.

კიდევ ერთხელ აღნიშვნის ღირსია ის, რომ პროგრამული პაკეტი “ORIGIN software” როგორც შთანთქმის, ასევე ფლუორესცენციის ხაზების სტატისტიკური მეთოდებით ანალიზის საშუალებას იძლევა. კერძოდ, შესაძლებელია მოცემული ექსპერიმენტალური მრუდის აპროქსიმაცია ნებისმიერი ფუნქციით, იმავდროულად დგინდება აპროქსიმაციის სიზუსტე, ანუ ექსპერიმენტული მონაცემების ჰიპოთეტური თეორიული კანონით აპროქსიმაციის სიზუსტე –  $\chi^2$ -

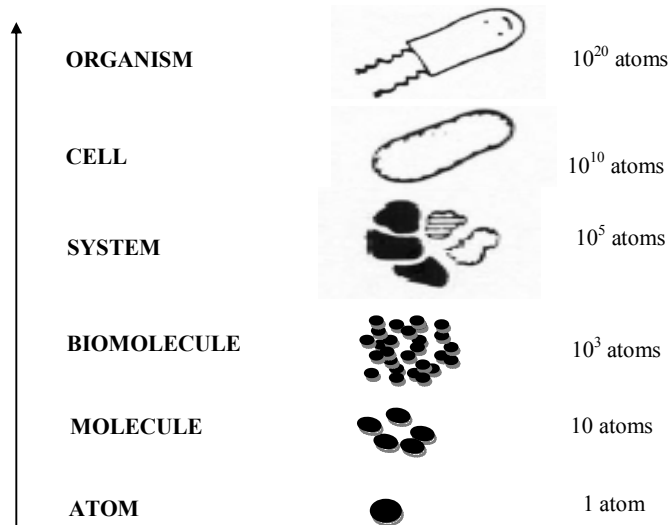
კრიტერიუმი. ე.გ.მ.-ის გამოყენებით შედარებით ადვილად შესაძლებელი ჰქონებოდა განაწილებების პარამეტრების ვარიაცია და შესაბამისად ყველაზე უფრო ალბათური განაწილების დადგენა.

შთანთქმის ანალოგიურად, CCD დეტექტორით ფლუორესცენციის სპექტრის ჩაწერა შესაძლებელია ტალღის სიგრძეთა მთელ სამუშაო დიაპაზონში ერთდროულად, ერთი გაზომვით.

## **2.2. ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენცია და დიაგნოსტიკის ფიზიკური საფუძვლები**

ჯაჭვი ატომებიდან ორგანიზმებამდე: ატომი → მოლეკულა → ბიომოლეკულა → სისტემა → უჯრედი → ორგანიზმი (ადამიანის სხეული), შესდგება მრავალი კარგად განსხვავებული სისტემებისგან. სისტემის სირთულე იზრდება მასში შემავალი ატომების რიცხვის ზრდასთან ერთად (ნახ.7). დღესდღეობით შეუძლებელია წინასწარ აღიწეროს ორგანიზმის ქცევა ატომების ინდივიდუალურ მახასიათებლებზე დაყრდნობით. ამის მიღწევა შესაძლებელია მხოლოდ იმ შემთხვევაში, როცა ზემოთხსენებულ ჯაჭვს დაეყოფთ ნაწილებად და შევისწავლით მაგალითად როგორ არის ბიომოლეკულების თვისებები დამოკიდებული მისი შემადგენელი სტანდარტული ბლოკების თვისებებზე [84]. ზემოთ მოცემული თვალსაზრისით როგორ დავახასიათოთ დაავადება? ვინაიდან დღესდღეობით ქსოვილის მდგომარეობის დახასიათების ყველაზე სარწმუნო მეთოდი ჰისტოლოგიაა, ამიტომ ქსოვილის მდგომარეობების შესწავლა მისი შემადგენელი ნაწილების შესწავლით უნდა დაიწყოთ. რის შედეგადაც უნდა მივიღოთ ქსოვილის მდგომარეობის დამახასიათებელი ფიზიკური სიდიდეები და უნდა ვეძებოთ ჩვენი კვლევების შედეგების კორელაცია ჰისტოლოგიასთან.





ნახ. 7. ატომებიდან ორგანიზმისაკენ [84].

ლაზერულ-ოპტიკური სპექტროსკოპია ერთ-ერთი ყველაზე წარმატებული მეთოდია, რომელიც იძლევა ინფორმაციას ატომიდან ორგანიზმამდე ჯაჭვის ნებისმიერ ბლოკზე [10,84,85,86]. ამიტომ ნივთიერების შემადგენლობის შესახებ მიღებული ინფორმაცია სხვადასხვა მასშტაბისაა მიკროსკოპული დონიდან დაწყებული და მაკროსკოპული დონით დამთავრებული. ამგვარად როდესაც სპექტროსკოპიას ვიყენებთ, როგორც ადამიანის ქსოვილების შესასწავლ ინსტრუმენტს, აღმოჩნდება რომ ინფორმაცია მოლეკულურიდან ქსოვილურ დონემდე დამოკიდებულია იმ მეთოდის სპეციფიკაზე, რომელსაც გამოვიყენებთ [87].

ვინაიდან დაავადების განვითარება კომპლექსური პროცესია, და ქსოვილში ის იწვევს მთელი რიგი ფიზიოლოგიური და მორფოლოგიური ხასიათის ცვლილებებს, გონივრულია ვივარაუდოთ, რომ თუ სპექტროსკოპიის რამოდენიმე შესაბამისი მოდალობის (აქ, სამედიცინო ხასიათის ინფორმაციის მოპოვების ხერხი) კომბინაციას გამოვიყენებთ, ის საშუალებას მოგვცემს მივიღოთ სრულყოფილი ინფორმაცია ბიოლოგიური ქსოვილის მდგომარეობის შესახებ, რაც ზრდის ჩვენს შესაძლებლობებს აღმოვაჩინოთ დაავადება განვითარების ნებისმიერ ადრეულ სტადიაზე. სამი ერთმანეთისაგან განსხვავებული სპექტროსკოპიული მეთოდის კომბინაციის გამოყენება უზრუნველყოფს ამ მიზნების შესრულებას. ეს მეთოდებია: საკუთარი ფლუორესცენციის

სპექტროსკოპია (IFS), დიფუზიური გაბნევის სპექტროსკოპია (DRS) და სინათლის გაბნევის სპექტროსკოპია (LSS). ცხადია, თუ IFS იკვლევს ბიოქსოვილის ბიოქიმიურ მახასიათებლებს, როგორებიცაა პროტეინების შემცველობა და მეტაბოლური მდგომარეობა, DRS იკვლევს შემაერთებელი ქსოვილის გაბნევისა და შთანთქმის თავისებურებებს, ხოლო LSS კი მგრძნობიარე ეპითელური უჯრედების მორფოლოგიისა და ბირთვებში ქრომატინის შემცველობის მიმართ. ამ ინფორმაციის რაოდენობრივი ფორმით მისაღებად, მნიშვნელოვანია სინათლის და ქსოვილის ურთიერთქმედების დეტალური განხილვა და შესაბამისი მოდელების შექმნა, სრულყოფა და გამოყენება [87].

### **2.2.1. ურთიერთქმედების მოდელის შესახებ**

საზოგადოდ, როდესაც ვსაუბრობთ სინათლისა და ნივთიერების ურთიერთქმედებაზე, საჭიროა ამ პროცესების განხილვა მკაცრად კვანტური პოზიციებიდან [88,89]. ამის მიუხედავად ზოგ შემთხვევებში შესაძლებელია ამ პროცესების განხილვისას გვერდი აუაროთ კვანტურ მიდგომას და გამოვიყენოთ ნახევრად-კლასიკური [90] ან სრულად კლასიკური მიახლოება [19,54,60,91]. ნახევრად-კლასიკური მიდგომისას, სინათლე აღწერილია კლასიკურად, ხოლო ნივთიერება – კვანტურ-მექანიკურად. სრულად კლასიკურ შემთხვევაში, ორივე აღიწერება, როგორც კლასიკური ობიექტები. ამის გარდა, სრულად კლასიკური აღწერის პირობებში სინათლე შესაძლებელია განვიხილოთ, როგორც კლასიკური ნაწილაკების, ანუ “კლასიკური ფოტონების” ნაკადი. განვიხილოთ უფრო დეტალურად *ფოტონები* → *კლასიკური ნაწილაკები* გადასვლა ლაზერებისთვის [90] და ოპტიკური გამოსხივების სითბური წყაროებისათვის.

მკაცრად კვანტური თვალთახედვით სინათლის ელექტრომაგნიტური ტალღის ელექტრული და მაგნიტური ველები კვანტურ ოპერატორებს წარმოადგენენ და არა მხოლოდ დროისა და სივრცის ფუნქციებს. კარგადაა ცნობილი, რომ როდესაც ატომური სისტემა შთანთქავს სინათლის კვანტს, ეს ოპერატორი გადასვლის ამპლიტუდაში შეიცავს  $(n_{k\alpha})^{1/2}$  ფაქტორს. კვანტის გამოსხივებას  $(n_{k\alpha} + 1)^{1/2}$  ფაქტორი წარმოადგენს. სადაც  $n_{k\alpha}$  მოცემული რხევითი მოდელის

მიერ შთანთქმული კვანტების რაოდენობა ანუ რხევა მოცემული  $k$  ტალღური ვექტორით და  $\alpha$  პოლარიზაციით. კლასიკურ მიახლოებაში იგულისხმება, რომ პირდაპირი და შებრუნებული პროცესების მატრიცული ელემენტები ერთმანეთის ტოლია. შესაბამისად ელექტრომაგნიტური ველი შესაძლებელია განვიხილოთ კლასიკურად, თუ  $n_{k\alpha} \gg 1$ . აღსანიშნავია, რომ ეს პირობა ძალაშია მხოლოდ მაშინ, როდესაც ოსცილატორი იმყოფება კოჰერენტულ მდგომარეობაში, რაც ლაზერის გამოსხივების პრიორიტეტული თვისებაა. ამიტომ  $n_{k\alpha} \gg 1$  პირობა შეიძლება გამოყენებულ იქნას იმ ელექტრული ველის დაძაბულობის იმ ზღვრული მნიშვნელობის მოსაძებნათ, რომლის შემდეგაც ლაზერული გამოსხივების ელექტრული ველი შესაძლებელია განვიხილოთ, როგორც კლასიკური.

ლაზერულ რეზონატორში შეიძლება არსებობდეს განსაზღვრული ენერჯისა  $\hbar\omega$  და განსაზღვრული ენერგეტიკული ინტერვალის  $\hbar\Delta\omega$  მქონე ფოტონები. თუ შევაფასებთ ველში ოსცილტორების რაოდენობას, მივიღებთ  $\Delta k / (2\hbar)^3 \sim \omega^2 \Delta\omega / c^3$ . იგულისხმება, რომ თითოეული ოსცილატორი ასხივებს ერთი და იგივე რაოდენობის კვანტებს,  $n_{k\alpha}$ , და რომ ყოველი კვანტის ენერჯია არის  $\hbar\omega$ . ამრიგად რეზონატორის ერთეული მოცულობის სრული ენერჯია  $n_{k\alpha} \hbar\omega^3 \Delta\omega / c^3$ -ის ტოლია. მეორეს მხრივ, კლასიკური მიდგომის თანახმად ეს სიდიდე შეგვიძლია შევაფასოთ როგორც  $E^2$ . ამიტომ  $n_{k\alpha} \gg 1$  პირობა ექვივალენტურია ტალღის ელექტრული ველის დაძაბულობაზე დადებული  $E \gg (\hbar\omega^3 \Delta\omega / c^3)^{1/2} \sim (\hbar c \Delta\lambda / \lambda^5)^{1/2}$  პირობისა, სადაც  $\lambda$  ლაზერის გამოსხივების ტალღის სიგრძეა, ხოლო  $\Delta\lambda$  გამოსხივების სპექტრის ხაზის სიგანეა. ლაზერისა ტიპური გამოსხივებისათვის  $\lambda = 500\text{nm}$ -ს, ხოლო  $\Delta\lambda \sim 0.01\text{nm}$ -ს, საიდანაც ვიღებთ ნახევრადკლასიკურობის პირობას:  $E \gg 1 \text{ V/cm}$ . მეორეს მხრივ ელექტრული ველის დაძაბულობა და გამოსხივების ინტენსივობა  $I$  გამოსახული  $[W/cm^2]$  ერთეულებში დაკავშირებულია შემდეგი თანაფარდობებით:

$$E[V/cm] = 27 \sqrt{I}$$

$$E[V/cm] = 19 \sqrt{I}$$

სადაც ფაქტორები 27 და 19 მოცემულია წრფივი და წრიული პოლარიზაციებისათვის შესაბამისად. ცხადია, რომ ნახევრადკლასიკურობის პირობა ( $E \gg 1 V/cm$ ) სრულდება უმრავლესი ექსპერიმენტის დროს და ლაზერის როგორც სინათლის წყაროს კვანტური მახასიათებლები თავს არ იჩენენ იმ კონკრეტული შემთხვევების გარდა თუ არ გვანტერესებს ლაზერის ხმაურის პარამეტრები და ან არ ვმუშაობთ გენერაციის ზღვრის უშუალო მახლობლობაში.

ბიოლოგიურ ქსოვილზე პირდაპირი ლაზერული გამოსხივების ზემოქმედება, გამოსხივების მაღალი კოჰერენტულობის გამო ინტერფერენციულ ეფექტებს იწვევს. კერძოდ, წარმოიქმნება სპეკლ-სტრუქტურები [92], როგორც არეკვლილ გამოსხივებაში, ასევე ქსოვილის შიგნითაც [93].

ქსოვილების სპექტროსკოპიაში ჩატარებულ უმრავლეს ექსპერიმენტებში დასხივებას ქსოვილის ზედაპირზე “უკიდურესად” მრავალმოდინანი ოპტიკურ-ბოჭკოვანი შექმტარებით ახორციელებენ [6]. ვინაიდან შექმტარი ბოჭკო უკიდურესად მრავალმოდინანია, ლაზერის სინათლის სივრცითი და დროითი კოჰერენტულობით გამოწვეული სპეკლ-სტრუქტურა აღარ ვლინდება, ანუ უფრო მკაცრად – ის ნაკლებადაა გამოკვეთილი. შესაბამისად, ამ შემთხვევაში, ლაზერული გამოსხივება უმნიშვნელოდ განსხვავდება არაკოჰერენტული წყაროებისაგან ოპტიკური ზონდის გამოსავალზე და ვინაიდან  $n_{k\alpha} \gg 1$  პირობა შესრულებულია და ლაზერული გამოსხივება ბიოლოგიური ქსოვილის ნაწილაკების დიდი რაოდენობასთან ურთიერთქმედებს, მაშინ შესაძლებელია ამ ურთიერთქმედების მოდელირება კლასიკური სტატისტიკური ფიზიკის მეთოდებით [19,54,60,91] სადაც ფოტონები უკვე კლასიკურ ნაწილაკებად განიხილება. ეს ეხება ორივე შემთხვევას, როგორც ლაზერულ გამოსხივებას, ისე სითბური სახის ოპტიკურ წყაროებსაც, რომლებიც თავისი ბუნებით არაკოჰერენტულებია.

აქედან მოყოლებული განვიხილავთ ფოტონის მიგრაციის პროცესებს ბიოლოგიურ ქსოვილებში, სადაც უგულებელვყოფილია სინათლის ინტერფერენციული ეფექტები.

გამოსხივებისა და ქსოვილის ურთიერთქმედების დასახასიათებლად, საჭიროა კორექტულად შევარჩიოთ ძირითადი ფიზიკური სიდიდეები და მათი საშუალებით ავაგოთ ურთიერთქმედების კორექტული მოდელი.

### **2.2.2. ბიოლოგიური ქსოვილის სინათლესთან ურთიერთქმედების მახასიათებელი ძირითადი სიდიდეები**

სტატისტიკური მიდგომისას ქსოვილი განიხილება, როგორც არამეტაბოლური, პასიური, შემთხვევითი, მღვრიე გარემო, რომელიც შესდგება არაგამბნევი და არამშთანთქმელ გარემოში განაწილებული დისკრეტული გამბნევი და მშთანთქმელი ცენტრებისაგან. შთანთქმა (გაბნევა) მიიღება შთანთქმის (გაბნევის) კვეთის ნამრავლით მშთანთქმელების (გამბნევეების) სიმკვრივეზე [21]. ამგვარად არის განმარტებული შთანთქმის  $\mu_a$  და გაბნევის  $\mu_s$  კოეფიციენტები. ამგვარად  $N$  ( $M$ ) ტიპის მშთანთქმელებისათვის (ან გამბნევეებისათვის) შთანთქმისა და გაბნევის კოეფიციენტები განიმარტება შემდეგნაირად:

$$\mu_a = \sum_{i=1}^N \mu_{a,i}, \quad \mu_s = \sum_{j=1}^M \mu_{s,j}, \quad (19)$$

სადაც  $\mu_{a,i} = N_i \sigma_{a,i}$ ,  $N_i$  არის  $i$  ტიპის მშთანთქმელების სიმკვრივე და  $\sigma_{a,i}$  არის შესაბამისი შთანთქმის კვეთი;  $\mu_{s,j} = M_j \sigma_{s,j}$ ,  $M_j$  არის  $j$  ტიპის გამბნევეების სიმკვრივე და  $\sigma_{s,j}$  არის შესაბამისი გაბნევის კვეთი.

მას შემდეგ რაც განვმარტეთ შთანთქმისა და გაბნევის კოეფიციენტები, შეგვიძლია განვიხილოთ თუ როგორ რეაგირებს ქსოვილი ფოტონების ზეგავლენაზე. ვთქვათ ქსოვილი სხივდება გადაწყობადი უწყვეტი ლაზერით. როდესაც ლაზერის ტალღის სიგრძე დაემთხვევა მშთანთქმელი მოლეკულის გადასვლას, ფოტონის თავისუფალი განარბენის  $\ell$  მანძილზე შთანთქმული ფოტონების რაოდენობა იქნება

$$n_{ax} = n_x p_{ax} \quad (20)$$

სადაც

$$p_{ax} = 1 - \exp(-\mu_{ax}\ell) \quad (21)$$

აქ  $n_x$  ლაზერის ფოტონების დაჯახებათა რიცხვი 1 წამის განმავლობაში და  $p_a$  არის ფოტონის შთანთქმის ალბათობა  $\ell$  მანძილზე 1 წამის განმავლობაში [10]. ანალოგიური გზით შეიძლება განისაზღვროს ქსოვილში  $\ell$  მანძილის გავლისას ფოტონის გაბნევის ალბათობა რომელიც ასე შეიძლება გამოისახოს:

$$p_{sx} = 1 - \exp(-\mu_{sx}\ell) \quad (22)$$

შთანთქმის პროცესის შემდგომ ქსოვილის აღზნებული მოლეკულა ან ფოტონს ასხივებს (ფლუორესცენცია), ან ენერგიის დისიპაციის შედეგად ქსოვილს ათბობს (არაგამოსხივებითი პროცესი). მოლეკულების აღზნებული დონიდან, 1 წამში, გამოსხივებული ფოტონების რაოდენობა არის

$$n_{xm} = n_{ax} \phi_{xm} \quad (23a)$$

სადაც  $\phi_{xm}$  კვანტურ გამოსავალს აღნიშნავს. ეს იმას ნიშნავს, რომ ფლუოროფორის მიერ შთანთქმული ყოველი ფოტონი გენერირებს  $\phi_{xm} = n_m/n_{ax}$  ფლუორესცენციულ ფოტონს. მეორეს მხრივ,  $\phi_{xm} = A_m/(A_m + R)$ , სადაც  $A_m$  აღნიშნავს ყველა სპონტანური გადასვლის სიჩქარეს და  $R$  კი აღნიშნავს არაგამოსხივებითი გადასვლების სიჩქარეს. (23a) გამოსახულების ორივე მხარის  $h\nu_m/h\nu_x$ -ზე გამრავლებით და (20) გამოსახულების გათვალისწინებით მარტივად მივიღებთ გამოსახულებას საკუთარი ფლუორესცენციისათვის

$$I_{xm} = (I_x/h\nu_x) p_a \phi_{xm} h\nu_m \quad (23b)$$

ან (21)-ის ჩასმით (23b)-ში მივიღებთ

$$I_{xm} = (I_x/h\nu_x) [1 - \exp(-\mu_{ax}l)]\phi_{xm}h\nu_m \quad (24a)$$

შემდეგში  $I_x \equiv I_x(0)$ . თუ  $\mu_{ax}l \ll 1$ , და  $\exp(-\mu_{ax}l) \approx 1 - \mu_{ax}l$ , და (24a)-დან მივიღებთ

$$I_{xm} = (I_x/h\nu_x) \mu_{ax}l\phi_{xm}h\nu_m \quad (24b)$$

გამოსახულებას საკუთარი ლუმინესცენციისათვის, რომელიც სამართლიანია თხელი, გამჭვირვალე გარემოსათვის.

ახლა განვიხილოთ ფოტონის და ქსოვილის ურთიერთქმედება ფლუორესცენციის არარსებობის პირობებში. ამ შემთხვევაში ურთიერთქმედების სრული ალბათობა  $P_{total}$ , არის სამი ურთიერთდამოუკიდებელი პროცესის ჯამი. ესენია შთანთქმის (21), გაბნევის (22) და ურთიერთქმედების არარსებობის ალბათობების ჯამი:

$$P_{total} = p_{ax} + p_{sx} + p_{no} = 1 \quad (25)$$

სადაც  $p_{no}$  არის ალბათობა იმისა, რომ ადგილი არ აქვს არც შთანთქმის და არც გაბნევის აქტებს. თუ (21) და (22) გამოსახულებებს ტეილორის მწკრივად გავშლით და დაუშვებთ, რომ  $\mu_{ax}l, \mu_{sx}l \rightarrow 0$ , მაშინ

$$p_{ax} \approx \mu_{ax}l \rightarrow 0 \quad (26)$$

$$p_{sx} \approx \mu_{sx}l \rightarrow 0 \quad (27)$$

და ამიტომ (25)-დან გამომდინარეობს, რომ  $p_{no} \rightarrow 1$ . ეს კი იმას ნიშნავს, რომ ქსოვილში შესული ფოტონი თავისუფლად მოძრაობდა.

თავისუფალი განარბენის გავლის შემდეგ  $\ell = \frac{1}{\mu_{tx}} \equiv \frac{1}{\mu_{ax} + \mu_{sx}}$ , (25)-დან გამომდინარეობს, რომ  $p_n \rightarrow 0$  და ფოტონი იწეებს ქსოვილის ნაწილაკთან ერთიერთქმედებას. ამ შემთხვევაში მას აქვს გარკვეული ალბათობა იმისა, რომ შთაინთქას:

$$p_{ax} = \frac{\mu_{ax}}{\mu_{ax} + \mu_{sx}} = \frac{\mu_{ax}}{\mu_{tx}} \quad (28)$$

და ასევე გარკვეული ალბათობა იმისა, რომ გაიბნას:

$$p_s = \frac{\mu_{sx}}{\mu_{ax} + \mu_{sx}} = \frac{\mu_{sx}}{\mu_{tx}} \quad (29)$$

ზემოთ შემოთავაზებულ მიდგომაში ფოტონი მცირდება თავის წონაში ქსოვილში ყოველი ერთიერთქმედების ალბათობით [91]. ფოტონის ახალი წონა ტოლია ფოტონის ძველი წონისა და  $(1 - \mu_{ax}/\mu_{tx}) = \mu_{sx}/\mu_{tx} = a_x$  კოეფიციენტის ნამრავლის, სადაც  $a_x$  არის ალბედო. გაბნევის აქტის შემდეგ ფოტონი განაგრძობს მოძრაობას მიმართულებით, რომელსაც განსაზღვრავს ფაზური ფუნქცია და ეს გრძელდება მომდევნო ერთიერთქმედებამდე ქსოვილის შიგნით.

როგორც ვხედავთ ქსოვილის ოპტიკური თვისებების კიდევ ერთი მახასიათებელია ფაზური ფუნქცია. ყოველი გაბნევის აქტის შემდეგ ფოტონი იცვლის თავის მოძრაობის მიმართულებას კუთხით, რომელიც არის ნაწილაკის ფორმის, ზომის და მისი ორიენტაციის ფუნქცია. იგი ასევე დამოკიდებულია დაცემილი სინათლის ტალღის სიგრძეზე. ზოგადად, ყოველ ნაწილაკს ექნება განსხვავებული გაბნევის ინდიკატრისა. ამ გაბნევის ინდიკატრისას ფაზური ფუნქცია ეწოდება. ვინაიდან, ზოგადად ფაზური ფუნქცია განსხვავებულია ნაწილაკიდან ნაწილაკამდე, ამიტომ გაბნევის პროცესების ძირითადი თავისებურებების ადეკვატურად აღსაწერად, სიმარტივისათვის, ხმარობენ საშუალო ფაზურ ფუნქციას. საშუალო ფაზური ფუნქცია შემოსაზღვრულია პირობით, რომ ერთი მიმართულებიდან მეორე



მიმართულებით გაბნევის ალბათობა არის მხოლოდ ამ მიმართულებებს შორის კუთხის ფუნქცია  $p(\theta)$ :

$$p(\theta) = \frac{\sum_{j=1}^M p_j(\theta) \mu_{s,j}}{\sum_{j=1}^M \mu_{s,j}} \quad (30)$$

ვინაიდან ქსოვილის ფაზური ფუნქცია არ არის იზოტროპული, ამიტომ ფაზური ფუნქციის ანიზოტროპიის ზომის აღსაწერად იყენებენ პარამეტრს, რომელსაც ქვია საშუალო კოსინუსი (პირველი მომენტი). ეს პარამეტრი ხშირად აღინიშნება  $g$ -თი და განისაზღვრება, როგორც ფაზის ფუნქციის ინტეგრალი ყველა კუთხით გამრავლებული კუთხის კოსინუსზე

$$g \equiv \langle \cos \theta \rangle = \int p(\theta) \cos \theta \, d\theta, \quad (31)$$

სადაც  $\theta$  აღნიშნავს სივრცულ კუთხეს.

ახლა ჩვენ უკვე გაგვაჩნია ის ყველა ძირითადი სიდიდე, რომელთა საშუალებითაც შეგვიძლია აღვწეროთ ლაზერული გამოსხივებისა და ბიოლოგიური ქსოვილის ურთიერთქმედება სტატისტიკურ მიახლოებაში.

### **2.2.3. ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენცია (LIF)**

როგორც ვიცით, როდესაც გამომსხივებელი გარემო გამჭვირვალეა მაშინ ფლუორესცენციის სპექტრი (24) გამოსახულებებით აღიწერება. ახლა განიხილოთ ფლუორესცენცია ძლიერად გამბნევე და მშთანთქმელ გარემოში. ზოგადად გაბნევასაც და მთანთქმასაც შეუძლია საკუთარი ფლუორესცენციის სპექტრი შეცვალოს. გამონაკლისს მხოლოდ ის შემთხვევა წარმოადგენს როდესაც საკუთარი ფლუორესცენცია მხოლოდ ერთი სახის ფლუოროფორის გამოსხივებით მიიღება. ვინაიდან გაბნევის კოეფიციენტი 300-700nm დიაპაზონში ტალღის სიგრძეზე სუსტადაა

დამოკიდებული, ამიტომ გამბნევების კონცენტრაციის ცვლილება საკუთარი ლუმინესცენციის სიგნალის მხოლოდ ამპლიტუდას შეცვლის, ხოლო სპექტრალური ხაზის ფორმას კი უცვლელს დატოვებს.

მღვრიე გარემოში საკუთარი ფლუორესცენციის სპექტრი რომ მივიღოთ ამისათვის გაზომილი სპექტრის “გაწმენდის” გარკვეული პროცედურა უნდა შევიძუშაოთ.

ავლნიშნოთ ქსვილის გაზომილი ფლუორესცენცია როგორც  $F_{xm}^{\det}$  და ის წარმოვადგინოთ შემდეგი სახით

$$F_{xm}^{\det} = M(\lambda_x, \lambda_m) I_{xm}^{\det}. \quad (32a)$$

ამ გამოსახულებაში  $I_{xm}^{\det}$  გაზომილი საკუთარი ფლუორესცენციის ინტენსივობაა. “det” ნიშანი “დეტექტორს” აღნიშნავს. ამ სახით წარმოდგენილი ინტენსივობები (24) გამოსახულებისაგან გასხვავებით *პირობით ერთეულებში* (arbitrary units) იზომება. (32a) გამოსახულების მარჯვენა ნაწილში წარმოდგენილი  $M(\lambda_x, \lambda_m)$  ფუნქცია საკუთარი ფლუორესცენციის სპექტრს სახეს უცვლის (ახდენს მოდიფიკაციას). მისი ცხადი სახე დამოკიდებულია ქსვილში არსებულ მშთანთქმელებსა და გამბნევებზე და მათ კონცენტრაციებზე.

თუ ფლუორესცენციის სიგნალის ფორმირებაში რამოდენიმე დამოუკიდებელი ფლუოროფორი იღებს მონაწილეობას, მაშინ

$$F_{xm}^{\det} = M(\lambda_x, \lambda_m) \sum_i I_{xm}^{\det}(i), \quad (32b)$$

ხოლო გამოსხივების სპექტრი კი ასე ჩაწერება

$$\sum_m F_{xm}^{\det} = \sum_{m^{\min}}^{m^{\max}} M(\lambda_x, \lambda_m) \sum_i I_{xm_i}^{\det}(i), \quad (32c)$$

$$S_x^{\text{det}} = M(\lambda_x) \sum_i S_x^{\text{det}}(i), \quad (32d)$$

სადაც  $S$  სპექტრს აღნიშნავს.

(32) განტოლებები წარმოადგენენ ბიოლოგიური ქსოვილის ოპტიკურად/ლაზერით აღზნებული ფლუორესცენციის ძირითად განტოლებებს 300-700nm-ის დიაპაზონში. ამ სახით მათი ჩაწერის სამართლიანობა დასაბუთებულ იქნა [19,54,91,60] ნაშრომების სერიაში. მათი საშუალებით ხორციელდება ქსოვილის მდგომარეობის დადგენა: საკუთარი ფლუორესცენციის ნაწილი,  $\sum_i I_{xm}(i)$ , განსაზღვრავს ფლუოროფორების კონცენტრაციებს, ხოლო გარემოს ზეგავლენა აისახება მოდიფიცირების ფუნქციაში,  $M(\lambda_x, \lambda_m)$ . აქედან გამოდინარე ბიოლოგიური ქსოვილის მდგომარეობის სრულფასოვანი დადგენისათვის საკმარისია ორივე სიდიდის ცხადი სახის ცოდნა. თუმცა ხშირ შემთხვევაში ეს არ არის აუცილებელი. განვიხილოთ ეს საკითხი კერძო მაგალითზე.

დაუშვათ რომ ერთი სახის ქსოვილებში, შესაბამისი პროცედურების შედეგად ვზომავთ, ორი ფლუოროფორის კონცენტრაციებს,  $C_A$ -ს და  $C_B$ -ს. ამის შემდგომ მათ ვადარებთ ჰისტოლოგიის მონაცემებს და ვადგენთ, რომ  $(C_A, C_B)$  წყვილი შეესაბამება რაიმე პათოლოგიას. დავსვათ კითხვა, შეიძლება თუ არა მივიღეთ წინა შემთხვევაში გაკეთებულ დასკვნამდე თუ ფლუოროფორების საკუთარი ფლუორესცენციის სპექტრები და შესაბამისად მათი კონცენტრაციები უცნობია. ცხადია რომ ამის გაკეთება შეგვიძლია. მართლაც, ამ შემთხვევაში ნაცვლად  $I_{xm}^{\text{det}}(A)$  და  $I_{xm}^{\text{det}}(B)$  ვზომავთ მხოლოდ  $F_{xm}^{\text{det}}$ -ს. ვინაიდან  $(I_{xm}^{\text{det}}(A), I_{xm}^{\text{det}}(B))$ -სა და  $F_{xm}^{\text{det}}$ -ს შორის (32) თანახმად ურთიერთცალსახა დამოკიდებულებაა, შესაბამისად  $F_{xm}^{\text{det}}$ -ის საშუალებითაც შესაძლებელია დაავადებული ქსოვილის პათოლოგიის სახის განსაზღვრა. პროცედურა კი ანალოგიურია:  $F_{xm}^{\text{det}}$ -ის სპექტრები დარდება ჰისტოლოგიის მონაცემებს და დგინდება სპექტრისა და პათოლოგიის შესაბამისობა. ამ ხერხით

დიაგნოზის დასმა კიდევ უფრო სწრაფი და არანაკლებ ეფექტური მეთოდია, ვიდრე საკუთარი ფლუორესცენციით დიაგნოსტიკის მეთოდი.

#### 2.2.4. $M(\lambda_x, \lambda_m)$ -ის გამოთვლა

თუ ვივარაუდებთ [54], რომ (i) ფლუორესცენციული ფოტონების გაბნევის ანიზოტროპიის კოეფიციენტი აღმგზნები ფოტონების ანიზოტროპიის კოეფიციენტის  $g$ -ს ტოლია და (ii) შესუსტების კოეფიციენტი  $\mu_t$  აღმგზნებისა (ლაზერის) და გამოსხივების (ფლუორესცენციის) ტალღის სიგრძეებისთვის ტოლია, მაშინ ფლუორესცენციისა და აღმგზნები გამოსხივების ფოტონები ქსოვილში ერთსა და იმავე ტრაექტორიაზე იმოძრავენ. (ფოტონების მიგრაციის მოდელში ტრაექტორიას  $g$  და  $\mu_t$  განსაზღვრავს). ამ შემთხვევაში [19,60]

$$M(\lambda_x, \lambda_m) = \frac{1}{\mu_{sx}\ell} \left( \frac{R_{0x}R_{0m}}{\alpha_x\alpha_m} \right)^{1/2} \frac{R_x}{R_{0x}} \left( \frac{R_m}{R_{0m}} + \alpha_m \right), \quad (33)$$

სადაც  $R$  ქსოვილის დიფუზური არეკვლადობაა (დაცემული და არეკლილი სინათლის ინტენსივობების შეფარდება).  $\alpha = e^\beta - 1$  და  $\beta = S(1 - g)$ .  $S$  და  $\ell$  მუდმივებია სინათლის მოცემული დასხივება – შეკრების სქემისათვის. სიმბოლო “0” წარმოადგენს შესაბამის სიდიდეს როდესაც ქსოვილში არ მიმდინარეობს შთანთქმა.

მიუხედავად იმისა, რომ (33) გამოსახულებაში  $R_{0x}$ ,  $R_{0m}$ ,  $\mu_{sx}$  და  $g$  სიდიდეების მნიშვნელობები უცნობია, მათი მიღება შესაძლებელია დიფუზური არეკვლადობის ანალიტიკური გამოსახულებიდან [19,60], რომელიც Zonios-მა და თანაავტორებმა მიიღეს [62]. რაც შეეხება  $S$  და  $\ell$  სიდიდეების მნიშვნელობებს მათი მიღება, ცდის გზით, ცნობილი ოპტიკური მახასიათებლების მქონე ბიოლოგიური ქსოვილების ფანტომებით დაკალიბრებით ხორციელდება.

იმ შემთხვევაში როდესაც ქსოვილში მხოლოდ ფლუოროფორები შთანთქავენ (33) დან გამომდინარეობს, რომ

$$M(\lambda_x, \lambda_m) = \frac{1}{\mu_{sx}\ell} \left( \frac{R_{0x}R_{0m}}{\alpha_x\alpha_m} \right)^{1/2} \frac{R_x}{R_{0x}} (1 + \alpha_m). \quad (34)$$

ერთი ფლუოროფორის შემთხვევაში საკუთარი ფლუორესცენციის სპექტრალური ხაზის ფორმა პრაქტიკულად არ იცვლება, ვინაიდან (34) სუსტადაა დამოკიდებული ტალღის სიგრძეზე. სამაგიეროდ მნიშვნელოვნად იცვლება მისი ინტენსივობა გამბზევების კონცენტრაციის ცვლილებისას. ეს ყოველივე ექსპერიმენტულად დადასტურდა: (i) ნორმირებული სპექტრების შედარებამ აჩვენა, რომ საკუთარი ფლუორესცენციის ფორმა უცვლელი დარჩა 150nm-ის ტოლ სპექტრალურ უბანზე 350-700nm დიაპაზონში დაახლოებით 5%-ის სიზუსტით, (ii) გამბზევების კონცენტრაციის ცვლილებამ კი ამავე დიაპაზონში საკუთარი ფლუორესცენციის მნიშვნელოვანი ცვლილება გამოიწვია [19].

იმ შემთხვევაში თუ ფლუორესცენციის სპექტრს აღგზნები ლაზერის ტალღის სიგრძის უშუალო სიახლოვეს გაეზომავთ ( $\lambda_m \approx \lambda_x$ ), მაშინ

$$M(\lambda_m \approx \lambda_x) = \frac{R}{\mu_s\ell} \left( \frac{R}{R_0} + \alpha \right), \quad (35)$$

სადაც  $R$  და  $R_0$  ქსოვილის არეკვლადობაა შთანთქმისა და შთანთქმის გარეშე პირობებში, აღგზნების ტალღის სიგრძეზე,  $\lambda_x$ .

### 3. დასკვნა

#### 3.1. ექსპერიმენტების შედეგები და მათი განხილვა

##### 3.1.1. წინასიტყვაობა

ბოლო წლების მონაცემებით ავთვისებიანი სიმსივნით საშუალოდ წელიწადში 6.7 მილიონი ადამიანი კვდება. ეს ვითარება მკურნალობისა და დიაგნოსტიკის არსებული თანამედროვე ტექნოლოგიების განვითარებასთან ერთად ახალი ტექნოლოგიების შექმნასაც მოითხოვს. განსაკუთრებული მნიშვნელობა მიენიჭა პაციენტზე ორიენტირებული ეფექტური და ადრეული დიაგნოსტიკის ახალი ტექნოლოგიების შექმნას.

ჩვენს მიერ ჩატარებულმა წინასწარმა გამოკვლევებმა აჩვენა, რომ არსებობს ცალსახა კავშირი ბიოქსოვილის ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრის ფორმასა და პათოლოგიის სახეს შორის, რაც სიმსივნეების დიფერენციალური დიაგნოსტიკის თვისობრივად ახალ საშუალებას იძლევა. ტექნოლოგიები საშუალებას მოგვცემს განვახორციელოთ ბიოქსოვილის პათოლოგიის მყისიერი დადგენა და ქირურგიული ოპერაციების დროს გადაგვარებული არის *on-line* კონტროლი. რაც შეეხება არაინვაზიურობას იგი მიიღწევა ლაზერული გამოსხივების ნანოწამიანი იმპულსების გამოყენებით. ამ შემთხვევაში შესაძლებელია ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის საიმედოდ დაფიქსირება დასხივების მცირე დოზებით, რაც პრაქტიკულად გამორიცხავს ბიოქსოვილის გათბობას და შესაბამისად მის როგორც თერმულ, ასევე აბლაციურ დაზიანებას.

სამედიცინო პრაქტიკაში არსებული დიაგნოსტიკის ტრადიციული მეთოდები [94] როგორც წესი სერიოზული პრობლემების წინაშე დგას დიაგნოზის დასმის სიზუსტის, სისწრაფის და არაინვაზიურობის (უზიანობის) თვალსაზრისით. მართლაც, კიბოსწინა სტადიის დადგენა ძირითადად ეფუძნება საექვო არეების ვიზუალურ აღმოჩენას. რომელსაც მოსდევს ინვაზიური ბიოფსია და გარკვეული

დამუშავების შემდეგ ნიმუშის მიკროსკოპით გამოკვლევა. შესაბამისად დიაგნოზის დასმა დროში გაჭიმული პროცესია და ქსოვილის სერიოზულ დაზიანებასთანაა დაკავშირებული. ამ თვალსაზრისით ახალი მეთოდების შემუშავება კვლავაც ძალზე აქტუალურია. დღეისათვის მსოფლიოში ინტენსიურად მუშავდება ისეთი პრინციპულად ახალი დიაგნოსტიკური ტექნოლოგიები, ძირითადად ლაზერული, რომლებმაც უნდა უზრუნველყონ დიაგნოზის დასმა რეალური დროის (*on-line*) რეჟიმში, ბიოლოგიური ქსოვილის მინიმალური ან სრული დაუზიანებლობის პირობებში [16,17,95].

ლაზერული ტექნოლოგიები ყველა შემთხვევაში ეყრდნობა ნივთიერებისა და გამოსხივების ურთიერთქმედების ფუნდამენტური პროცესების უშუალო ანალიზს [96,97]. ეს პროცესებია ლაზერის გამოსხივების ერთჯერადი და მრავალჯერადი გაბნევა [33,97,98,99,100] და ლაზერის დასხივებით ბუნებრივ ფლუოროფორებში, ანუ ბიომოლეკულებსა და მათ კომპლექსებში ინდუცირებული ფლუორესცენცია [13,24,101,102,103]. შესაბამისად შესაძლებელია ერთი ან ორივე მეთოდის გამოყენება, თუმცა, ჩვენი აზრით, ამ პროცესების შესწავლა უკვე *in vitro* შემთხვევაში ავლენს იმ პრიორიტეტებს, რომლებიც საფუძვლად უნდა დაედოს ლაზერული დიაგნოსტიკის „რეალური“ (*in vivo*) და ეფექტური ტექნოლოგიებისა და შესაბამისი აპარატურის შექმნას. ბიოქსოვილებში გაბნევისა და ფლუორესცენციის პროცესების შესწავლა დიაგნოსტიკის თვალსაზრისით სხვადასხვა ინფორმაციის მატარებელია. თუ გაბნევა ძირითადად უჯრედის ბირთვების ფორმის ცვლილებაზე რეაგირებს [17,16] ფლუორესცენციის ანალიზი მაკრომოლეკულების კომპლექსების წარმოქმნასა და უჯრედში მიმდინარე ბიოქიმიურ პროცესებს ასახავს [22,104].

ბოლო წლებში განსაკუთრებით აქტიურად მუშავდება დიაგნოსტიკის ფლუორესცენციული მეთოდები [13,24,30,101,102,103,106-109]. ამ შემთხვევაში გარკვეული ტალღის სიგრძის მქონე ლაზერის გამოსხივების ზემოქმედებით ბიოქსოვილი იწყებს ფლუორესცირებას და მისი სპექტრი და ხანგრძლივობა (ულტრამოკლე იმპულსებით აღგზნებისას) განსხვავდება და დამოკიდებულია პათოლოგიის რაობაზე და მის სიმძიმეზე [24,101,109]. გარემოს „გეომეტრია“, რომელსაც ახლა

უკვე მხოლოდ ფლუორესცენციული სიგნალის გაბნევაზე შეუძლია გავლენის მოხდენა, ვერ ცვლის ამ სპექტრსა და ნათების ხანგრძლივობას [24]. ფლუორესცენციის მისაღებად მრავალფოტონური აღზნების მექანიზმის გამოყენება, რაც ლაზერის ტალღის სიგრძისა და იმპულსის ხანგრძლივობის შემცირებით მიიღწევა, ქსოვილის ღრმა ფენების დიაგნოსტიკების საშუალება იძლევა [106,107]. ამისი მიღწევა გაბნევის მეთოდით ბიოქსოვილში პრინციპულად შეუძლებელია. ყოველივე ზემოთქმულიდან უდაოა ფლუორესცენციის მეთოდის უპირატესობა გაბნევის მეთოდთან.

2004 წლიდან კიბერნეტიკის ინსტიტუტის კოჰერენტული ოპტიკისა და ელექტრონიკის განყოფილების ფიზიკოსთა ჯგუფისა (ზ. მელიქიშვილი, თ. მედოიძე და ზ. ჯალიაშვილი) და ქართულ-გერმანული სპეციალიზირებული კლინიკის ხელმძღვანელის პროფესორ კ. მარდლეიშვილის კერძო ინიციატივით, ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის გამოვლენისა და შესწავლის მიზნით, ფარისებრი ჯირკვლის სიმსივნურ ქსოვილებზე (ჩიყვი, ადენომა, კიბო) დაიგეგმა და პირველად ჩატარდა საცდელი *in vitro* ექსპერიმენტები. ამ ექსპერიმენტებმა აჩვენა ფლუორესცენციის სპექტრის ფორმ-ფაქტორის ანალიზზე დაყრდნობით დიაგნოსტიკის ახალი პერსპექტიული მეთოდი [30,108,109]. ამჟამად კიბერნეტიკის ინსტიტუტის კოჰერენტული და კვანტური ოპტიკის განყოფილების ლაბორატორიაში ტარდება საცდელი *in vitro* ექსპერიმენტები ფარისებრი ჯირკვლის სიმსივნურ ქსოვილებზე. კვლევის ობიექტს წარმოადგენს ბიოლოგიური ქსოვილების ანათლები, ასევე ბიოქიმიური და ცენტრიფუგირების მეთოდებით მიღებული საცდელი ქსოვილის ციტოპლაზმა. ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის მექანიზმების კვლევა, რომელიც ფუნდამენტური სახის სამომავლო ამოცანაა, უნდა განხორციელდეს ბიოქსოვილის უჯრედულ ფრაქციებზეც.

ბიოქსოვილების, უჯრედების და უჯრედული ფრაქციების ფლუორესცენციის სპექტრების მისაღები მოწყობილობა დეტალურადაა აღწერილი ნაშრომის 2 თავში, მაგრამ ქვემოთ მაინც მოკლედაა მოცემული ექსპერიმენტის დაყენების ძირითადი მომენტები.



ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილების ნიმუშები აღებულ იქნა 200-ზე მეტი სხვადასხვა ინდივიდისგან რამოდენიმე მილიმეტრი სისქის მთლიანი ნაჭრის სახით. ყოველი ნაჭერი იყოფოდა სამ ნაწილად, საიდანაც ერთი იგზავნებოდა ჰისტომორფოლოგიურ გამოკვლევაზე, მეორე – ბიოქიმიური დამუშავებისთვის, ხოლო მესამე – ფლუორესცენციურ გამოკვლევაზე. უკანასკნელი თავსდებოდა სპექტროსკოპიულ კვარცის კიუვეტაში და სხივდებოდა 10ns, 337nm აზოტის ლაზერის 100Hz იმპულსებით. იმპულსის ენერგია შეადგენდა 0,4mj. ქსოვილის ზედაპირზე ლაზერის სხივი ფოკუსირდებოდა 100µm დიამეტრის წერტილად. ფლუორესცენცია იკრიბებოდა ქსოვილის ფრონტალური ზედაპირიდან და შედიოდა მაღალი გარჩევისუნარიანობის მქონე ორმაგდიფრაქციულ სპექტროგრაფ/მონოქრომატორ DFS-452-ის (1200 შტრიხი/მმ) შესასვლელ ხერხელში. ოპტიკური კვარცის კიუვეტები სპეციალურად შემოწმდა, რათა ტალღის სიგრძის სამუშაო დიაპაზონში გამოგვერიცხა მათში შთანთქმისა და ფლუორესცენციის არსებობა. სპექტროგრაფის ფოტოდექტრო გამამრავლებელი მილაკიდან მიღებული ელექტრული სიგნალის “წასაკითხად” გამოიყენებოდა UNIPAN-233 სელექტიური ნანოვოლტმეტრი (პერიოდულ-გამეორებად იმპულსურ რეჟიმში მომუშავე). გამოსხივების სპექტრი რეგისტრირდებოდა 350-დან 600nm-მდე უბანში. გაზომვები ხორციელდებოდა ყოველი ნიმუშის რამოდენიმე განსხვავებულ წერტილში შედეგების გამეორებადობის უზრუნველსაყოფად. საბოლოო ინფორმაცია ციფრული სახით მუშავდება პერსონალურ კომპიუტერზე მონაცემთა დამუშავების პროგრამა ORIGIN-ის საშუალებით.

კლინიკურ პრაქტიკაში დიაგნოსტიკის პრობლემისადმი გაზრდილმა ყურადღებამ და ახალი ტექნოლოგიების გამოჩენამ მაინც ბოლომდე ვერ აღმოფხვრა ის სირთულეები, რომლებიც დაკავშირებულია დიფერენციალური დიაგნოსტიკის სიზუსტესთან. ასეთთა რიგს განეკუთვნება, მაგალითად, ფარისებრი ჯირკვლის კვანძოვანი წარმონაქმნების ხასიათისა და განსაკუთრებით კეთილთვისებიანი და ავთვისებიანი სიმსივნეების ერთმანეთისაგან ცალსახად გარჩევის პრობლემა [8]. ამ პრობლემის აქტუალობა

განპირობებულია, როგორც ფარისებრი ჯირკვლის სიმსივნეების რაოდენობის განუხრელი ზრდით, ისე იმითიც, რომ კიბო შეიძლება შეეთავსოს(შეეხამოს) ამ ორგანოს პრაქტიკულად ყველა დაავადებას (დიფუზურ ტოქსიურ ჩიყვთან, აუტოიმუნურ თირეოიდიტს და სხვ.).

ექვგარეშეა, რომ ფარისებრი ჯირკვლის სიმსივნური და არასიმსივნური ეტიოლოგიის დაავადებების ჰისტოლოგიური დიაგნოსტიკა ჯერ-ჯრობით რჩება ერთ-ერთ ძენლად გადასაწყვეტ ამოცანად.

### ***3.1.2. ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენცია ადამიანის ფარისებრი ჯირკვლის ნორმალური და პათოლოგიური უჯრედებიდან***

ფარისებრი ჯირკვლის სიმსივნეების შედეგიანი მკურნალობა დამოკიდებულია დიაგნოსტიკის სიჩქარესა და სიზუსტეზე. მაგალითისთვის, ქირურგიული ოპერაციის ჩატარებამდე დიდი მნიშვნელობა ენიჭება ადენომისა და კარცინომის დიფერენციაციას, რათა განისაზრვროს ოპერაციის ოპტიმალური სტრატეგია.

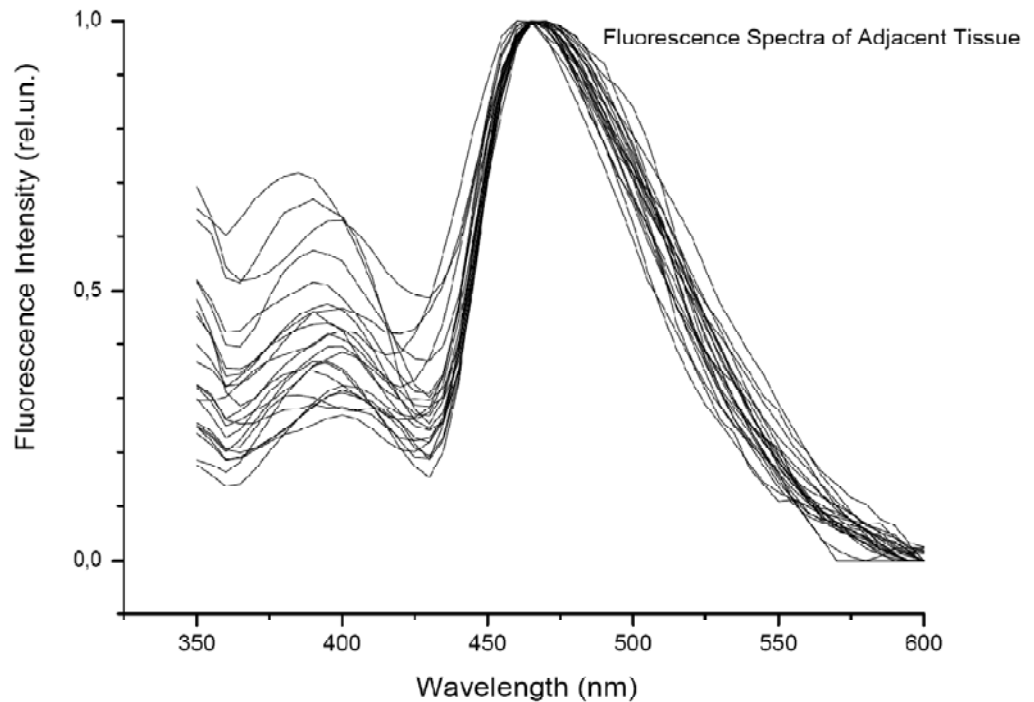
ამ პრობლემის გადასაჭრელად, ახალი მიდგომა მდგომარეობს მოწინავე ლაზერული და ოპტიკური ტექნოლოგიების გამოყენებაში. მათი საშუალებით შესაძლებელია სიმსივნეების ზუსტი, არაინვაზიური (ან მინიმალურად ინვაზიური), მყისიერი და რაც მთავარია ადრეული დიაგნოსტიკა [6,33,103,110,111,112].

ზოგადად ლაზერული სხივისა და ბიოლოგიური ქსოვილის ურთიერთქმედება იწყება ზედაპირიდან ფრენელის არეკვლით, სხივის დარჩენილი ნაწილი ვრცელდება ქსოვილში და ზოგ შემთხვევებში განიცდის დომინანტური შთანთქმის ან მრავალჯერადი გაბნევის პროცესებს, რიგ შემთხვევებში – ეს პროცესები თანაბარი ინტენსივობით მიმდინარეობს [113]. შთანთქმული ფოტონები, ბიოლოგიურ მოლეკულებში იწვევენ გამოსხივებად და არაგამოსხივებად გადასვლებს, რაც შესაბამისად ვლინდება ქსოვილის ფლუორესცენციასა და გათბობაში.

შთანთქმისა და გაბნევის პროცესებს შორის თანაფარდობა დამოკიდებულია ლაზერული გამოსხივების ტალღის სიგრძეზე და ქსოვილის ოპტიკურ თვისებებზე. ქსოვილში შთანთქმა პირდაპირ იჩენს თავს, მასში ისეთი ენდოგენური (ბუნებრივი) ფლუოროფორების არსებობით, როგორებიცაა: ტრიფტოფანი, კოლაგენი, ელასტინი, NADH, FAD, პროტოპორფირინი IX და რიბოფლავინი [103]. 350–650nm ტალღურ უბანში სისხლი არის მნიშვნელოვანი მშთანთქმელი. იგი სინათლის ენერგიას გარდაქმნის სითბურში [114]. შესაბამისად ქსოვილში გენერირებული ფლუორესცენციური ფოტონები შეიძლება შთაინთქან ნიმუშის ზედაპირისაკენ გზაში.

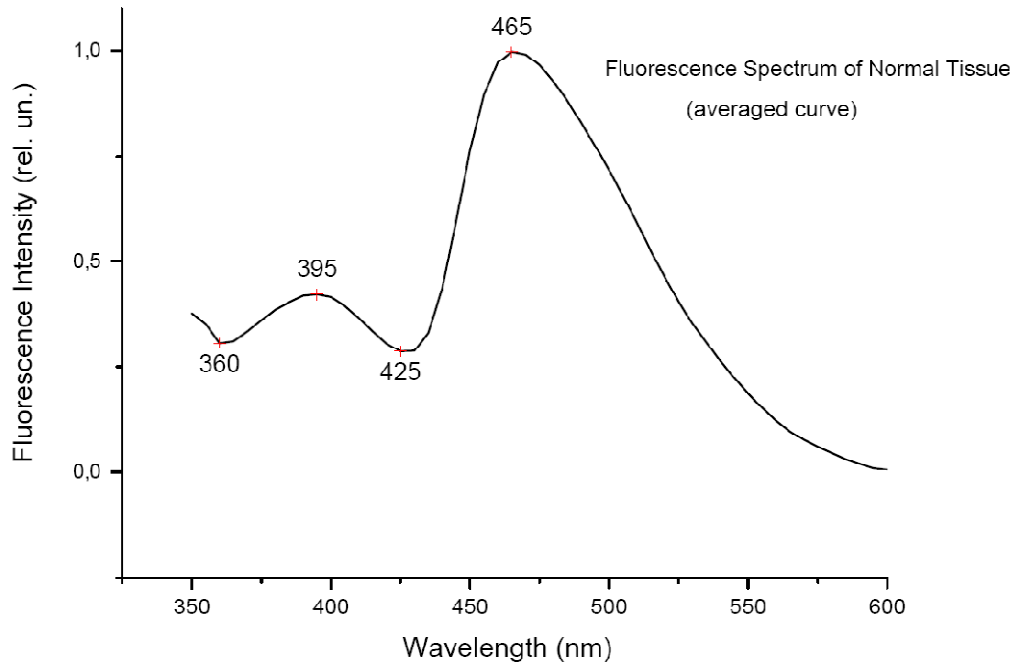
### ***3.1.3. ფარისებრი ჯირკვლის ნორმალური ქსოვილის ფლუორესცენციის სპექტრები***

ჩვენს მიერ შესრულებული ექსპერიმენტების სერიაში თითქმის ყოველთვის მოგვეპოვებოდა ე.წ. ნორმალური ქსოვილი, სინამდვილეში – პათოლოგიური ქსოვილის მიმდებარე ქსოვილი. ისევე როგორც ფარისებრი ჯირკვლის სხვადასხვა პათოლოგიების შემთხვევაში, აქაც ვაჯგუფებდით შესაბამის ფლუორესცენციის სპექტრებს. ნახ.8-ზე მოცემულია ადამიანის *ex vivo* ფარისებრი ჯირკვლის ნორმალური ქსოვილების 22 ნიმუშის 460 nm-ზე ნორმირებული სპექტრები



ნახ. 8. ადამიანის *ex vivo* ფარისებრი ჯირკვლის ნორმალური ქსოვილების 22 ნიმუშის 460 nm-ზე ნორმირებული სპექტრები

როგორც ნახ. 8.-დან ჩანს ფარისებრი ჯირკვლის ნორმალური ქსოვილების ფლუორესცენციის სპექტრების ხაზის ფორმები ძირითადად ერთმანეთს ემთხვევა. ინტენსივობების განსხვავება მხოლოდ 0,5 პირობითი ერთეულის ფარგლებშია. რაც შეეხება პიკებს – ისინი პრაქტიკულად ერთმანეთს ემთხვევა. შემდგომში სხვადასხვა პათოლოგიებთან შესადარებლად, რათქმაუნდა მოსახერხებელია ნორმალური ქსოვილის ერთი სტანდარტული სპექტრის ქონა. ამ მიზნით, ჩვენ გავასაშუალოეთ ნორმალური ქსოვილების ფლუორესცენციის სპექტრები, რაც მოცემულია ნახ. 9.-ზე. შემდგომში ყველა სხვა ნახაზში იგია გამოყენებული. ეტალონად მიჩნეული ნორმალური ქსოვილის ფლუორესცენციის სპექტრი ახალ-ახალი ექსპერიმენტების ჩატარებისას სულ უფრო და უფრო ზუსტდება უახლესი მონაცემებით. აღნიშნის ღირსია ის ფაქტი, რომ აქ მოყვანილი ეტალონური სპექტრი პრაქტიკულად აღარ განიცდის რაიმენაირ თვისობრივ ცვლილებას.



ნახ. 9. ნორმალური ქსოვილის ფლუორესცენციის გასაშუალოებული სპექტრი

### **3.1.4. ფარისებრი ჯირკვლის პათოლოგიური ქსოვილის ფლუორესცენციის სპექტრები**

ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილის ნიმუშები მიღებულ იქნა 10 სხვადასხვა ინდივიდისგან. ყველა ეს ნიმუში გამოკვლეული იქნა პისტომორფოლოგიური წესით და მიღებული იყო შემდეგი პასუხები:

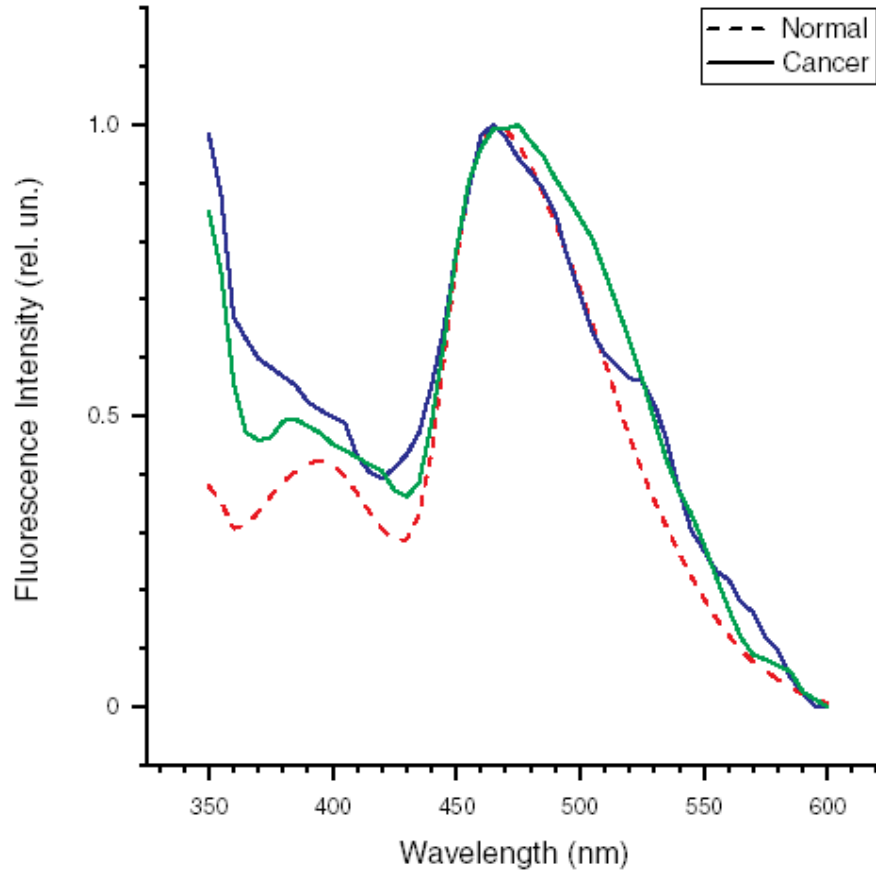
- 1) სიმსივნის მიმდებარე ნორმალური ქსოვილი;
- 2) პაპილარული კარცინომა;
- 3) მიკროფოლიკულური კარცინომა;
- 4) ფოლიკულური კარცინომა;
- 5) მიკრო და მაკროფოლიკულური ადენომა;
- 6) ფოლიკულური ადენომა.

337nm ლაზერული გამოსხივებით აღზნებული ადამიანის ფარისებრი ჯირკვლის ნორმალური და პათოლოგიური ქსოვილების ფლუორესცენციის სპექტრები მოცემულია ნახ.10–14 ზე.

პირველ რიგში განვიხილოთ ქსოვილის გამოსხივების სპექტრების ხაზის ფორმების მთავარი მახასიათებელი თვისებები. მიღებული

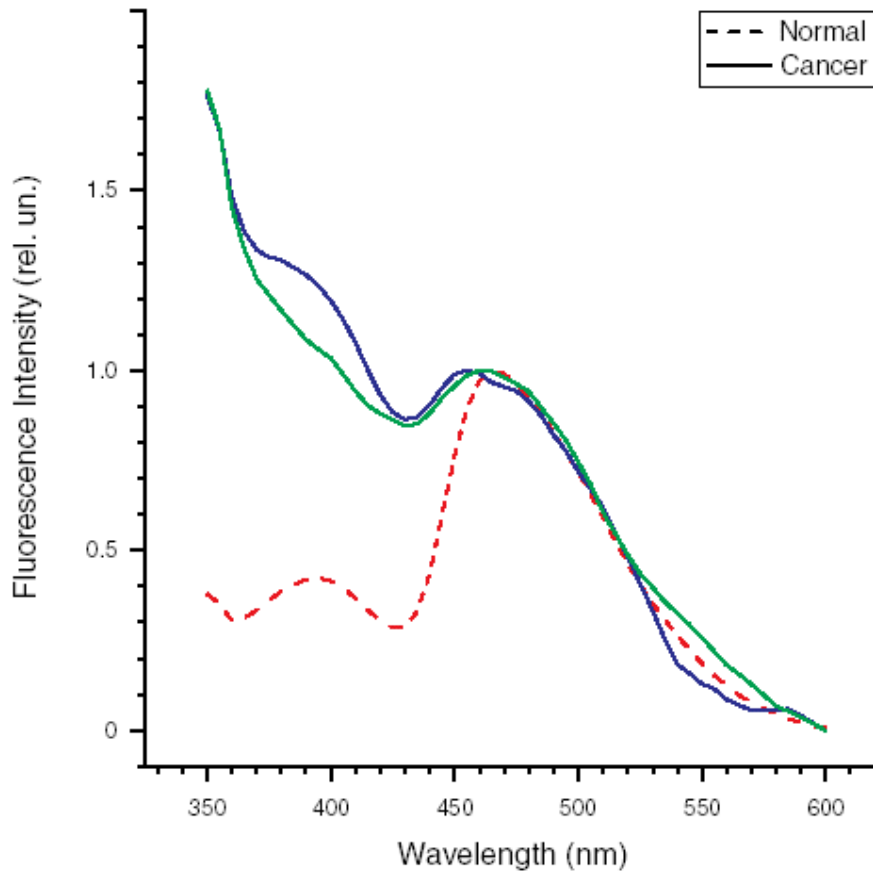
შედეგების ლიტერატურულ მონაცემებთან შედარებით შეგვიძლია დავასკვნათ, რომ ფლუორესცენცია მომდინარეობს კოლაგენიდან [115] და NADH-დან [103]. ადამიანის ორიგენიური, ნორმალური და პათოლოგიური ქსოვილის ფლუორესცენციის სპექტრალურ ხაზს აქვს შედარებით მუდმივი პიკი 465nm-ის უბანში და შედარებით ცვალებადი პიკი 395nm-ის უბანში. აქედან გამომდინარე მოსახერხებელია ფლუორესცენციის მთელი სპექტრის ნორმირება 465nm-ის შესაბამის ინტენსივობაზე ანუ ამ პიკის ერთეული ინტენსივობისთვის (ერთეულისთვის) გატოლება. ასეთი მანიპულაციის ჩატარების შემდეგ დიაგნოსტიკის მეთოდი დაიყვანება 395nm-ის პიკის ხაზის ფორმის შემოწმებაზე. აქ ჩვენ მოვახდენთ ნორმალური და დაავადებული ქსოვილების გამოსხივების ხაზის ფორმების კლასიფიკაციას ჰისტომორფოლოგიური გამოკვლევების პასუხებზე დაყრდნობით. ფაქტია, რომ ბიოლოგიური ქსოვილი კომპლექსური, რთული სისტემაა. პაციენტებს შორის იგი მნიშვნელოვანი განსხვავებებით ხასიათდება, რაც დამოკიდებულია ისეთ ცვალებად ფაქტორებზე, როგორებიცაა ასაკი, დაავადების პროგრესულობა (სტადია) და ა.შ. და რაც მნიშვნელოვნად აძნელებს ანალიზს.

ნახ.10.-ზე მოცემულია ფარისებრი ჯირკვლის ნორმალური და კიბოს (პაპილარული კარცინომა) ქსოვილის ფლუორესცენციის ტიპური სპექტრები. პაპილარული კარცინომისთვის  $I_{350} \leq I_{465}$ , სადაც I ფლუორესცენციის ინტენსივობაა. პიკი 395nm-ზე არც კი დაიმზირება.



ნახ. 10. პაპილური კარცინომის ქსოვილის ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრები. მიმდებარე ქსოვილი (წყვეტილი ხაზი); კიბოს ქსოვილი (უწყვეტი ხაზი);

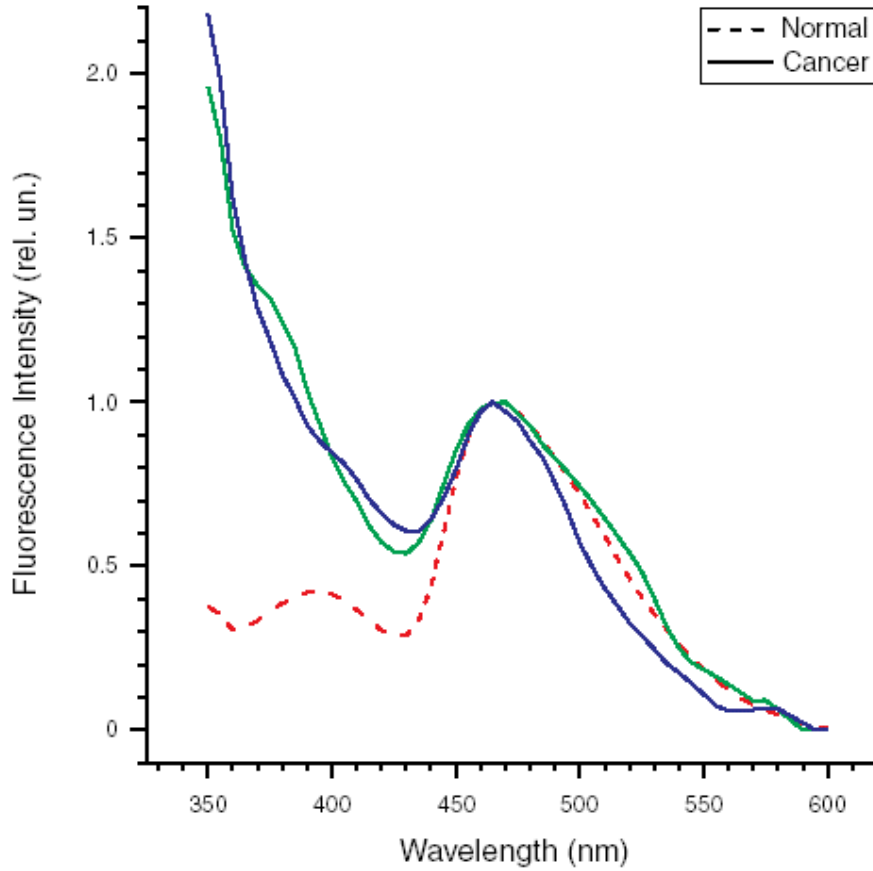
ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილის სხვა ტიპის კიბოს (მიკროფოლიკულური კარცინომა) ფლუორესცენციის სპექტრი მოცემულია ნახ.11-ზე. აქ შეიძლება შემოვიტანოთ ემპირიული თანაფარდობა  $I_{350} = K_{m.c.} I_{465}$ , სადაც  $K_{m.c.}$  დაახლოებით  $1,5 \div 2,0$ -ის ტოლია.



ნახ. 11. მიკროფოლიკულური კარცინომის ქსოვილის ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრები. მიმდებარე ქსოვილი (წვევტილი ხაზი); კიბოს ქსოვილი (უწყვეტი ხაზი);

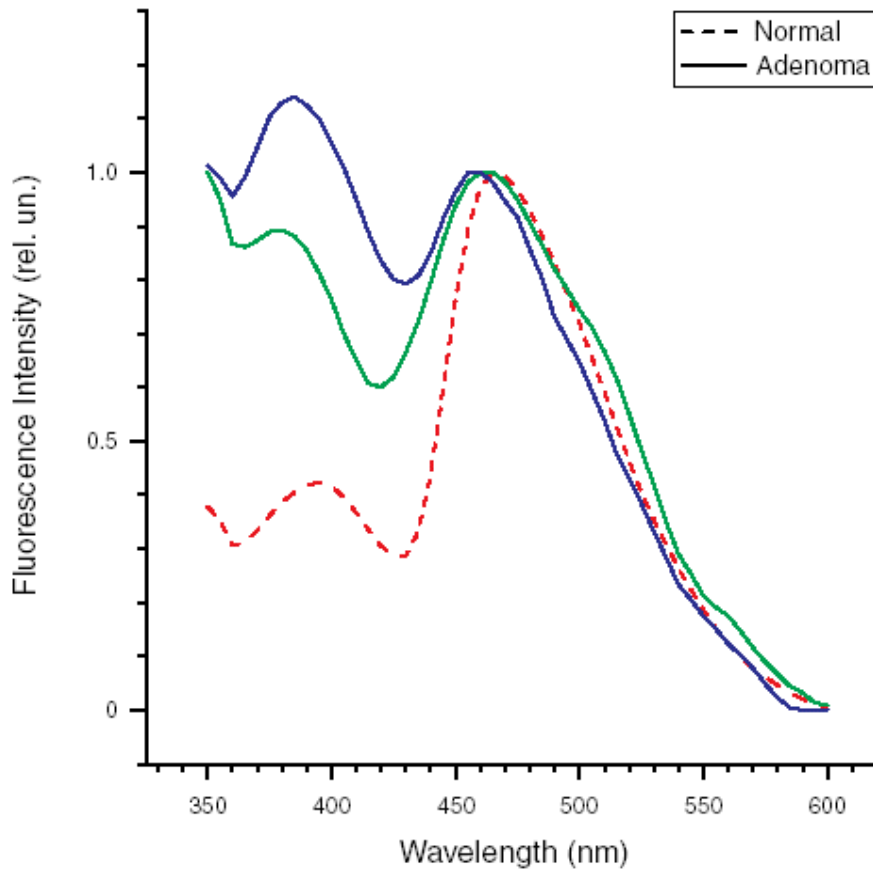
ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილის კიდევ სხვა ტიპის კიბოს (ფოლიკულური კარცინომა) ფლუორესცენციის სპექტრი მოცემულია ნახ.12-ზე. ზემოხსენებულის მაგვარ თანაფარდობას ფოლიკულური კარცინომისთვის მივიღებთ თუ  $K_{f.c.}$  კოეფიციენტს მივანიჭებთ დაახლოებით 1,9 ÷ 2,2-ის ტოლ მნიშვნელობას. 395nm პიკის მახასიათებელია უმნიშვნელო მხარი.





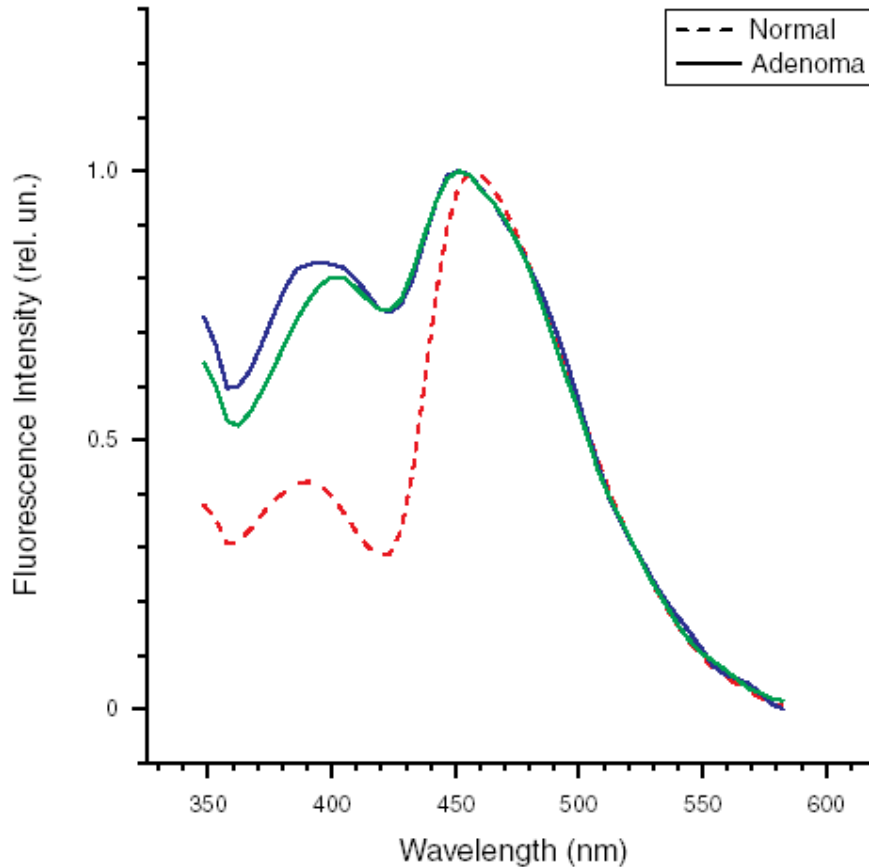
ნახ. 12. ფოლიკულური კარცინომის ქსოვილის ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრები. მიმდებარე ქსოვილი (წვეტილი ხაზი); კიბოს ქსოვილი (უწყვეტი ხაზი);

მიკრო და მაკროფოლიკულური და ფოლიკულური ადენომების სპექტრები მოცემულია ნახ.13 და ნახ.14-ზე. 395nm და 465nm ფლუორესცენციის პიკები ნათლადაა გამოსახული ორივე შემთხვევაში და  $K_{ad} \approx 0,8 \div 1,1$ .



ნახ. 13. მიკრო და მაკროფოლიკულური ადენომის ქსოვილის ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრები. მიმდებარე ქსოვილი (წვეტილი ხაზი); ადენომატოზური ქსოვილი (უწვეტი ხაზი);

ამ კვლევების მთავარი შედეგი არის ის, რომ ლაზერის აღზნებით ინდუცირებული ფლუორესცენციის მეთოდი არის ბიოქსოვილის, კერძოდ კი ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილის მდგომარეობის აღწერის მძლავრი იარაღი; დადგენილ იქნა ფარისებრი ჯირკვლის ნორმალური ქსოვილის ფლუორესცენციის სპექტრი; კიბოს და ადენომას ფლუორესცენციის სპექტრებს შორის განსხვავება კარგად ჩანს. აქედან გამომდინარე პირდაპირი მიზანი მიღწეულ იქნა: აღმოჩნდა, რომ შესაძლებელია ქსოვილის დაავადების ხარისხის (მდგომარეობის) იმავდროული შეფასება უშუალოდ ქირურგიული ოპერაციის წინ.



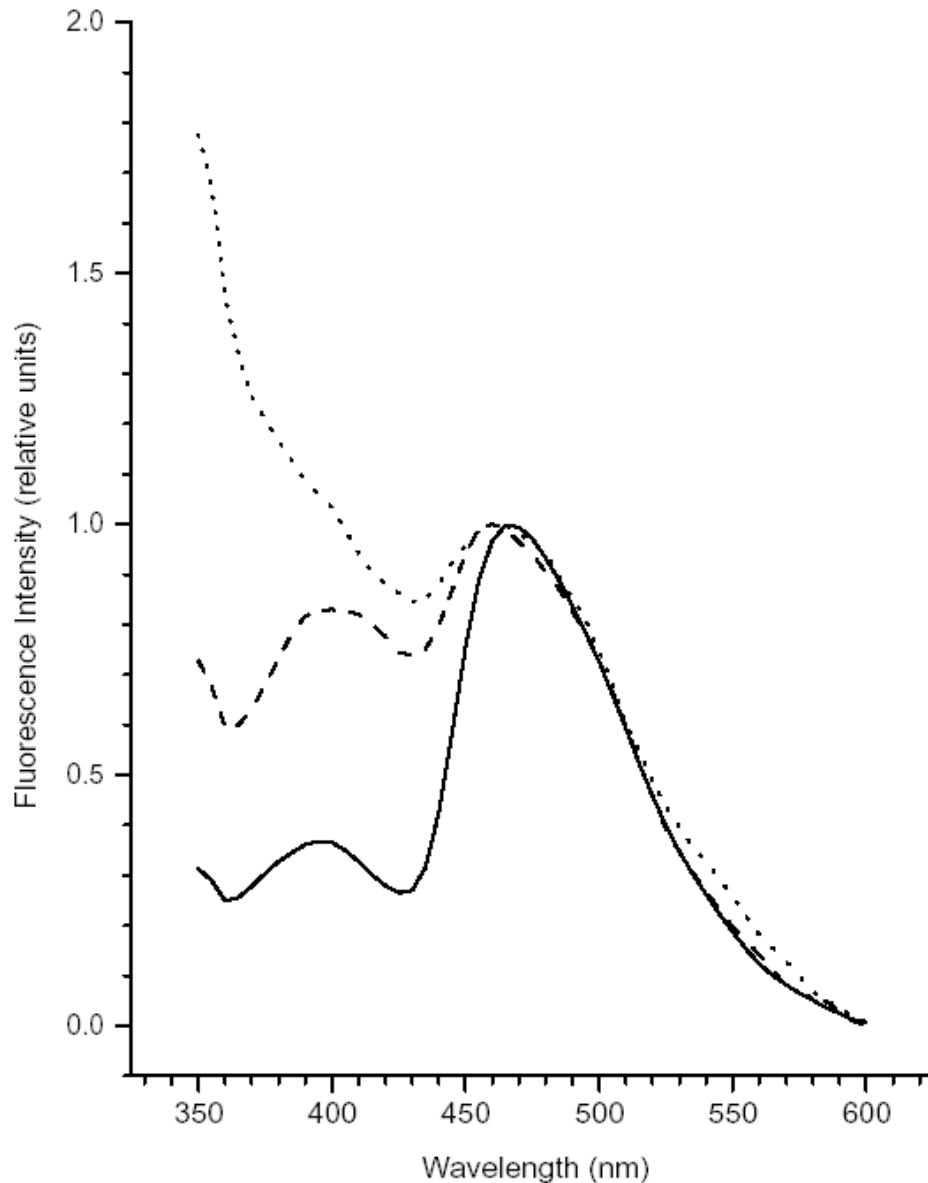
ნახ. 14. ფოლიკულური ადენომის ქსოვილის ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრები. მიმდებარე ქსოვილი (წვევტილი ხაზი); ადენომატოზური (უწვევტი ხაზი);

### 3.1.5. კორელაცია სპექტრალური ხაზის ფორმასა და ქსოვილის “გადაგვარებულობას” შორის

პრეკანცეროგენული ცვლილებების მრავალი ფორმა ძნელი დასადგენია ჩვეულებრივი ტიპის სადიაგნოსტიკო მეთოდების გამოყენებით, რომლებიც გულისხმობენ ვიზუალურად სახეშეცვლილი ორგანოებიდან მიღებული ბიოფსიური ნიმუშების გამოკვლევას ან შემთხვევით ბიოფსიურ კონტროლს [94,95]. ასეთი მეთოდები არა მარტო ხშირად არ იძლევა ცალსახა შედეგებს, არამედ ისინი აგრეთვე მოითხოვენ ძალიან დიდ დროს.

მრავალი განსხვავებული ტიპის პათოლოგიის ნიმუშების კვლევამ გამოავლინა, რომ ფლუორესცენციური გამოსხივების სპექტრს აქვს

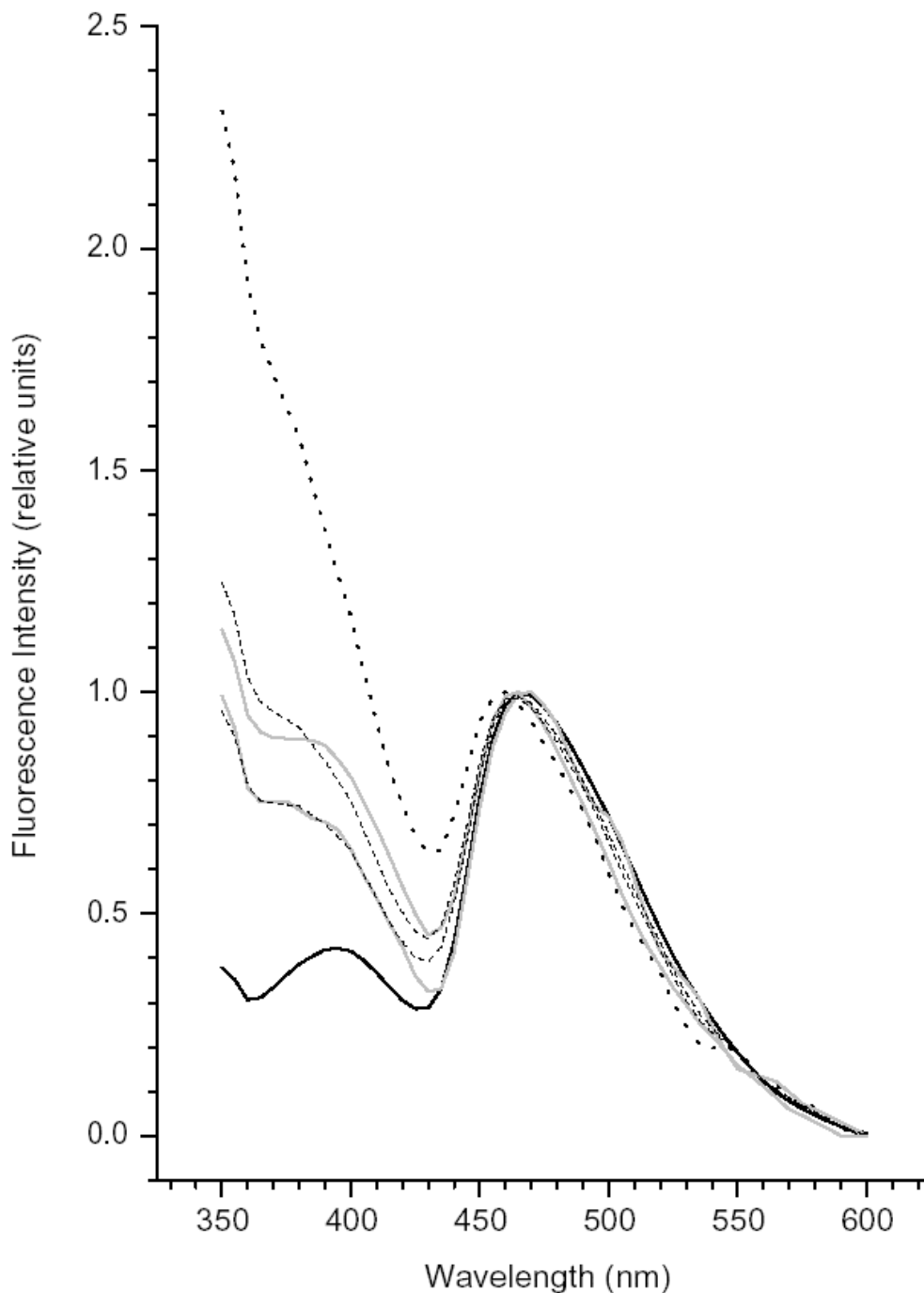
შემდეგი სამი დამახასიათებელი ნიშანი-თვისება: თითქმის უცვლელი პიკი ცენტრით 465nm-ზე, ცვალებადი ინტენსივობის პიკი ცენტრით 395nm-ზე და გადიდებული ფონი, რომელიც იწყება 420nm-თან და იზრდება მოკლეტალღოვანი მიმართულებით. ნახ.15-ზე ნაჩვენებია სამი განსხვავებული ტიპის ქსოვილის: ნორმალური, ადენომის და კიბოს სპექტრები. სპექტრები ნორმირებულია ერთი და იგივე 465nm პიკის ინტენსივობაზე. ეს ნორმირება არის არსებითი მნიშვნელობის მქონე მოქმედება ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის კვლევის მეთოდის სრული ძალით გამოყენების გზაზე.



ნახ.15 დაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრები: ნორმალური (უწყვეტი), ადენომა (წყვეტილი) და კიბოს (წერტილოვანი).

ფლუორესცენციური გამოსხივების სპექტრალური ანალიზის სადიაგნოსტიკო მეთოდად ჩამოყალიბების მიზეზი არის ის, რომ ავთვისებიან სიმსივნეებს, ადენომებს და ჯანმრთელ ქსოვილებს აქვთ მკაფიოდ გამოხატული განსხვავება ზემოთხსენებული მახასიათებელი ნიშან-თვისებების მიხედვით. კიბოს ქსოვილები დომინირებენ მზარდი ფონით, ხოლო ადენომები – 395nm-იანი პიკით.

ამის მიუხედავად შეიძლება, ძალიან უხეშად, ითქვას რომ აღენომა იძლევა ნორმალური და ავთვისებიანი სიმსივნის ქსოვილის სპექტრებს შორის მოთავსებულ შუალედურ სპექტრს. განსხვავებული სპექტრალური ხაზის ფორმები იმის საშუალებას იძლევა, რომ მოხდეს აღენომის მკაფიო დიფერენციაცია ნორმალური, გადაგვარებული და კიბოს ქსოვილებისაგან. ეს ნათლად არის ნაჩვენები ნახ.16-ზე, რომელზეც მოცემულია ორი ნიმუშის შუალედური ხასიათი. სინამდვილეში, უკიდურესი ფორმების (ჯანმრთელი და კიბო) საშუალებით, შერჩევის წესით, შესაძლებელია მივიღოთ შუალედური სპექტრები როგორც ამ სპექტრების წრფივი კომბინაცია და აქედან გამომდინარე განვსაზღვროთ ნიმუშში ნორმალური და კიბოს ქსოვილის წილობრივი შემადგენლობა ან ფაქტობრივად შევაფასოთ პათოლოგიურობის (გადაგვარების) ხარისხი.



ნახ.16 შერეული ხასიათის მქონე ორი ნიმუშის ფლუორესცენციის სპექტრები, რომლებიც აგებულია უკიდურესი შემთხვევების, ნორმალურის (უწყვეტი) და კიბოს (წერტილოვანი) კომბინაციის გზით. ზედა (უწყვეტი) რუხი მრუდის სპექტრი შედგება: 70% კიბოს და 30% ნორმალური ქსოვილისგან; ქვედა (უწყვეტი) რუხი მრუდის სპექტრი შედგება: 55% ნორმალური და 45% კიბოს ქსოვილისგან; წყვეტილი შავი ხაზებით ნაჩვენებია შესაბამისი “მორგებული” სპექტრები.

ცხრილში 3. მოცემულია ნახ.15-16 გამოხატული ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრების ძირითად ნიშანთვისებათა უხეში დახასიათება:

მახასიათებელი	ნიშანთვისება	ქსოვილის სახეობა
$I_{395}$	მზარდი ფონი	
« $I_{465}$	არ არის	ნორმალური (ჯანმრთელი)
$\approx I_{465}$	არ არის	ადენომა
მხარი	ძლიერად მზარდი UV-კენ	კიბო
გამოკვეთილი მხარი	სუსტად მზარდი UV-კენ	კიბოს და ჯანმრთელის ნარევი

ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტროსკოპია არის უახლესი ოპტიკური მეთოდი, რომელიც უზრუნველყოფს ცოცხალი უჯრედების მდგომარეობის დადგენას ქსოვილის მოკვეთის გარეშე. იგი არის მეტად პერსპექტიული მეთოდი დაავადების ძალიან ადრეული სტადიების არაინვაზიურად და რეალური დროის რეჟიმში განსასაზღვრად. ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტროსკოპიის მეთოდს შეუძლია განასხვაოს ერთმანეთისაგან ადამიანის ნორმალური და მისგან განსხვავებულ მდგომარეობაში მყოფი ქსოვილები. ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტროსკოპიის მეთოდი ოპერირებს მოლეკულურ დონეზე. იგი არის ძლიერი და სარწმუნო “იარაღი” ოპტიკურად მისადგომი ორგანოების სხვადასხვა პათოლოგიების აღმოსაჩენად. დიაგნოსტიკის სისწრაფე (თითქმის მყისიერი) მეთოდს სძენს განსაკუთრებულ მნიშვნელობას ოპერაციის მიმდინარეობისას, რომლის დროსაც შესაძლებელია ნორმალურ და პათოლოგიურ ქსოვილებს შორის საზღვრის დატანა.

ამრიგად, ქსოვილი ლაზერით დასხივების შედეგად იძლევა დამახასიათებელ ფლუორესცენციური გამოსხივების სპექტრს, რომლის სახასიათო თვისებები დამოკიდებულია ქსოვილის ტიპზე: ჯანმრთელი, ადენომა ან ავთვისებიანი სიმსივნე. აქედან გამომდინარე



ფლუორესცენციის კვლევა არის პოტენციურად სწრაფი და საიმედო დიაგნოსტიკური მეთოდი.

ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილების ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის კვლევისას ჩვენ დავადგინეთ, რომ ფლუორესცენციის მთელი სპექტრის ნორმირება 465nm-ის შესაბამის ინტენსივობაზე ავლენს სპექტრალური ხაზის ფორმასა და ქსოვილის მდგომარეობას შორის მჭიდრო კორელაციას.

ამგვარად ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრით შესაძლებელია ქსოვილის პათოლოგიური მდგომარეობის ცალსახა იდენტიფიკაცია. სპექტრების შედარებებმა გვაჩვენა, რომ ფლუორესცენციის სპექტრების ხაზების ფორმით ცალსახადაა შესაძლებელი განსხვავების “დაჭერა” ნორმალურ, ადენომატოზურ და ავთვისებიან სიმსივნეებს შორის.

### ***3.1.6. ბიოლოგიური ქსოვილის გადაგვარებულობის განსაზღვრა ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციით***

#### ***3.1.6.1. ბიოლოგიური ქსოვილის პათოლოგიურობის ხარისხის***

##### ***შესაფასებელი მოდელი***

მიუხედავად მიღებული შედეგებისა კვლავაც აქტუალურია ქსოვილის მდგომარეობის ადეკვატური ფიზიკური აღწერა, რაც თავის მხრივ კორექტული მოდელის შერჩევას მოითხოვს. არსებობს მრავალი ფაქტორი, რომელიც ამ მოდელს შეიძლება დაედოს საფუძვლად. ქვემოთ ერთ-ერთ (და არა ერთადერთ) მათგანზე შევჩერდებით და შევეცდებით ბიოქსოვილის, “სუფთა” მდგომარეობებით დახასიათებას. აქვე განვმარტავთ, რომ ტერმინი “სუფთა” გარკვეული იდეალიზაციაა და ის “აბსოლუტურად ჯანმრთელ” და “აბსოლუტურად პათოლოგიურ” მდგომარეობებს შეესაბამება. დანარჩენი მდგომარეობები კი “შერეულ მდგომარეობებს” წარმოადგენენ, რომლებიც ერთმანეთისაგან გადაგვარების ხარისხით განსხვავდებიან. შერეული მდგომარეობებიც – ჩვენს მიერ შემოთავაზებული ტერმინია და ის უჯრედების ისეთ მდგომარეობებს შეესაბამება, რომლებიც უკვე

პათოლოგიური არიან, მაგრამ ჯერ არ მიუღწევიათ „აბსოლუტურად პათოლოგიური“ მდგომარეობებისათვის.

საყოველთაოდაა ცნობილი, რომ ბიოლოგიური უჯრედის ბირთვის ცვლილებები, სხვა ცვლილებებთან ერთად, დისპლაზიის ან ავთვისებიანი სიმსივნის ადრეული სტადიის [16,94] ძალიან მნიშვნელოვანი მაჩვენებელია. ამგვარად ერთ-ერთი ძირითადი სადიაგნოსტიკო კრიტერიუმი გულისხმობს ბირთვის გადიდებას, ბირთვის ზომების და ფორმის (პლეომორფიზმი) ცვლილებას [95]. ქსოვილის გადაგვარების ხარისხის აღსაწერად ჩვენც ამ მახასიათებელს გამოვიყენებთ. ამგვარად, ვთანხმდებით იმაზე, რომ ბირთვების მინიმალურ ზომას შეესაბამება ქსოვილის ჯანმრთელი მდგომარეობა. ბირთვების მაქსიმალურ ზომას – ქსოვილის მძიმე პათოლოგიური მდგომარეობა. შუალედური ზომის ბირთვებს კი – სუსტი პათოლოგიური ანუ შუალედური მდგომარეობები. ამრიგად, შესაბამისად თუ ჩვენ ვზომავთ ბიოქსოვილის ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრს ბუნებრივია ვივარაუდოთ, რომ გარდა ორი სუფთა მდგომარეობისა უნდა დაიმზირებოდეს შერეული (შუალედური) მდგომარეობებიც. გამოსაკვლევი ქსოვილის მდგომარეობას ფლუორესცენციის სპექტრალური ფუნქციით აღვწერთ. მას კი, შემდეგი თვისებები გააჩნია [109]: მუდმივი პიკი 465nm ტალღის სიგრძეზე, ცვალებადი ინტენსივობის მქონე პიკი ცენტრით 395nm და გაზრდილი ფონით – 420nm-დან დაწყებული და მზარდი მოკლეტალღოვანი უბნის მიმართულებით. ყველა სპექტრი 465nm პიკის ინტენსივობაზე ნორმირდებოდა.

ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტროსკოპიის საშუალებით ბიოლოგიური ქსოვილის პათოლოგიურობის ხარისხის აღსაწერად ჩვენ გთავაზობთ ისეთ მოდელს, რომელშიც ბიოქსოვილის ფლუორესცენციის 465nm-ზე ნორმირებული სპექტრი  $S_{arb}(\lambda)$  წარმოდგენილია, როგორც  $S_{norm}(\lambda)$  და  $S_{abnorm}(\lambda)$  სუფთა მდგომარეობების შესაბამისი სპექტრალური ფუნქციების წრფივი სუპერპოზიცია. შესაბამისად:

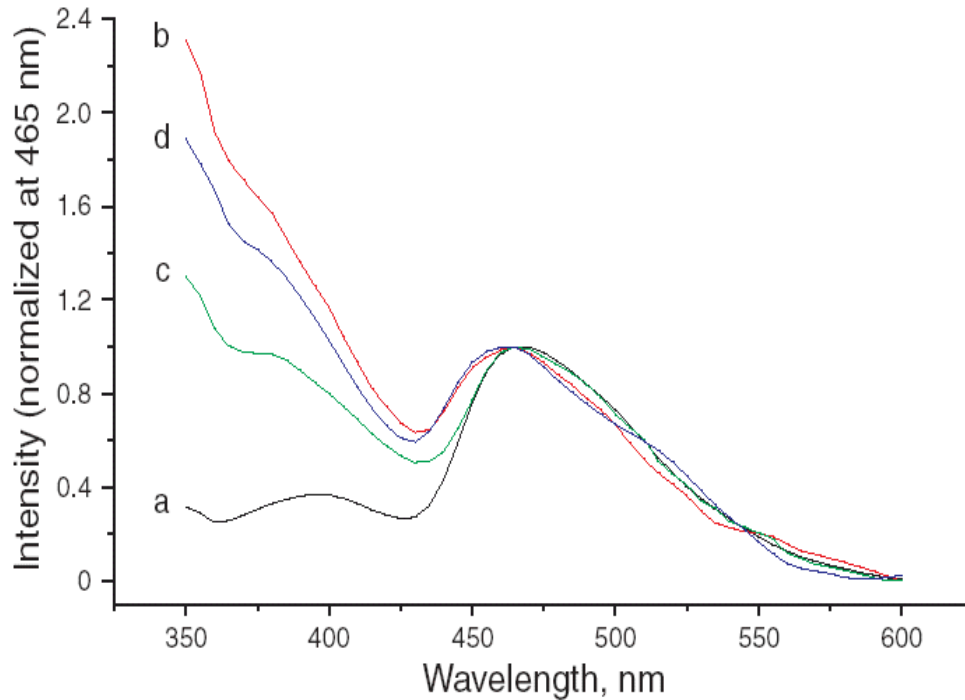
$$S_{arb}(\lambda) = C_1 S_{norm}(\lambda) + C_2 S_{abnorm}(\lambda) \quad (36)$$

სადაც

$$S(\lambda) = \sum_{\lambda_m} F_{xm}^{\det}$$

და  $C_1$  და  $C_2$  დამოკიდებულია ქსოვილის მდგომარეობაზე და აკმაყოფილებს შემდეგ პირობას:  $C_1 + C_2 = 1$ . ბუნებრივია, რომ (36) გამოსახულება და შემოთავაზებული მოდელიც სამართლიანი იქნება იმ შემთხვევაში თუ სუფთა მდგომარეობების სპექტრები ( $C_1 \rightarrow 0$  და  $C_2 \rightarrow 0$ ) ცალსახად განისაზღვრებიან. შესაბამისად მოდელის სამართლიანობის შემთხვევაში ფარდობა  $D = C_2/C_1$  განსაზღვრავს პათოლოგიურობის ხარისხს.

შემოთავაზებული მოდელის შესამოწმებლად გამოვიყენეთ ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილი, რომელიც ადებულ იქნა 100 სხვადასხვა ინდივიდისგან, როგორც რამოდენიმე მილიმეტრის სისქის მყარი ნაჭრები. ამ 100 ნიმუშიდან ჰისტომორფოლოგიურმა გამოკვლევამ გამოავლინა ჩიყვის, ადენომის, პაპილარული და ფოლიკულური კარცინომების შემთხვევები. ყოველი დაავადებული ქსოვილისთვის გეგმონდა იგივე ავადმყოფის ნორმალური ქსოვილის ნიმუშებიც. ნორმალური ქსოვილის ფლუორესცენციის, ანუ სუფთა მდგომარეობების მისაღებად ჩვენ ავიღეთ ექსპერიმენტალურად გაზომილი ნორმალური ქსოვილების ფლუორესცენციის სპექტრების გასაშუალოებული სპექტრი (ნახ.17(ა)).

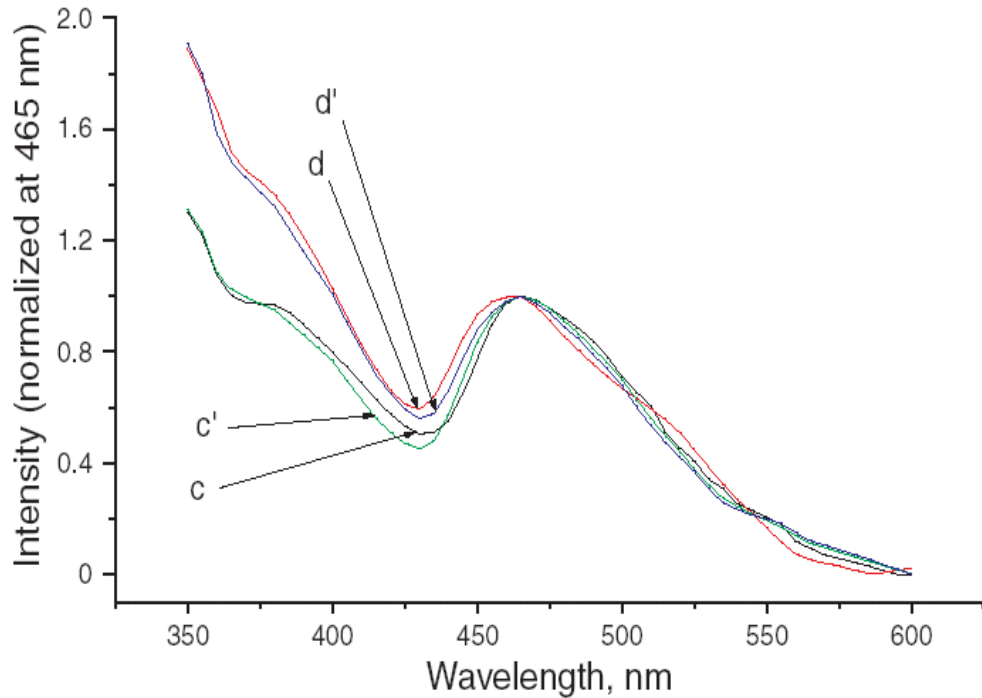


ნახ. 17 პაპილარული კარცინომის ქსოვილის ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრები. მიმდებარე ქსოვილი (a), კიბოს ქსოვილი (b) და შერეული მდგომარეობების ქსოვილი (c,d). სპექტრები ნორმირებულია 465nm-ის შესაბამის ამპლიტუდაზე.

პათოლოგიური ქსოვილის ფლუორესცენციის, ანუ მეორე სუფთა მდგომარეობის მისაღებად ავირჩიეთ ფოლიკულური კარცინომის შემთხვევები. ჩვენს ხელთ არსებულ ნიმუშებში ასეთი 30 აღმოჩნდა. მათი ფლუორესცენციის სპექტრებიდან შეირჩა ნორმალური ქსოვილის ფლუორესცენციის სპექტრისაგან მაქსიმალური განსხვავების მქონე სპექტრი, რომლის შესაბამისი ქსოვილიც ჩავთვალეთ მაქსიმალურად გადაგვარებულად, ხოლო ფლუორესცენციის სპექტრი – გადაგვარებული ქსოვილის სუფთა მდგომარეობის დამახასიათებელ ფლუორესცენციად (ნახ.17(ბ)).

ნახ.17((c)და(d))–ზე გამოსახულია შუალედური ხასიათის მქონე ორი სპექტრალური ხაზი. ისინი კარგად აღიწერებიან მოცემული მოდელის ფარგლებში (36) გამოსახულებით. ამის ნათლად წარმოსადგენად იგივე მრუდები გამოსახულია ნახ.18–ზე (c) და (d) მრუდებით. აქვე მოცემულია სუფთა მდგომარეობების წრფივი სუპერპოზიციით წარმოდგენილი შესაბამისი მრუდები (c') და (d'). მათი

თანხვედრა თვალსაჩინოა. (c) მრუდისთვის  $C_1 = C_2 = 0.5$  და (d) მრუდისთვის  $C_1 = 0.2$  და  $C_2 = 0.8$ . პათოლოგიურობის ხარისხი  $D = C_2 / C_1$  შესაბამისი შემთხვევებისთვის მიიღებს შემდეგ მნიშვნელობებს: (c)-თვის  $D = 1$ , ხოლო (d)-თვის  $D = 4$ .



ნახ. 18 პაპილური კარცინომის ქსოვილის ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრები. შერეული მდგომარეობების ქსოვილი (c,d), წარმოდგენილია სუფთა მდგომარეობების წრფივი სუპერპოზიციის შესაბამისი მრუდებით (c') და (d'). ქვედა (c) მრუდი: 50% მიმდებარე და 50% კიბოს ქსოვილი; ზედა (d') მრუდი: 20% მიმდებარე და 80% კიბოს ქსოვილი;

ამრიგად, ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრის ნებისმიერი გაზომვით შესაძლებელია ფოლიკულური კარცინომის ცალსახად გამოვლენა და გადაგვარების ხარისხის დადგენა.

აღწერილი ფლუორესცენციის სპექტრების სუპერპოზიციური მოდელი შეგვიძლია შევადაროთ კომპიუტერულ უჯრედულ მორფომეტრიას [17]. ზოგადად, დიაგნოსტიკისას სიზუსტეში იგი არ ჩამოუვარდება ხსენებულ მეთოდს და მნიშვნელოვნად აღემატება მას არაინვაზიურობით და სისწრაფით.

როგორც ზემოთ უკვე აღვნიშნეთ, ნანახი იქნა კარგი კორელაცია სპექტრალური ხაზის ფორმასა და ქსოვილის “პათოლოგიურობას” (“გადაგვარებულობას”) შორის. ზოგიერთ შემთხვევაში ფლუორესცენციის სპექტრი ფორმირდება “ჯანმრთელი” და “პათოლოგიური” ბაზისური სპექტრალური ხაზების ფორმების სუპერპოზიციით. ეს საშუალებას იძლევა სპექტრის ნებისმიერი ერთჯერადი გაზომვით ცალსახად განისაზღვროს ქსოვილის მდგომარეობა. ბიოქსოვილის ლაზერით დასხივებისას გამოწვეული ფლუორესცენციის სპექტრალური მახასიათებლები დამოკიდებულია ქსოვილის მდგომარეობაზე და მკვეთრად განსხვავდება ერთმანეთისაგან ისეთი შემთხვევებისთვის, როგორებიცაა ნორმალური (ჯანმრთელი), ადენომატოზური თუ ავთვისებიანი სიმსივნეების ქსოვილები (კიბო) [109].

### **3.1.7. ადამიანის ჩიყვის LIF მიღელი**

ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტროსკოპიის (LIFS) მეთოდი ფართოდ გამოიყენება კიბოსწინა და კიბოს მდგომარეობების აღმოსაჩენად, ადამიანის სხვადასხვა სახეობის ქსოვილებში [13,16,25,109]: მეტაბოლურ ცვლილებებზე დასაკვირვებლად [27], ტრანსპლანტაციის მიზნებისათვის [26] და ქსოვილის მიკროსკოპული არქიტექტურის ვიზუალიზაციისათვის [116]. ამ მეთოდში შეისწავლიან ავტოფლუორესცენციას, გამოწვეულს ლაზერის უზიანო გამოსხივების ზემოქმედებით. სპექტრის მახასიათებლები განისაზღვრება ქსოვილის შემადგენლობითა და არქიტექტურით და გაზომვების ჩატარება შესაძლებელია რეალური დროის რეჟიმში ქსოვილის ამოუკვეთად (*in situ*). კვლევის ეს მეთოდოლოგია უზრუნველყოფს პოტენციურად ისეთი მნიშვნელოვანი ინსტრუმენტის შექმნას, რომელიც შეცვლის ტრადიციულ, დამაზიანებელ ბიოფსიას, არაინვაზიური ოპტიკური მეთოდით. ფლუორესცენტული ვიზუალიზაციის მეთოდის [95] და სკანირების რეჟიმში, LIF სპექტროსკოპიის მეთოდის საშუალებით შესაძლებელი იქნება ქსოვილის ფართო არეების კონტროლი. ამ მეთოდს აქვს უდავო

უპირატესობა, სამედიცინო პრაქტიკაში მიღებულ ტრადიციულ, თანამედროვე მეთოდებთან შედარებით [1,8,105].

ფლუორესცენციის სპექტრების მონაცემების საშუალებით განსხვავებული და ჰისტომორფოლოგიურ დიაგნოზებთან კორელირებული ნორმალური, ჩიყვის, ადენომის, პაპილური და ფოლიკულური კიბოს ქსოვილები უკვე ნაჩვენები იყო. პათოლოგიების იდენტიფიკაციისათვის აიღებოდა ქსოვილის სპეციალური, კვაზიერთგვაროვანი არეები (რომლებსაც შეესაბამებოდნენ ჩიყვის, ადენომის და კიბოს ქსოვილები). სწორედ ასე განსაზღვრულ სპექტრებზე დაყრდნობით შეექმენით ემპირიული ალგორითმი, რომლითაც ვაკვირდებით და ვანსხვავებთ ქსოვილის ფართო არეების მდგომარეობებს. ეს ხორციელდება, დაახლოვებით 40 $\mu$ m ქსოვილის ზედაპირულ ფენაში (შედწევს ასეთი სიღრმე დამახასიათებელია ულტრაიისფერი გამოსხივებისთვის, დაახლოვებით 300nm-ზე [113]), ლაზერის მოძრავი დაფოკუსირებული (დაახლოვებით 100 $\mu$ m დიამეტრის) ლაქის მიერ გამოწვეული ფლუორესცენციის შეკრებითა და ანალიზით. აქამდე ეს სპექტრალური თავისებურებები არ იყო შესწავლილი. ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილის სხვადასხვა პათოლოგიური მდგომარეობების აქ მოყვანილი, თვისობრივი მახასიათებლები ასე დეტალურად აქამდე არავის გამოუკვლევია.

ფარისებრი ჯირკვლის, ჩიყვის, ფოლიკულური ადენომის და პაპილური კარცინომის პოსტოპერაციული ქსოვილები (*ex vivo*), მიიღებოდა პაციენტების სრული ინფორმირებულობისა და თანხმობის პირობებში. ყოველი ნიმუში იღებოდა სპექტროსკოპიული კვარცის კიუვეტაში, რომლებიც 330-500nm ტალღის სიგრძეთა დიაპაზონში თავისუფლები არიან ყოველგვარი შთანთქმისა და ლუმინესცენციისაგან.

აღზნება ხორციელდებოდა 337nm ტალღის სიგრძის მქონე აზოტის ლაზერით [109], ხოლო რეგისტრაციის სისტემა მთლიანად შეიცვალა ამჟამად არსებული სისტემით, რომელიც ბევრად მოსახერხებელია ფართე დიაპაზონის გამოსხივების სპექტრების ჩასაწერად. ლაზერის იმპულსის ხანგრძლივობა იყო 10ns, სიხშირე 100Hz, ხოლო იმპულსის ენერჯია – 0.4 mJ. სხივი ფოკუსირდებოდა 100 $\mu$ m

დიამეტრის ლაქად. ლაზერის სხივის სამოდროდ, ნიმუში მაგრდებოდა ორ განზომილებაში მიკრომეტრული ბიჯით მოძრავ სასაგნე მაგიდაზე. ფლუორესცენციული სიგნალი გროვდებოდა ლინზების სისტემით და ფოკუსირდებოდა Oriel LineSpec CCD სპექტრომეტრის შესასვლელ ღრეჩოზე. 330 - 500nm გამოსხივების დარეგისტრირებული სპექტრი გამოისახებოდა კომპიუტერის მონიტორზე და ინახებოდა data ფაილების სახით. დაახლოებით 2000 ანათვალი კეთდებოდა ყოველ წერტილში.

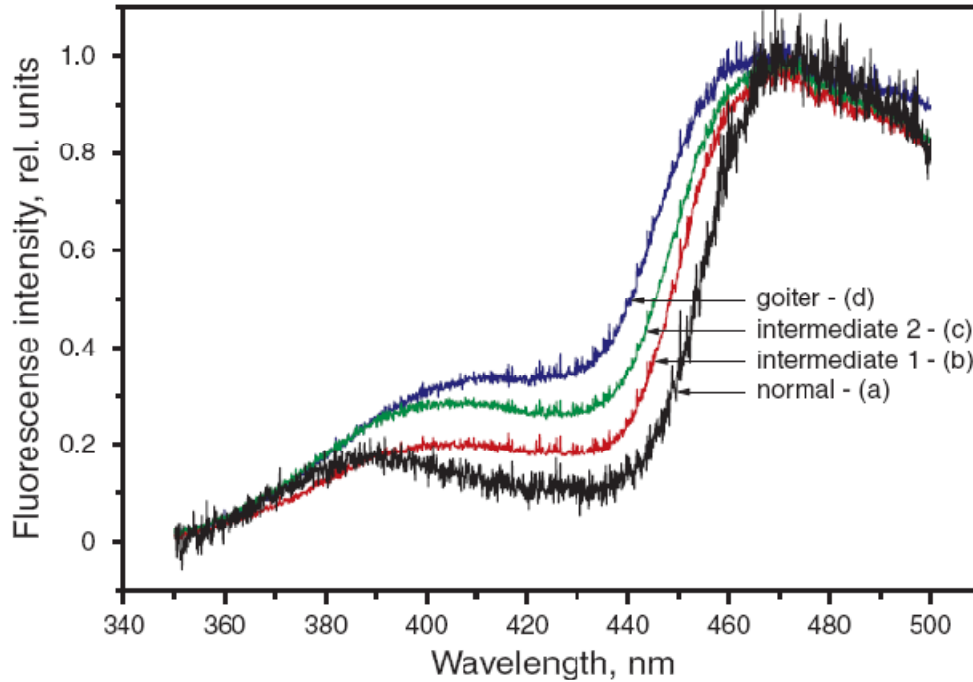
დომინანტური შთანთქმის შემთხვევაში, შთანთქმული ენერჯიის დიდი წილი გარდაიქმნება სითბოში, რაც ნიმუშის ტემპერატურას ზრდის დაახლოებით 1K-ით  $10^3$ s-ის განმავლობაში. ეს შეფასება გააკეთდა იმ დაშვებით, რომ ქსოვილის კუთრი სითბოტევადობა  $C \approx 3.7 \text{ kJ kg}^{-1}\text{K}^{-1}$  [117]. ამგვარად ტემპერატურის მატება სკანირების რეჟიმში არ ახდენს არანაირ ზეგავლენას სპექტრალურ გაზომვებზე. ამასვე ამტკიცებს მიღებული სპექტრების განმეორებადობა, ხელახალი გაზომვებისას ქსოვილის ზედაპირის სხვადასხვა წერტილში და სხვადასხვა დროს.

337nm ტალღის სიგრძის აღზნების LIF სპექტროსკოპია იძლევა ინფორმაციას ქსოვილის შემადგენელ ისეთ ბუნებრივ ფლუოროფორებზე, როგორებიცაა: არომატული ამინო მჟავა ტრიფტოფანი, რომელიც ძირითადად ცილებსა და მიტოქონდრიაშია, **NADH** (ნიკოტინამიდ ადენინ დინუკლეოტიდი), მნიშვნელოვანი კოფერმენტი, აგრეთვე მიტოქონდრიაში და კოლაგენი და ელასტინი სტრუქტურულ ქსოვილში [27,117]. შედარებით სუსტი ფლუოროფორია კაროტინი. როგორც ვნახეთ ფარისებრ ჯირკვალში ტრიფტოფანი და კოლაგენი თავიანთი ფლუორესცენციის პიკს იძლევიან, დაახლოებით 390nm-ზე, ხოლო **NADH** - 470nm-ზე. ელასტინი და კაროტინი შედარებით მცირე ინტენსივობით ფლუორესცირებენ. ამგვარად, ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილის LIF სპექტრი წარმოადგენს ძირითადად ამ ფლუოროფორების ინდივიდუალური ფლუორესცენციის სპექტრების ზედდებას.

ჩვენი სპექტრალური გაზომვების შედეგები მოცემულია ნახ. 19-22. ეს სპექტრალური მრუდები ნორმირებულია ინტენსივობის მაქსიმუმზე და კარგად ექვემდებარება ანალიზს სხვადასხვა სუფთა პათოლოგიურ



და ნორმალურ მდგომარეობებში [30,109]. ზოგადად შეგვიძლია ვივარაუდოთ, რომ ქსოვილის ნიმუშები შეიცავენ განსხვავებული ხარისხის პათოლოგიურ ჩანართებს [30].



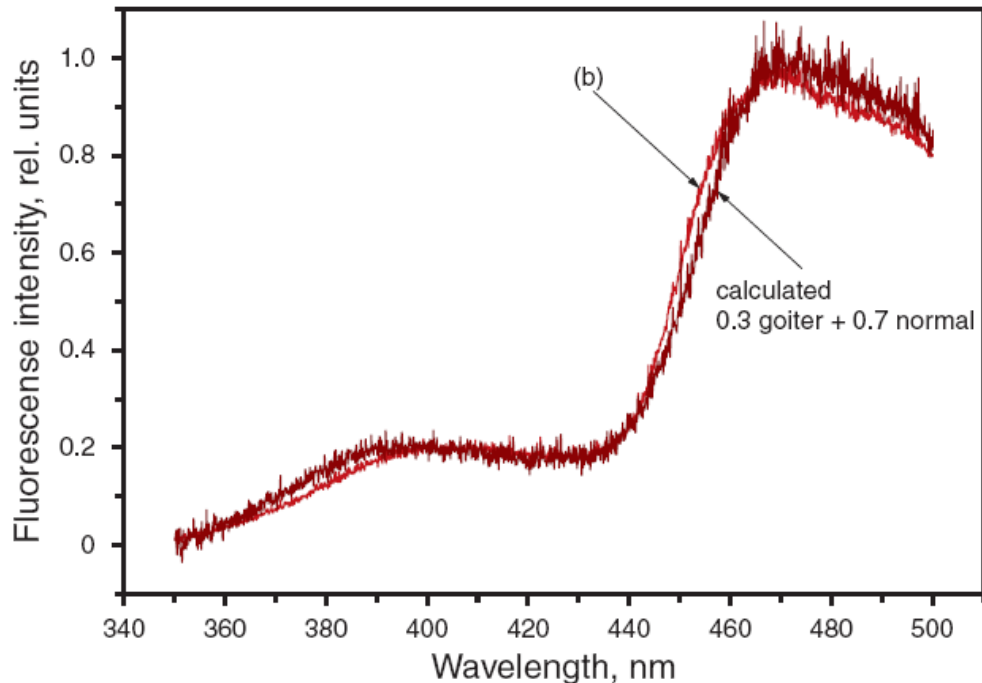
ნახ. 19 ფარისებრი ჯირკვლის სხვადასხვა წერტილების LIF სპექტრები

ნახ. 19-ზე მოცემულია სპექტრები, მიღებული ქსოვილის სხვადასხვა წერტილოდან. მოცემული ოთხი სახასიათო მრუდიდან (a) არის სტატისტიკურად კარგად იდენტიფიცირებული ნორმალური ქსოვილის ფლუორესცენციის სპექტრი, ხოლო (b)-(d) არის ჰისტომორფოლოგიურად დადასტურებული ჩიყვის ქსოვილის ფლუორესცენციის სპექტრები. (a) და (b)-(d) მრუდებს შორის განსხვავება თვალსაჩინოა; (b)-(d) მრუდები ფორმით განსხვავდებიან. (d) მრუდის მდებარეობა ისეთია, რომ ყველა სხვა მრუდები მოთავსებულია ამ მრუდსა და (a) მრუდს შორის. ამიტომ, ჩვენ ვთვლით, რომ (d) მრუდი არის ჩიყვის ქსოვილი მაქსიმალური გადაგვარებით და რომ (b)-(c) წარმოადგენს ქსოვილის განსხვავებული, მაგრამ არა მაქსიმალური გადაგვარების არეებს. (b) და (c) მრუდები, წარმოდგენილია

შესაბამისად ნახ.20 და ნახ.21-ზე, სადაც ეს ექსპერიმენტალური მრუდები მორგებულია (a) და (d) მრუდების წრფივ სუპერპოზიციას:

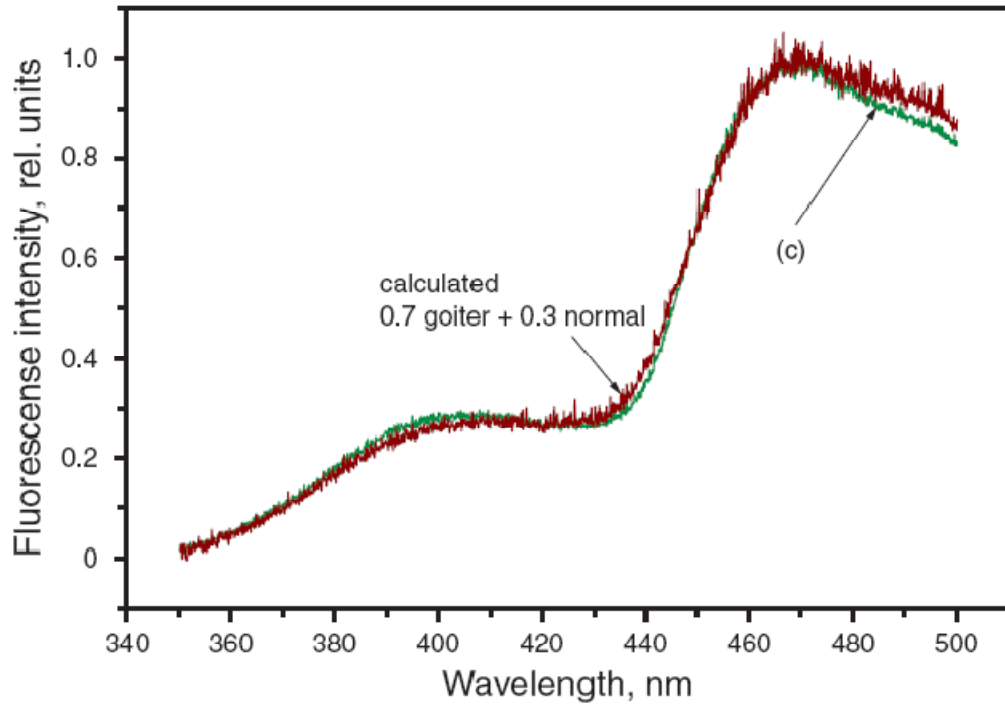
$$S_{arb}(\lambda) = C_1 S_{norm}(\lambda) + C_2 S_{abnorm}(\lambda) \quad (37)$$

სადაც  $D = C_2/C_1$  არის გადაგვარების ხარისხი, რომელიც (b) მრუდის შემთხვევაში  $D_b = 0.43$  ტოლია და (c) მრუდის შემთხვევაში –  $D_c = 2.33$ . ექსპერიმენტალური და გამოთვლილი მრუდების თანხვედრა მიუთითებს იმაზე, რომ ქსოვილში პათოლოგიური ცვლილებები წრფივად მიმდინარეობს.



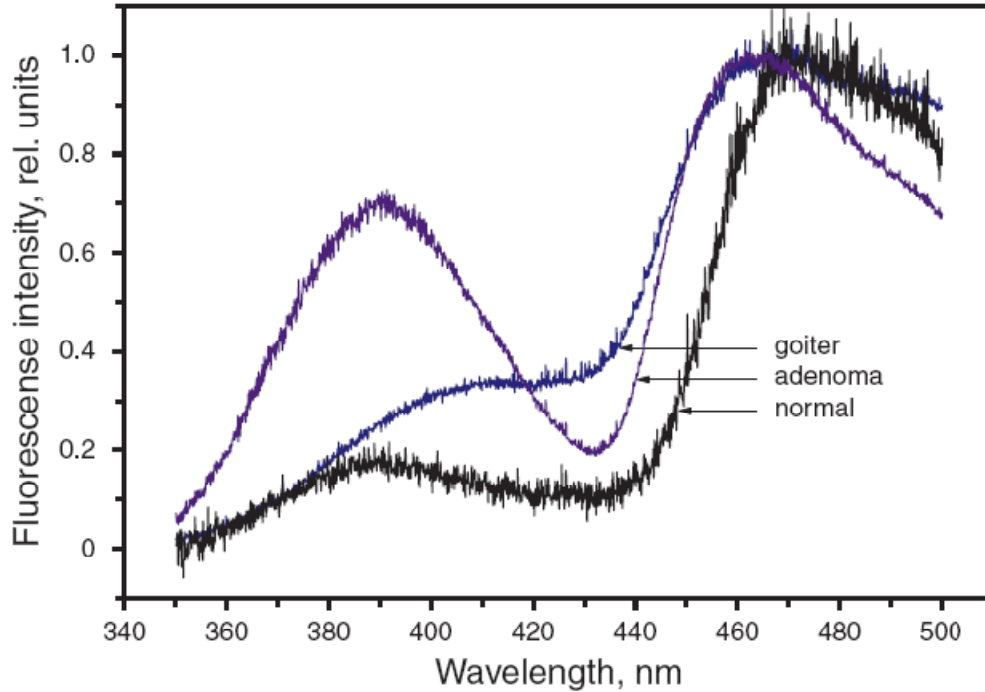
ნახ. 20. ჩიევის ქსოვილის ექსპერიმენტული (b) და მორგებული მრუდები,  $D_b = 0.43$  გადაგვარების ხარისხით. მორგებული მრუდი მიღებულია (a) და (d) მრუდების წრფივი სუპერპოზიციით.

პათოლოგიური არეები ძირითადად ნორმალურ-პათოლოგიურის ნარეუს წარმოადგენენ და იშვიათად – ორნაირი პათოლოგიის ნარეუს. როგორც ჩვენ ვიცით, ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილში ორი განსხვავებული პათოლოგიის თანაარსებობა, ოპტიკურად, პირველად ჩვენ დავაფიქსირეთ.



ნახ. 21 ჩიყვის ქსოვილის ექსპერიმენტული (c) და მორგებული მრუდები,  $D_c = 2.33$  გადაგვარების ხარისხით. მორგებული მრუდი მიღებულია ნახ. 19. (a) და (d) მრუდების წრფივი სუპერპოზიციით.

ეს რეზულტატი (ადენომა და ჩიყვი) მოცემულია ნახ. 22-ზე. ამ კონკრეტულ შემთხვევაში ადენომატოზურ ქსოვილს ბევრად ნაკლები ადგილი უკავია (ხაზოვანი ზომით  $\approx 250\mu\text{m}$ ), რომელსაც პრაქტიკულად ვერ აღმოაჩენთ ისეთი თანამედროვე მეთოდითაც კი, როგორცაა წვრილი ნემსით ასპირაცია და უჯრედული მორფომეტრია [8]. ამიტომ, ბიოლოგიური ქსოვილის **LIF** სპექტროსკოპიით დიაგნოსტიკის შესაძლებლობები უნიკალურია.



ნახ. 22 ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილში აღმოჩენილია ორი პათოლოგიის თანაარსებობა: ჩიყვი და ადენომა

ზემოთმოყვანილ ექსპერიმენტების საფუძველზე შესაძლებელია დავასკვნათ, რომ ადამიანის ფარისებრი ჯირკვლის, ჩიყვის პათოლოგიური ქსოვილის დამახასიათებელი **LIF** სპექტრები წარმოადგენენ დიაგნოსტიკის პერსპექტიულ შესაძლებლობას და რომ ბიოლოგიური ქსოვილის მდგომარეობა აღიწერება ქსოვილის სუფთა მდგომარეობების (ნორმალური და პათოლოგიური) წრფივი სუპერპოზიციით, რაც ყოველ კონკრეტულ შემთხვევაში, იძლევა ქსოვილის გადაგვარების ხარისხის დადგენის საშუალებას (დაავადების კლინიკური სტადიის განსაზღვრა).

ბიოლოგიური ქსოვილის ზოგიერთ ნიმუშში, გვერდიგვერდ აღმოჩნდა ორი განსხვავებული პათოლოგიის მქონე ჩანართები.

ლაზერის სხივით ქსოვილის ზედაპირის სკანირება შესაძლებელს ხდის დადგინდეს სხვადასხვა გადაგვარების ხარისხის მქონე არეების ზომები.

### **3.1.8. ვიტამინი A-ს განაწილების შესწავლა LIF**

#### **სპექტროსკოპიით**

ვიტამინი A არის, რეტინოიდების ნატურალური და სინთეტიკური ნაერთების ოჯახიდან, რომელიც მრავალ უჯრედსა და ქსოვილში არეგულირებს გენურ ტრანსკრიპციას [118,119]. ძუძუმწოვრებში, სხეულის მთლიანი რეტინოლის 50–80%, როგორც წესი, ღვიძლის ვარსკვლავისებრ უჯრედებშია თავმოყრილი [120,121]. ვარსკვლავისებრი უჯრედების 95%-ზე მეტში ვიტამინი A წარმოდგენილია ლიპიდური წვეთების სახით.

ჩვენი ინტერესი ვიტამინი A-ს მიმართ, გარდა მისი საზოგადოდ დიდი მნიშვნელობისა ცოცხალი ორგანიზმების მეტაბოლიზმსა და გამრავლებაში, დიდწილად განაპირობა იმ ფაქტმა, რომ ეს ნივთიერება კარგი ლუმინოფორია. თუ აქამდე ბიოლოგიურ ქსოვილებში არსებულ ბუნებრივ ფლუოროფორებს ვაკვირდებოდით, ახლა დაგეგმეთ ბუნებრივი გზით გარედან, შეგვეყვანა ეს ნივთიერება ორგანიზმში. ამიტომ თბილისის სახელმწიფო სამედიცინო უნივერსიტეტის ბიოქიმიურ დეპარტამენტთან თანამშრომლობით გადავწყვიტეთ ჩაგვეტარებინა ექსპერიმენტების სერია, სადაც შევეცადეთ პასუხი გაგვეცა კითხვაზე, შევძლებდით თუ არა **LIFS** გამოყენებით ვიტამინი A-ს დაფიქსირებასა და მონიტორინგს საცდელი ვირთაგვების სხეულის სხვადასხვა ორგანოების ქსოვილებში. ყველაფერ ზემოთქმულთან ერთად, აღნიშვნის ღირსია ის ფაქტი, რომ ამ ტიპის კვლევები საქართველოში ჯერ არ ჩატარებულა.

ვირთაგვებში ვიტამინი A-ს შეყვანის შემდეგ, ღვიძლის ვარსკვლავისებრი უჯრედების ციტოპლაზმაში ლიპიდური წვეთები იმატებს, როგორც რაოდენობაში, ასევე ზომებში [122]. ნაჩვენებია იყო, რომ ნორმალურ ვირთაგვაში ღვიძლის გარდა, ფილტვების და ნაწლავების ვარსკვლავისებრ უჯრედებშიც ასევე გროვდება ლიპიდური წვეთები. ღვიძლის მსგავსად აქაც იზრდება მათი რაოდენობა ცხოველების ვიტამინი A-ს მაღალი დოზებით კვებისას [123]. ლიპიდური წვეთები ახლა უკვე განიხილება, როგორც დამოუკიდებელი ორგანოები. ამას გარდა ლიპიდური წვეთები და მათთან

დაკავშირებული ცილები მნიშვნელოვან როლს თამაშობენ ადამიანის ისეთი დაავადებების მსვლელობაში როგორებიცაა, სიმსუქნე, C ჰეპატიტი და ათეროსკლეროზი [124].

ლიპიდური წვეთების სტრუქტურის შესწავლაში პროგრესის მიუხედავად მაინც ძალიან მცირე ინფორმაცია ვიტამინი A-თი მდიდარი ლიპიდური წვეთების ფორმირების მექანიზმის შესახებ ისევე როგორც ვიტამინი A-ს შეკრების შესახებ.

აქამდე ლიპიდური წვეთების წარმოქმნის გამოკვლევები ემყარებოდა ელექტრონული მიკროსკოპით დამზერას [120,122]. ჩვენი თვალთახედვით მნიშვნელოვანია, რომ გვქონდეს შესაძლებლობა დავაკვირდეთ ლიპიდური წვეთების წარმოქმნას რეალური დროის რეჟიმში, უჯრედების დაუზიანებლად.

ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტროსკოპია (**LIFS**) და გამოსახულების მიღება ინტენსიურად იხმარება მედიცინასა და ბიოქიმიურ და სამედიცინო კვლევებში [26,27,29,116]. ჩვენი ინფორმაციით აქამდე არავის უცდია **LIFS** გამოყენება ლიპიდური წვეთების წარმოქმნის მექანიზმების გამოკვლევებში.

ჩვენი პილოტური კვლევის მიზანი იყო: (ა) ვიტამინი A-ს ლიპიდური წვეთებით გამდიდრებულ ქსოვილში **LIFS** გამოყენება სპექტრალური მახასიათებლების მისაღებად და (ბ) ქსოვილის სხვა ბუნებრივი (**NADH**, კოლაგენი, ელასტინი, და სხვა) ფლუოროფორების შესაძლო ზეგავლენის კვლევა.

მიღებულმა შედეგებმა დაგვანახეს, რომ **LIFS** საშუალებით შესაძლებელია ვიტამინი A-თი მდიდარი ლიპიდური წვეთების წარმოქმნის მონიტორინგი უჯრედების დაუზიანებლად.

ახლა განვიხილოთ ვიტამინი A-ს გავრცელებისა და ლოკალიზაციის “ამოცნობის” მეთოდის ძირითადი იდეა.

განვიხილოთ ბიოლოგიური ქსოვილი და დავუშვათ, რომ ზოგიერთი გარეშე ფლუოროფორი, კერძოდ კი A-ტიპის მოლეკულები შეეერთა მასში. A-ტიპის მოლეკულების გამოსხივების ინტენსივობა განვსაზღვროთ, როგორც  $I_A(\lambda)$ . არ უნდა დაგვავიწყდეს, რომ ბიოლოგიურ ქსოვილში არსებობენ, აგრეთვე, ბუნებრივი

ფლუოროფორებიც. თუ რომელიმე მათგანს, პირობითად აღვნიშნოთ B-ტიპის მოლეკულებად, რომლის შთანთქმის სპექტრი ნაწილობრივ მაინც ემთხვევა A-ტიპის მოლეკულების შთანთქმის სპექტრს, მაშინ ლაზერის ტაღლის სიგრძის  $\lambda_L$  შერჩევით შესაძლებელია A და B-ტიპის მოლეკულების ერთდროული აღგზნება შემდგომი ფლუორესცენციით. თუ დავუშვებთ, რომ ეს მოლეკულები ერთმანეთთან არ ურთიერთქმედებენ და არაკოჰერენტული წვლილი შეაქვთ მთლიან ფლუორესცენციაში, მაშინ ფლუორესცენციის მთლიანი სპექტრალური ინტენსივობა, იქნება ყოველი ტიპის ფლუოროფორის სპექტრალური ინტენსივობების არითმეტიკული ჯამი:

$$S(\lambda) = I_A(\lambda) + I_B(\lambda) = C_A S_A(\lambda) + C_B S_B(\lambda) \quad (38)$$

სადაც  $I_B(\lambda)$  არის ბუნებრივი B-ტიპის მოლეკულების სპექტრალური ინტენსივობის ფუნქცია, მაშინ როცა  $S_i(\lambda)$  არის ფორმ-ფაქტორი ანუ სპექტრალური განაწილების მაქსიმუმზე ნორმირებული ინტენსივობის სპექტრალური ფუნქცია;  $C_i$  – სუპერპოზიციის კოეფიციენტებია, რომლებიც დამოკიდებულია მშთანთქმელი  $N_i$  მოლეკულების სიმკვრივეზე, თითოეული მოლეკულის შთანთქმის კვეთზე  $\sigma_i$ , და  $i$ -ტიპის ფლუოროფორის ფლუორესცენციის კვანტურ გამოსავალზე  $Q_i$ . თუ ექსპერიმენტები იმგვარად ჩატარდება, რომ ექსპერიმენტის გეომეტრია და გამოსხივებული ფორმ-ფაქტორის ხაზის ფორმები არ შეიცვლება, მაშინ (38) სუპერპოზიციის კოეფიციენტი შემდეგი იქნება:

$$C_i \propto \frac{N_i \sigma_i Q_i}{\int \lambda S_i(\lambda) d\lambda} \quad (39)$$

ამიტომ, თუ ეს კოეფიციენტები თანაზომადი სიდიდეებია, მაშინ შესაძლებელია სხვადასხვა ტიპის მოლეკულების იდენტიფიკაცია და მათი განაწილების გაზომვა სხეულის სხვადასხვა წერტილებში. იდენტიფიკაციისა და განაწილების გაზომვების პროცედურების რეალიზება შესაძლებელია (38)-ის მარჯვენა და მარცხენა მხარეების

მორგებით, ისეთი ქსოვილებისათვის რომლებშიც ფლუოროფორები თანაბრად არიან განაწილებული და აგრეთვე ისეთი ქსოვილის სხვადასხვა წერტილებისათვის, რომლებშიც გვაქვს მათი არათანაბარი განაწილება.

ჩვენ ვუშვებთ, რომ A და B-ტიპის მოლეკულები ერთმანეთთან არ ურთიერთქმედებენ და ასევე სხვა მოლეკულებთანაც. ამ შემთხვევაში, ექსპერიმენტის გეომეტრიის და შესაბამისი შთანთქმის კვების და კვანტური გამოსავლის უცვლელობის პირობებში, (38)-ში კოეფიციენტების ცვლილება შეიძლება გამოიწვიოს მხოლოდ ფლუოროფორების რაოდენობის სიმკვრივის  $N_i$  ან/და შესაბამისი ფორმ-ფაქტორის ცვლილებებმა. ამ მეთოდით გაიზომება ფლუოროფორების სიმკვრივის ფარდობითი რიცხვი.

ამრიგად (38) გამოსახულების სამართლიანობის ექსპერიმენტული შემოწმება საშუალებას გვაძლევს: (ა) ფლუოროფორების იდენტიფიკაციას, (ბ) სხვადასხვა ქსოვილებში ანუ მთელ სხეულში მათი განაწილების განსაზღვრას, (გ) ყოველი ფლუოროფორისთვის ქსოვილის ნებისმიერ არეში სიმკვრივის ფარდობითი რიცხვის ზუსტ განსაზღვრას.

### **3.1.8.1. ცხოველები**

ნორმალური მამრი ვირთაგვები (250-300g) იკვებებოდნენ ვიტამინი A-თი მდიდარი საკვებით 21 დღის განმავლობაში. საკონტროლო ჯგუფი ჩვეულებრივ დიეტურ კვებაზე იყო.

ექსპერიმენტის დღეს, ყველა ვირთაგვა მომზადდა დილის 9:30-დან 11:30-მდე. ცხოველებზე ექსპერიმენტები ჩატარდა ნაციონალური სამეცნიერო-კვლევითი საბჭოს დადგენილებასთან [125] სრულ შესაბამისობაში.

საკვლევი ჯგუფის ვირთაგვებს არ გამოუვლენიათ ვიტამინი A-თი მოწამელის არანაირი კლინიკური ნიშანი.

ამ ექსპერიმენტში ვიკვლევდით ღვიძლს და ნაწლავის ილეუმის მონაკვეთს (ვარსკვლავისებრი უჯრედებით მდიდარი). ღვიძლისა და ნაწლავის მცირე ზომის (1x2cm) ქსოვილები კარგად ირეცხებოდა და



იდებოდა  $\text{NaCl} - 0.8\%$ ,  $\text{KCl} - 0.02\%$ ,  $\text{CaCl}_2 - 0.02\%$ ,  $\text{NaHCO}_3 - 0.1\%$ ,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - 0.005\%$ ,  $\text{MgCl}_2 - 0.01\%$  ნაერთში და ინახებოდა  $4^\circ\text{C}$  ტემპერატურაზე.

**LIFS** გამოკვლევების ჩასატარებლად გამოყენებულ იქნა იგივე აპარატურა რომელიც აღწერილია [29] სტატიაში. აღმგზნები აზოტის ლაზერის პარამეტრები იგივე იყო რაც წინამდებარე კვლევებში. გადაღებულ იქნა ყველა ნიმუშის და აგრეთვე, რეტინოლ აცეტატის ხსნარის (ვიტამინი A) ფლუორესცენციის სპექტრები. გამოსხივების სპექტრი იწერებოდა 370-540nm სპექტრალურ დიაპაზონში.

**LIFS** შეიძლება იქცეს ვიტამინი A-ს ტრანსპორტირების გზების, მისი სხეულში აკუმულირების და მისი მექანიზმების შემსწავლელ ეფექტურ მეთოდად, რამაც მომავალში შეიძლება განაპირობოს ვიტამინი A-ს და მისი წარმოებულების მაკონტროლებელი აპარატურის შექმნა. რასაც ხელს უწყობს ვიტამინი A-ს “ამოცნობის” საიმედოობა მისი პირდაპირი დეტექტირების შესაძლებლობის გამო.

ქსოვილის ნაჭრები იდებოდა სპექტროსკოპიული კვარცის კიუვეტაში. ვიტამინი A-ს **LIF** სპექტრები მიღებულ იქნა კიუვეტის შიდა ზედაპირიდან, რომელიც დაიფარა რეტინოლ აცეტატის ზეთოვანი ხსნარით (შემდგომში, სიმარტივისათვის - ვიტამინი A). ამ პროცედურით დაცული იქნა ექსპერიმენტის გეომეტრიის უცვლელობა.

**LIFS** ჩატარდა შემდეგი ნიმუშებისათვის: (ა) ვიტამინი A, (ბ) ვირთაგვების საკონტროლო ჯგუფის ნაწლავის ილეუმუს მონაკვეთზე, (გ) ვირთაგვების ექსპერიმენტალური (ვიტამინი A მდიდარი საკვებით გამოკვებილი) ჯგუფის ნაწლავის ილეუმუს მონაკვეთზე, (დ) ვირთაგვების საკონტროლო ჯგუფის ღვიძლზე, (ე) ვირთაგვების ექსპერიმენტალური ჯგუფის ღვიძლზე.

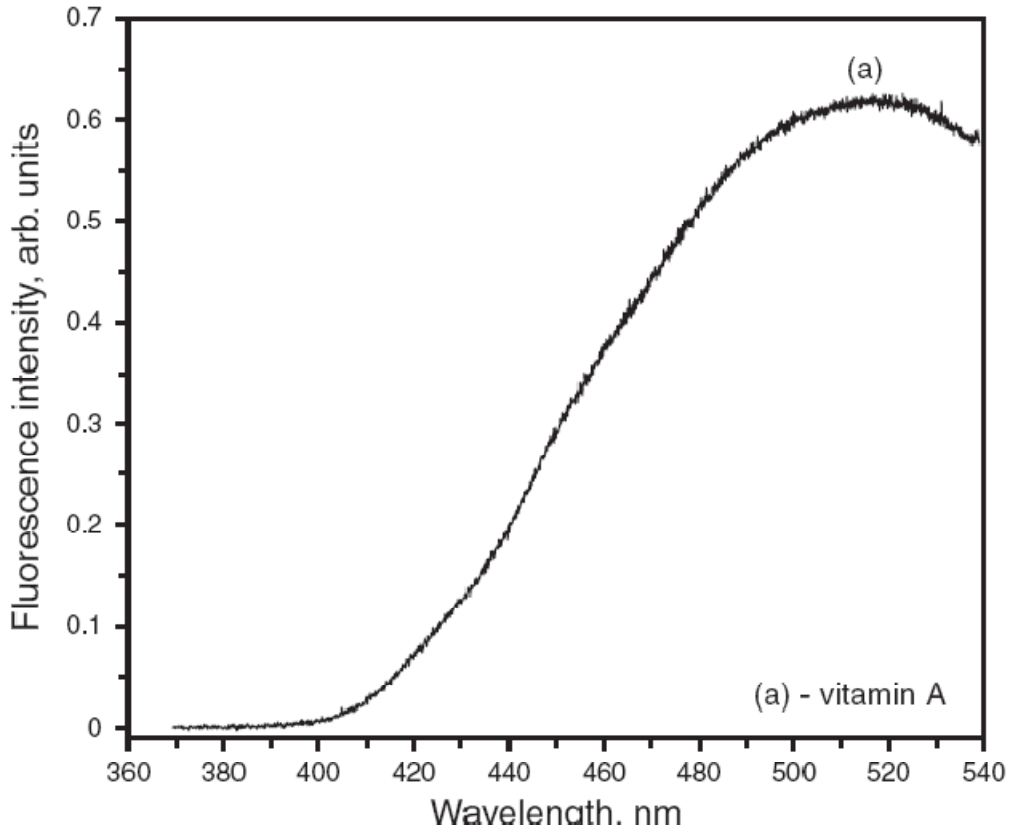
გაზომვები ჩატარდა ყოველი ნიმუშის რამოდენიმე წერტილში, მიღებული რეზულტატების განმეორებადობაში დასარწმუნებლად.

მორგების პროცედურა ჩატარდა შემდეგ გასაშუალოებულ **LIF** სპექტრებს: (ა) ექსპერიმენტალური ვირთაგვების ილეუმის ნიმუშს - ვიტამინი A-ს და საკონტროლო ჯგუფის ილეუმის ქსოვილით, (ბ) ექსპერიმენტალური ვირთაგვების ღვიძლს - ვიტამინი A-ს და საკონტროლო ჯგუფის ღვიძლის ქსოვილით.

337nm ტალღის სიგრძის ლაზერის გამოსხივებით აღგზნებული და გადაღებული ვიტამინი A-ს (რეტინოლ აცეტატი) ზეთოვანი ხსნარის, ილეუმის მონაკვეთის და ღვიძლის **LIF** სპექტრები წარმოდგენილია ნახ. 23-24 და ნაწილობრივ ნახ. 25-26.

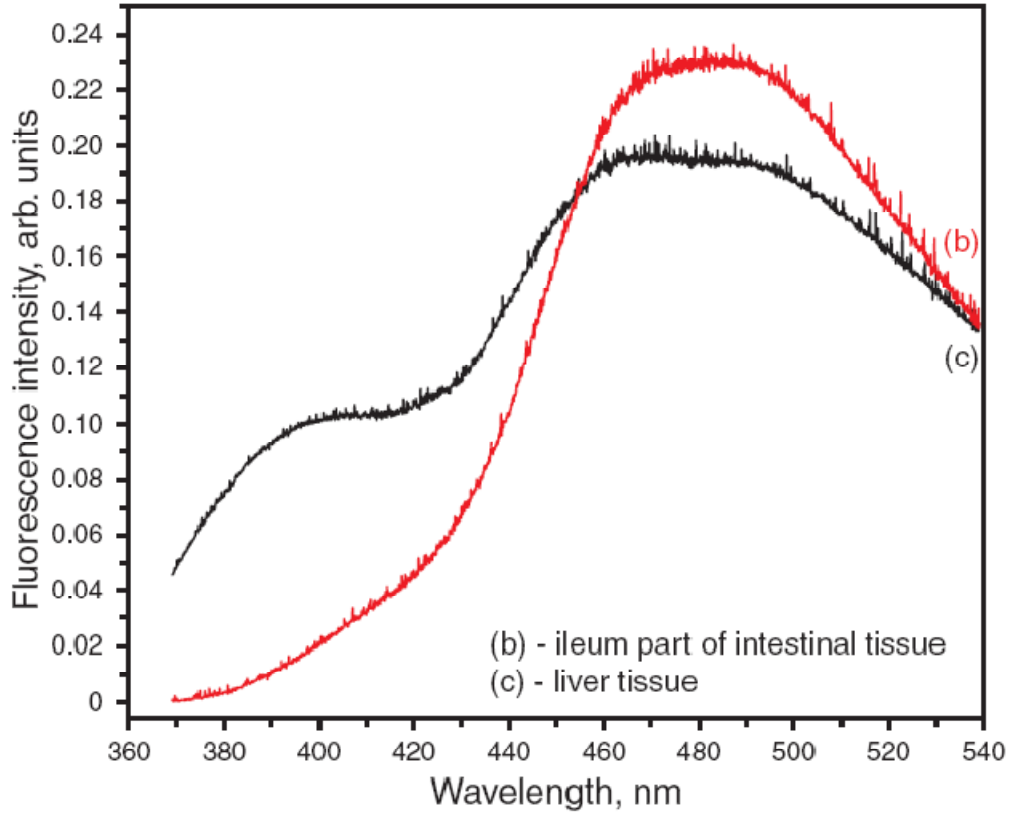
უპირველეს ყოვლისა, უნდა აღვნიშნოთ, რომ **LIF** სპექტრები პრაქტიკულად ერთმანეთის იდენტურია ქსოვილების ზედაპირების სხვადასხვა წერტილებში, როგორც ღვიძლის, ასევე ნაწლავის ილეუმის მონაკვეთისთვისაც. სხვა სიტყვებით, განსხვავებულ წერტილებში, სპექტრალური ხაზების ფორმებს შორის განსხვავებები არასდროს არ აჭარბებს 5%-ს. სპექტრალური ხაზების ამგვარი სტაბილურობა შეიძლება აიხსნას ვარსკვლავისებრ უჯრედებში ვიტამინი A-ს ერთგვაროვანი განაწილებით და თავის მხრივ ვარსკვლავისებრი უჯრედების ერთგვაროვან განაწილებაში ნაწლავის ილეუმის მონაკვეთისა და ღვიძლის ქსოვილებში.

ნახ. 23-ზე მოცემულია ვიტამინი A-ს (რეტინოლ აცეტატი) ზეთოვანი ხსნარის, **LIF** სპექტრები. ზემოთ განხილული მოდელის მიხედვით ვიტამინი A წარმოადგენს A-ტიპის მოლეკულას. მისი ინტენსივობის სპექტრალური ფუნქციის მაქსიმუმი, დაახლოებით 520nm-ია.



ნახ.23. ვიტამინი A-ს (a) (რეტინოლ აცეტატი) ზეთოვანი ხსნარის, LIF სპექტრი.

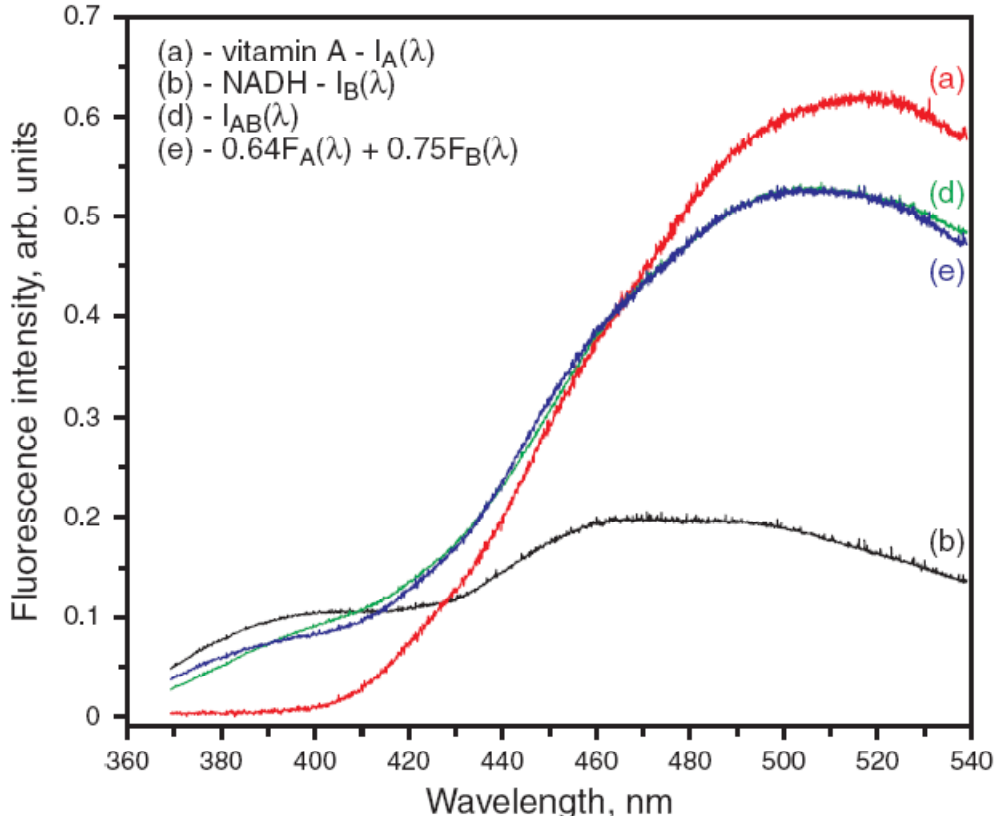
ნახ. 24 მოცემულია საკონტროლო ჯგუფის ილუმინაცია და დვიდლის ქსოვილების LIF სპექტრები. ჩვენი მოდელის მიხედვით ისინი წარმოადგენენ B-ტიპის მოლეკულებს. კარგადაა ცნობილი, რომ თუ აღსაგზნებათ ვიყენებთ 337nm ტალღის სიგრძეს, მაშინ კოლაგენი თავის ფლუორესცენციის პიკს დაახლოებით 390nm-ზე იძლევა, ხოლო NADH - 470nm-ზე [29]. შესაბამისად, ნათელია, რომ LIF სპექტრებში განსხვავებების მიუხედავად, ორივე სახეობის ქსოვილში დომინირებს კოფერმენტ NADH-ის ფლუორესცენცია 470nm-ზე მაქსიმუმით. მეორე 390nm მაქსიმუმი, როგორც ვიცით კოლაგენისაა. მარტივი სანახაგია, რომ ეს პიკი აგრეთვე ჩანს ექსპერიმენტალური ჯგუფის ილუმინაციის ნიმუშის LIF სპექტრებში და რომ არ ცვლის მის ფორმას (ნახ.25. მრუდი(d)). ამიტომ კოლაგენის LIF წვლილი მორგების პროცედურაში უგულებელყოფადია.



ნახ. 24 საკონტროლო ჯგუფის ვირთაგვების ნაწლავის ილეუმის ნაწილის და ღვიძლის ქსოვილების **LIF** სპექტრები: **NADH**-ს დამატებული კოლაგენი (b) და **NADH** (c).

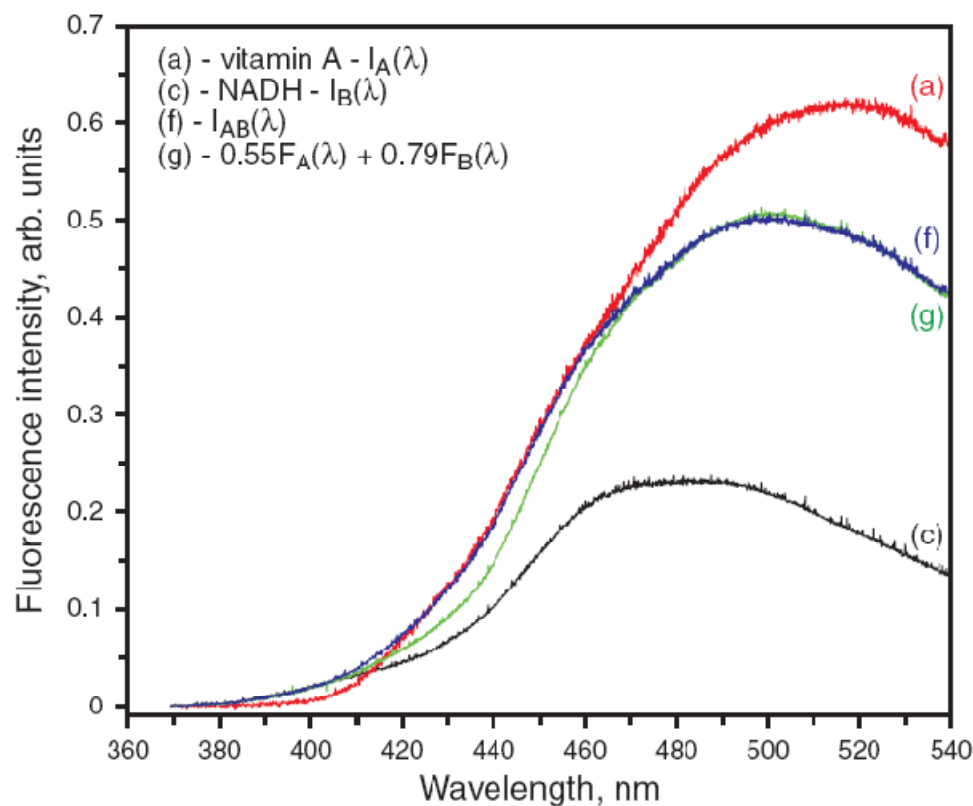
საზოგადოდ უნდა აღინიშნოს, რომ A და B-ტიპის მოლეკულების სპექტრალური ხაზების ფორმები საგრძნობლად განსხვავდებიან ერთმანეთისაგან.

ნახ. 25 მოცემულია ექსპერიმენტალური ვირთაგვების ჯგუფის ილეუმის ნიმუშის **LIF** სპექტრები (d) და მორგებული სპექტრები (e), რომლებიც მიღებულია ვიტამინი A-ს (a) **LIF** სპექტრებისა და საკონტროლო ჯგუფის ილეუმის ქსოვილის (b) **LIF** სპექტრების კომბინაციით. ნათელია, რომ თუ ავიღებთ შესაბამის სუპერპოზიციის კოეფიციენტებს -  $C_A = 0.64$  და  $C_B = 0.75$ , მაშინ  $I_{AB}(\lambda)$  ექსპერიმენტალური მრუდი კარგად თანხვდება (38)-დან გამოთვლილ თეორიულ მრუდს.



ნახ. 25. ექსპერიმენტალური ვირთავების ნაწლავების ილუმინის ნაწილის **LIF** სპექტრები (d) და მორგებული სპექტრები (e), გამოთვლილი (a) და (b) მრუდებით.

ეს შედეგი იმაზე მიუთითებს, რომ ვიტამინი A-ს ათვისების შემდეგ ნაწლავის ილუმინის ქსოვილის ვარსკვლავისებრი უჯრედების ციტოპლაზმაში ხდება მისი დეპონირება ვიტამინი A-ს ზეთოვანი წვეთების სახით [123,124]. მეტიც, ეს სპექტრები აჩვენებენ, რომ ილუმინში არ არის რაიმე მნიშვნელოვანი ურთიერთქმედება **NADH**-სა და ვიტამინი A-ს ზეთოვანი ხსნარს შორის.



ნახ. 26 ექსპერიმენტალური ჯგუფის ვირთაგვების ღვიძლის ქსოვილის **LIF** სპექტრები (f) და მორგებული სპექტრები (g), გამოთვლილი (a) და (c) მრუდებით.

ნახ. 26 მოცემულია ექსპერიმენტალური ვირთაგვების ჯგუფის ღვიძლის ნიმუშის **LIF** სპექტრები (f) და მორგებული სპექტრები (g), რომლებიც მიღებულია ვიტამინი A-ს (a) **LIF** სპექტრებისა და საკონტროლო ჯგუფის ღვიძლის ქსოვილის (c) **LIF** სპექტრების კომბინაციით. ისევე როგორც ილეუმის ქსოვილის შემთხვევაში, აქაც ნათელია, რომ  $I_{AB}(\lambda)$  ექსპერიმენტალური მრუდი კარგად თანხვდება (38)-დან გამოთვლილ თეორიულ მრუდს შესაბამისი სუპერპოზიციის კოეფიციენტების შერჩევის პირობებში -  $C_A = 0.55$  და  $C_B = 0.79$ . მორგების პროცედურის შედეგებიდან გამომდინარეობს, რომ ილეუმში ვიტამინი A-ს დაგროვებასთან ერთად იგი ასევე ვრცელდება ვირთაგვის სხეულის სხვა ორგანოებშიც [123,124]. ჩვენს შემთხვევაში ეს არის ღვიძლი, სადაც ვიტამინი A კვლავ აკუმულირდება ვარსკვლავისებურ უჯრედებში. ღვიძლშიც, ანალოგიურად, არ არის რაიმე მნიშვნელოვანი ერთიერთქმედება **NADH**-სა და ვიტამინი A-ს შორის.

ვიტამინი A-თი ნაკვები ვირთაგვების ქსოვილების 337nm ტალღის სიგრძის ლაზერის გამოსხივებით ინდუცირებული ფლუორესცენცია, 370-540nm ტალღის სიგრძეთა დიაპაზონში, ძირითადად განპირობებულია **NADH**-სა და ვიტამინი A-ს მიერ.

ვიტამინი A-ს ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენცია ნანახი იქნა ვირთაგვების, როგორც ნაწლავების ილეუმის უბნის, ასევე ღვიძლის ქსოვილებში.

სპექტრების მიღების სუპერპოზიციის პროცედურა საკონტროლო ჯგუფის ვირთაგვების ქსოვილებიდან და ვიტამინი A-ს ზეთოვანი ხსნარიდან შესაძლებლობას იძლევა მოდელირდეს ვიტამინი A-თი ნაკვები ჯგუფის ვირთაგვების ქსოვილების ფლუორესცენციის სპექტრის ხაზის ფორმები. მოდელირების პროცედურების მიხედვით სუპერპოზიციის კოეფიციენტები გვაძლევს შესაძლებლობას გამოვითვალოთ ფლუოროფორების ფარდობითი სიმკვრივე.

**LIF** სპექტროსკოპიის და სუპერპოზიციის მეთოდის გამოყენება შეიძლება ვიტამინი A-ს განაწილების და აკუმულირების დინამიკის შესასწავლად. ეს შემდგომი კვლევების საგანია.

### 3.2. დასკვნები

ნაშრომში გამოკვლეულია ოპტიკურად მღვრიე გარემოს  $\lambda=337\text{nm}$  ტალღის სიგრძის ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრები ძლიერი შთანთქმისა და მრავალჯერადი გაბნევის პირობებში. მღვრიე გარემო, როგორც წესი, შედგება ორი არაურთიერთქმედი ფლუოროფორის (კოლაგენი და **NADH** - ნიკოტინამიდ ადენინ დინუკლეოტიდი ალდეჰიდი ფორმით), სხვადასხვა ტიპის გამბნევი და მშთანთქმელი ცენტრებისაგან.

მღვრიე გარემოს კვლევის წარმოდგენილი, ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენტურ-სპექტროსკოპიული, მეთოდიკით კარგად აღიწერება ბიოლოგიური ქსოვილის ოპტიკურ-სპექტროსკოპიული თვისებები, რაც თავის მხრივ გამოყენებულ იქნა ბიოლოგიური ქსოვილების მდგომარეობების დასახასიათებლად.

მნიშვნელოვანი გამოყენებითი ხასიათის შედეგები მიღებულ იქნა ისეთი ოპტიკურად მღვრიე გარემოებისათვის, როგორებიცაა ფარისებრი ჯირკვალი, ღვიძლი და ნაწლავი.

ადამიანის ფარისებრი ჯირკვლის ნორმალური და პათოლოგიური ქსოვილის  $\lambda=337\text{nm}$  ტალღის სიგრძის ლაზერით აღზნებული ფლუორესცენციის სპექტრის შესწავლისა და ანალიზის საფუძველზე, 350-550nm დიაპაზონისათვის, მიღებულია შემდეგი შედეგები:

1.  $\lambda=337\text{nm}$  ტალღის სიგრძის ლაზერით აღზნებული, ადამიანის ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილის, ფლუორესცენციის სპექტრის ძირითად წვლილს იძლევა ისეთი ორი ენდოგენური ფლუოროფორი, როგორებიცაა **NADH** კომპლექსი და კოლაგენი.
2. ვინაიდან ზემოთხსენებული ფლუოროფორების ინდუცირებული გამოსხივების სპექტრალური უბნები ერთმანეთს ემთხვევა, ამიტომ მოდიფიკაციის ფუნქციის სახე მათთვის ერთნაირია და ჯამურ სპექტრალურ ფორმას ფლუოროფორების და მშთანთქმელების კონცენტრაციები განსაზღვრავენ.
3. დადგენილ იქნა ადამიანის ფარისებრი ჯირკვლის ნორმალური ქსოვილის ფლუორესცენციის სპექტრალური ხაზის ფორმა.



4. გაზომილია და დადგენილია ადამიანის ფარისებრი ჯირკვლის, ჩიყვის, ადენომის და სხვაგასხვა ტიპის კარცინომების პათოლოგიური ქსოვილების დამახასიათებელი ლაზერით ინდუცირებული ფლუორესცენციის სპექტრები.
5. ბიოლოგიური ქსოვილის მდგომარეობა აღიწერება ქსოვილის სუფთა მდგომარეობების (ნორმალური და პათოლოგიური) წრფივი სუპერპოზიციით, რაც ყოველ კონკრეტულ შემთხვევაში, იძლევა ქსოვილის გადაგვარების სახეობისა (ჩიყვი, ადენომის, სხვაგასხვა ტიპის კარცინომების) და ხარისხის დადგენის საშუალებას (დაავადების კლინიკური სტადიის განსაზღვრა).
6. რიგ შემთხვევებში, ფარისებრი ჯირკვლის ქსოვილში ორი განსხვავებული პათოლოგიის თანაარსებობა, ოპტიკურად, პირველად ჩვენ დავაფიქსირეთ.
7. ლაზერის სხივით ქსოვილის ზედაპირის სკანირება შესაძლებელს ხდის დადგინდეს ქსოვილის სხვადასხვა გადაგვარების ხარისხის მქონე არეების ზომები.

ვირთაგვების ქსოვილებში ბუნებრივი გზით შეყვანილი ეგზოგენური ფლუოროფორის (ვიტამინი A)  $\lambda=337\text{nm}$  ტალღის სიგრძის ლაზერით აღზნებული ფლუორესცენციის სპექტრის შესწავლისა და ანალიზის საფუძველზე, 370-540nm დიაპაზონისათვის, მიღებულია შემდეგი შედეგები:

8. ვიტამინი A-თი ნაკვები ვირთაგვების ნაწლავებისა და ღვიძლის ქსოვილების 337nm ტალღის სიგრძის ლაზერის გამოსხივებით ინდუცირებული ფლუორესცენცია, 370-540nm ტალღის სიგრძეთა დიაპაზონში, ძირითადად განპირობებულია **NADH**-სა და ვიტამინი A-ს ფლუორესცენციებით.
9. ვიტამინი A-თი ნაკვები ვირთაგვების ნაწლავისა და ღვიძლის ქსოვილებში ფლუორესცენციით დაფიქსირებულ იქნა ვიტამინი A-ს კვალი, რისი საშუალებითაც დადგინდა მისი რაოდენობრივი მახასიათებლები და მათი ცვლილება დროში (დაგროვების და გაწოვის დინამიკა).

## გამოყენებული ლიტერატურა

1. K. Koing, "Clinical multiphoton tomography," *J. Biophoton.* **1**, No. 1, 13–23 (2008).
2. John Pickrell, 9 August 2005, Sources: World Health Organisation / Centers for Disease Control and Prevention, US / Cancer Research UK. Information is available at [www.newscientist.com/channel/health/cancer](http://www.newscientist.com/channel/health/cancer).
3. M. Chandra, J. Scheiman, D. Heidt, D. Simeone, B. McKenna, and M-A. Mycek, "Probing pancreatic disease using tissue optical spectroscopy," *J. Biomed. Opt.* **12**, 060501 (2007).
4. This information is available at [www.cordis.europa.eu/lifescihealth/home.html](http://www.cordis.europa.eu/lifescihealth/home.html).
5. T. P. Yeo, R. H. Hruban, S. D. Leach, R. E. Wilentz, T. A. Sohn, S. E. Kern, C. A. Iacobuzio-Donahue, A. Maitra, M. Goggins, M. I. Canto, R. A. Abrams, D. Laheru, E. M. Jaffee, M. Hidalgo, and C. J. Yeo, "Pancreatic cancer," *Curr. Probl Cancer* **26**, 176–275 (2002).
6. J.W. Tunnell, A.E. Desjardins, L. Galindo, I. Georgakoudi, S.A. McGee, J. Mirkovic, M.G. Mueller, J. Nazemi, F.T. Nguyen, A. Wax, Q. Zhang, R.R. Dasari, and Michael S. Feld, "Instrumentation for Multi-modal Spectroscopic Diagnosis of Epithelial Dysplasia," *Technol Cancer Res Treat.* **2**, 505-514 (2003).
7. H . Yoon, A. Martin, R. Benamouzig, E. Longchamppt, J. Deyra, S. Chaussade pour le groupe d'etude APACC. Reproductibilite inter-observateurs du diagnostic anatomo-pathologique des polypes colorectaux. Données des centres participant a l'etude APACC (full text in english on [www.e2med.com/gcb](http://www.e2med.com/gcb)). *Gastroenterol Clin Biol* **26**, 220-224 (2002).
8. A. Frasoldati, M. Flora, M. Pesenti, A. Carrogio, and R. Valcavi, "Computer-Assisted Cell Morphometry and Ploidy Analysis in the Assesment of Thyroid Follicular Neoplasms," *Thyroid* **11**, No. 10, 941-945 (2001).
9. Science & Technology Center in Ukraine, *Catalogue of Technologies of Academy of Technological Science of Ukraine*, "Technology for Early Diagnosis of Malignant Tumors in Humans," 34 (2005). (Available at: [www.stcu.int/documents/publications](http://www.stcu.int/documents/publications)).
10. W. Demtroder, *Laser Spectroscopy. Basic Concepts and Instrumentation*, 3<sup>rd</sup> Edition (Springer, Berlin, 2003).

11. J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3<sup>rd</sup> Edition (Springer, New York, 2006).
12. N. Ramanujam, Fluorescence Spectroscopy In Vivo, in *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, R.A. Meyers (Ed.), 20-56 (Wiley & Sons, Chichester, 2000).
13. G.I. Zonios, R.M. Cothren, J.T. Arendt, J. Wu, J. Van Dam, J.M. Crawford, R. Manoharan, and M.S. Feld, "Morphological Model of Human Colon Tissue Fluorescence," *IEEE Trans Biomed Eng* **43**, No 2, 113-122 (1996).
14. I. Georgakoudi, B.C. Jacobson, M.G. Muller, E.E. Sheets, K. Badizadegan, D.L. Carr-Locke, C.P. Crum, C.W. Boone, R.R. Dasari, J. Van Dam, and M.S. Feld "NAD(P)H and collagen as in vivo quantitative fluorescent biomarkers of epithelial precancerous changes," *Cancer Res.* **62**, 682-687 (2002).
15. I. Georgakoudi, "The color of cancer," *J. Luminescence* **119–120**, 75-83 (2006).
16. L. T. Perelman, V. Backman, M. B. Wallace, G. Zonios, R. Manoharan, A. Nusrat, S. Shields, M. Seiler, C. Lima, T. Hamano, I. Itzkan, J. Van Dam, J. M. Crawford, and M. S. Feld, "Observation of Periodic Fine Structure in Reflectance from Biological Tissue: A New Technique for Measuring Nuclear Size Distribution," *Phys. Rev.Lett.* **80**, 627-630 (1998).
17. V. Backman, M. B. Wallace, L. T. Perelman, J. T. Arendt, R. Gurjar, M. G. Muller, Q. Zhang, G. Zonios, E. Kline, J. A. McGilligan, S. Shapshay, T. Valdez, K. Badizadegan, J. M. Crawford, M. Fitzmaurice, S. Kabani, H. S. Levin, M. Seiler, R. R. Dasari, I. Itzkan, J. Van Dam, M. S. Feld, and T. McGilligan, "Detection of Preinvasive Cancer Cells," *Nature* **406**, 35-36 (2000).
18. M. G. Muller, I. Georgakoudi, Q. Zhang, J. Wu, and M. S. Feld, "Intrinsic Fluorescence Spectroscopy in Turbid Media: Disentangling Effects of Scattering and Absorption," *Applied Optics* **40**, 4633-4646 (2001).
19. Q. Zhang, M. G. Muller, J. Wu, and M. S. Feld, "Turbidity-free Fluorescence Spectroscopy of Biological Tissue," *Opt. Lett.* **25**, 1451-1453 (2000).
20. R.S. Bradley and M.S. Thorniley, "A review of attenuation correction techniques for tissue fluorescence," *J. R. Soc. Interface* **3**, 1-13 (2006).
21. J.R. Mourant, J.P. Freyer, A.H. Hielscher, A.A. Eick, D. Shan, and T.M. Johnson, "Mechanisms of light scattering from biological cells relevant to

- noninvasive optical-tissue diagnostics,” *Applied Optics* **37**, No16, 3586-3593 (1998).
22. A. Uppal, N. Ghosh, A. Datta, and P.K. Gupta, “Fluorimetric estimation of the concentration of NADH from human blood samples,” *Biotechnol. Appl. Biochem.* **41**, 43-47 (2005).
  23. S. Kukreti, A. Cerussi, B. Tromberg, and E. Gratton, “Intrinsic tumor biomarkers revealed by novel double-differential spectroscopic analysis of near-infrared spectra,” *J. Biomed. Opt.* **12**, 020509 (2007).
  24. Q. Fang, T. Papaioannou, J.A. Jo, R. Vaitha, and K. Shastry, and L. Marcu, Time-domain laser-induced fluorescence spectroscopy apparatus for clinical diagnostics, *Review of Scientific Instruments*, vol. 75, 151-162 (2004)
  25. Y. Wu and J.Y. Qu, “Combined depth- and time-resolved autofluorescence spectroscopy of epithelial tissue,” *Opt. Lett.* **31**, 1833–1835 (2006).
  26. A.K. Sankarankutty, O. Castro e Silva, Jr., J. Ferreira, M.E.J. Souza, M.C. Gomes, C. Kurachi, and V.S. Bagnato, “Use of laser auto-fluorescence for evaluating liver grafts,” *Laser Phys. Lett.* **3**, No. 11, 539-545 (2006).
  27. A. Rex and F. Fink, “Applications of laser-induced fluorescence spectroscopy for the determination of NADH in experimental neuroscience,” *Laser Phys. Lett.* **3**, No 9, 452-459 (2006).
  28. K.T. Akhmeteli, E.N. Ekaladze, Z.V. Jaliashvili, T.D. Medoidze, Z.G. Melikishvili, N.Z. Merkviladze, M.B. Papava, and P.R. Tushurashvili, “Study of vitamin A distribution in rats by laser induced fluorescence,” *Laser Phys. Lett.* **5**, No 6, 471-475 (2008).
  29. Z.V. Jaliashvili, T.D. Medoidze, K.M. Mardaleishvili, J.J. Ramsden, and Z.G. Melikishvili, “Laser induced fluorescence model of human goiter,” *Laser Phys. Lett.*, **5**, No 3, 217-219 (2008).
  30. G.K. Giorgadze, Z.V. Jaliashvili, K.M. Mardaleishvili, T.D. Medoidze, and Z.G. Melikishvili, “Measurement of the abnormality degree in the biological tissue by the laser induced fluorescence,” *Laser Phys. Lett.*, **3**, No 2, 89-91 (2006).
  31. Mourant, J.R., Bigio, I., Boyer, J., Johnson, T.M., and Lacey, J., Elastic scattering spectroscopy as a diagnostic for differentiating pathologies in the gastrointestinal tract: preliminary testing, *J. Biomed. Opt.*, 1, 1, 1996.

32. Mourant, J.R., Bigio, I., Boyer, J., Conn, R., Johnson, T.M., and Shimada T., Spectroscopic diagnosis of bladder cancer with elastic scattering spectroscopy, *Lasers Surg. Med.*, 17, 350, 1995.
33. V.P. Wallace, D.C. Crawford, P.S. Mortimer, R.G. Ott and J.C. Bamber, Spectrophotometric assessment of pigmented skin lesions: methods and feature selection for evaluation of diagnostic performance, *Physics in Medicine and Biology*, vol. 45, 735-751 (2000).
34. Wallace, V., Bamber, J., Crawford, D., Ott, R., and Mortimer, P., Classification of reflectance spectra from pigmented skin lesions, a comparison of multivariate discriminant analysis and artificial neural networks, *Phys. Med. Biol.*, 45, 2859, 2000.
35. Bigio, I., Bown, S., Briggs, G., Kelley, C., Lakhani, S., Rickard, D., Ripley, P., Rose, I., and Saunders, C., Diagnosis of breast cancer using elastic-scattering spectroscopy: preliminary clinical results, *J. Biomed. Opt.*, 5, 221, 2000.
36. Ge, Z., Schomacker, K.T., and Nishioka, N.S., Identification of colonic dysplasia and neoplasia by diffuse reflectance spectroscopy and pattern recognition techniques, *Appl. Spectrosc.*, 52, 833, 1998.
37. Ramanujam, N., Fluorescence spectroscopy of neoplastic and non-neoplastic tissues, *Neoplasia*, 2, 89, 2000.
38. Wagnières, G.M., Star, W.M. and Wilson, B.C., *In vivo* fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications, *Photochem. Photobiol.*, 68, 603, 1998.
39. Panjehpour, M., Overholt, B., Vo-Dinh, T., Haggit, R., Edwards, D., and Buckley, F., Endoscopic fluorescence detection of high-grade dysplasia in Barrett's esophagus, *Gastroenterology*, 111, 93, 1996.
40. Mycek, M., Schomacker, K., and Nishioka, N., Colonic polyp differentiation using time-resolved autofluorescence spectroscopy, *Gastrointest. Endosc.*, 48, 390, 1998.
41. Schomacker, K.T., Frisoli, J.K., Compton, C.C., Flotte, T.J., Richter, J.M., Nishioka, N.S., and Deutsch, T.F., Ultraviolet laser-induced fluorescence of colonic tissue: basic biology and diagnostic potential, *Lasers Surg. Med.*, 12, 63, 1992.

42. Ramanujam, N., Mitchell, M.F., Mahadeevan, A., Thomsen, S., Malpica, A., Wright, T., Atkinson, N., and Richards-Kortum, R., Development of a multivariate statistical algorithm to analyze human cervical tissue fluorescence spectra acquired *in vivo*, *Lasers Surg. Med.*, 19, 46, 1996.
43. Nordstrom, R.J., Burke, L., Niloff, J., and Myrtle, J.F., Identification of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) using UV-excited fluorescence and diffuse reflectance tissue spectroscopy, *Lasers Surg. Med.*, 29, 118, 2001.
44. Georgakoudi, I., Sheets, E.E., Müller, M.G., Backman, V., Crum, C.P., Badizadegan, K., Dasari, R.R., and Feld, M.S., Tri-modal spectroscopy for the detection and characterization of cervical precancers *in vivo*, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 186, 374, 2002.
45. Brancalion, L., Durkin, A.J., Tu, J.H., Menaker, G., Fallon, J.D., and Kollias, N., *In vivo* fluorescence spectroscopy of nonmelanoma skin cancer, *Photochem. Photobiol.*, 73, 178, 2001.
46. Anidjar, M., Cussenot, O., Avrillier, S., Etori, D., Teillac, P., and LeDuc, P., The role of laser-induced autofluorescence spectroscopy in bladder tumor detection, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 838, 130, 1998.
47. Gillenwater, A., Jacob, R., Baneshappa, R., Kemp, B., El-Naggar, A., Palmer, J., Clayman, G., Mitchell, M.F., and Richards-Kortum, R., Noninvasive diagnosis of oral neoplasia based on fluorescence spectroscopy and native tissue autofluorescence, *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.*, 124, 1251, 1998.
48. Müller, M.G., Valdez, T., Georgakoudi, I., Backman, V., Fuentes, C., Kabani, S., Laver, N., Boone, C., Dasari, R., Shapsay, S., and Feld, M.S., Tri-modal spectroscopy: a new technique for detecting and evaluating early human oral cancer, in review.
49. Lam, S., Kennedy, T., Unger, M., Miller, Y., Gelmont, D., Rusch, V., Gipe, B., Howard, D., LeRiche, J., Coldman, A., and Gazdar, A., Localization of bronchial intraepithelial neoplastic lesions by fluorescence bronchoscopy, *Chest*, 113, 696, 1998.
50. Goujon, D., Glanzmann, T., Gabrecht, T., Zellweger, M., Radu, A., van den Bergh, H., Monnier, P., and Wagnières, G.A., Detection of early bronchial carcinoma by imaging of the tissue autofluorescence, in *Diagnostic Optical Spectroscopy in Biomedicine, Proc. SPIE*, Munich, Germany, 2001.

51. Richards-Kortum, R., Rava, R.P., Fitzmaurice, M., Tong, L., Ratliff, N.B., Kramer, J., and Feld, M.S., A one-layer model of laser induced fluorescence for diagnosis of disease in human tissue: applications to atherosclerosis, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, 36, 1222, 1989.
52. Ramanujam, N., Mitchell, M., Mahadevan, A., Warren, S., Thomsen, S., Silva, E., and Richards-Kortum, R., *In vivo* diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337-nm-excited laserinduced fluorescence, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 91, 10193, 1994.
53. Ince, C., Coremans, J.M.C.C., and Bruining, H.A., *In vivo* NADH fluorescence, *Adv. Exp. Med. Biol.*, 317, 277, 1992.
54. J. Wu, M.S. Feld, and R. P. Rava, *Analytical model for extracting intrinsic fluorescence in turbid media*, *Appl. Opt.* **32**, 3585-3595 (1993).
55. Gardner, C.M., Jacques, S.L., and Welch, A.J., Fluorescence spectroscopy of tissue: recovery of intrinsic fluorescence from measured fluorescence, *Appl. Opt.*, 35, 1780, 1996.
56. Durkin, A.J., Jaikumar, S., Ramanujam, N., and Richards-Kortum, R., Relation between fluorescence-spectra of dilute and turbid samples, *Appl. Opt.*, 33, 414, 1994.
57. Finlay, J.C., Conover, D.L., Hull, E.L., and Foster, T.H., Porphyrin bleaching and PDT-induced spectral changes are irradiance dependent in ALA sensitized normal rat skin *in vivo*, *Photochem. Photobiol.*, 73, 54, 2001.
58. Zhadin, N.N. and Alfano, R.R., Correction of the internal absorption effect in fluorescence emission and excitation spectra from absorbing and highly scattering media: theory and experiment, *J. Biomed. Opt.*, 3, 171, 1998.
59. Patterson, M.S. and Pogue, B.W., Mathematical model for time-resolved and frequency-domain fluorescence spectroscopy in biological tissues, *Appl. Opt.*, 33, 1963, 1994.
60. M.G. Müller, I. Georgakoudi, Q. Zhang, J. Wu, and M.S. Feld, "Intrinsic fluorescence spectroscopy in turbid media: disentangling effects of scattering and absorption," *Appl Opt.* **40**, 4633-4646, (2001).
61. Georgakoudi, I., Jacobson, B., Van Dam, J., Backman, V., Wallace, M.B., Müller, M.G., Zhang, Q., Badizadegan, K., Sun, D., Thomas, G.A., Perelman, L.T., and Feld, M.S., Fluorescence, reflectance and light scattering

spectroscopy for evaluating dysplasia in patients with Barrett's esophagus, *Gastroenterology*, 120, 1620, 2001.

62. G. Zonios, L.T. Perelman, V. Backman, R. Manoharan, M. Fitzmaurice, J. Van Dam, and M.S. Feld, "Diffuse reflectance spectroscopy of human adenomatous colon polyps *in vivo*," *Appl. Opt.* **38**, 6628-6637 (1999).
63. Utzinger, U., Brewer, M., Silva, E., Gershenson, D., Blast, R.C., Follen, M., and Richards-Kortum, R., Reflectance spectroscopy for *in vivo* characterization of ovarian tissue, *Lasers Surg. Med.*, 28, 56, 2001.
64. Anderson, R.R. and Parrish, J.A., The optics of human skin, *J. Invest. Dermatol.*, 77, 13, 1981.
65. Dawson, J.B., Barker, D.J., Ellis, D.J., Grassam, E., Cotterill, J.A., Fisher, G.W., and Feather, J.W., A theoretical and experimental study of light absorption and scattering by *in vivo* skin, *Phys. Med. Biol.*, 25, 695, 1980.
66. Hajizadeh-Saffar, M., Feather, J.W., and Dawson, J.B. An investigation of factors affecting the accuracy of *in vivo* measurements of skin pigments by reflectance spectrophotometry, *Phys. Med. Biol.*, 35, 1301, 1990.
67. Farina, B., Bartoli, C., Bono, A., Colombo, A., Lualdi, M., Tragni, G., and Marchesini, R., Multispectral imaging approach in the diagnosis of cutaneous melanoma: potentiality and limits, *Phys. Med. Biol.*, 45, 1243, 2000.
68. Wallace, M., Perelman, L.T., Backman, V., Crawford, J., Fitzmaurice, M., Seiler, M., Badizadegan, K., Shields, S., Itzkan, I., Dasari, R.R., Van Dam, J., and Feld, M.S., Endoscopic detection of dysplasia in patients with Barrett's esophagus using light-scattering spectroscopy, *Gastroenterology*, 119, 677, 2000.
69. Watson, J.V., *Introduction to Flow Cytometry*, Cambridge University Press, Cambridge, U.K., 1991.
70. Sokolov, K., Drezek, R., Gossage, K., and Richards-Kortum, R., Reflectance spectroscopy with polarized light: is it sensitive to cellular and nuclear morphology? *Opt. Express*, 5, 302, 1999.
71. Mourant, J.R., Canpolat, M., Brocker, C., Esponda-Ramos, O., Johnson, T.M., Matanock, A., Stetter, K., and Freyer, J.P., Light scattering from cells: the contribution of the nucleus and the effects of proliferative status, *J. Biomed. Opt.*, 5, 131, 2000.



72. Drezek, R., Dunn, A., and Richards-Kortum, R., Light scattering from cells: finite-difference timedomain simulations and goniometric measurements, *Appl. Opt.*, 38, 3651, 1999.
73. Yodh, A. and Chance, B., Spectroscopy and imaging with diffusing light, *Phys. Today*, 48, 34, 1995.
74. Backman, V., Gurjar, R., Badizadegan, K., Itzkan, I., Dasari, R., Perelman, L.T., and Feld, M.S., Polarized light scattering spectroscopy for quantitative measurement of epithelial cellular structures, *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, 5, 1019, 1999.
75. Canpolat, M. and Mourant, J.R., Particle size analysis of turbid media with a single optical fiber in contact with the medium to deliver and detect white light, *Appl. Opt.*, 40, 3792, 2001.
76. Newton, R.G., *Scattering Theory of Waves and Particles*, McGraw-Hill, New York, 1969.
77. Brunsting, A. and Mullaney, F., Differential light scattering from spherical mammalian cells, *Biophys. J.*, 14, 439, 1974.
78. H. C. van de Hulst, *Light Scattering by Small Particles* (John Wiley and Sons, New York, 1957).
79. ზ. კაციტაძე, *ადამიანის ანატომია*, II ნაწილი (განათლება, თბილისი, 1988).
80. M. Fox, *Optical Properties of Solids*, (Oxford University Press, New York, 2001).
81. G.R. Osche, *Optical Detection Theory for Laser Applications* (Wiley-VCH, 2002).
82. O. Svelto, *Principles of Lasers*, 4<sup>th</sup> Ed. (Springer, New York, 1998).
83. J.R. Lakowicz, B. Shen, Z. Cryczynski, S D’Auria and I. Cryczynski, Intrinsic Fluorescence from DNA Can Be Enhanced by Mettalic Particles, *Biochemical and Biophysical Research Communications* **286**, 875-879 (2001).
84. H. Frauenfelder, *Physics of Proteins*, unpublished lecture notes available online at: [www.phy.princeton.edu/%7Eaustin/hf\\_book/hfbook.html](http://www.phy.princeton.edu/%7Eaustin/hf_book/hfbook.html), უკანასკნელად იქნა გადამოწმებული – 20.06.2008.
85. J.R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd Ed., (Kluwer Academic/Plenum Publisher, New York, 1999).

86. I. Georgakoudi, J.T. Motz, V. Backman, G. Angheloiu, A.S. Haka, M. Müller, R. Dasari, M.S. Feld, “Quantitative Characterization of Biological Tissue Using Optical Spectroscopy,” in: T. Vo-Dinh (Ed.), *Biomedical Photonics Handbook*, vol. 31, CRC Press, Boca Raton, 2003, pp. 1-33.
87. I. Georgakoudi, “The color of cancer,” *J. Lumin.* **119-120**, 75–83 (2006).
88. C. Cohen-Tannoudji, J. Dupont-Roc, and G. Grynberg, *Atom-Photon Interactions* (Wiley, New York, 1992).
89. M.O. Scully and M.S. Zubairy, *Quantum Optics* (Cambridge University Press, Cambridge, 1997).
90. N.B. Delone, V.P. Krainov, *Atoms in Strong Light Fields* (Springer, Berlin, 1985).
91. J. Wu, F. Partovi, M.S. Feld, and R. P. Rava, Diffuse reflectance from turbid media: an analytical model of photon migration, *Appl. Opt.* **32**, 1115-1121 (1993).
92. J. W. Goodman, “Statistics properties of laser speckle patterns,” in *Laser Speckle and Related Phenomenon*, J. C. Dainty, Ed., pp. 9–75 (Springer, Berlin, 1975).
93. J. Li, G. Yao, L.V. Wang, “Degree of polarization in laser speckles from turbid media: Implications in tissue optics,” *J. Biomed. Opt.* **7**, 317-312 (2002).
94. R.S. Cotran, S.L. Robbins and V. Kumar, *Robbins pathological basis of disease* (W.B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania, 1994).
95. R.S. Gurjar, V. Backman, L.T. Perelman, I. Georgakoudi, K. Badizadegan, I. Itzkan, R.R. Dasari, and M.S. Feld, Imaging human epithelial properties with polarized light-scattering spectroscopy, *Nature Medicine*, v. 7, 1245-1248 (2001).
96. A.D. Kim, Transport theory for light propagation in biological tissue, *Journal of the Optical Society of America A* **21**, 820-827 (2004).
97. Y.L. Kim, Y. Liu, R.K. Wali, H.K. Roy, M.J. Goldberg, A.K. Kromin, K. Chen, and V. Backman, Simultaneous Measurement of Angular and Spectral Properties of Light Scattering for Characterization of Tissue Microarchitecture and Its Alteration in Early Precancer, *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 9, 243-256 (2003).
98. A.K. Popp, M.T. Valentine, P.D. Kaplan, and David A. Weitz, Microscopic origin of light scattering in tissue, *Applied Optics*, vol. 42, 2871-2880 (2003).

99. V. Backman, V. Gopal, M. Kalashnikov, K. Badizadegan, R. Gurjar, A. Wax, I. Georgakoudi, M. Muller, C.W. Boone, R.R. Dasari, and M.S. Feld, Measuring Cellular Structure at Submicrometer Scale with Light Scattering Spectroscopy, *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics*, vol. 7, 887-893 (2001).
100. J.B. Fishkin, O. Coquoz, E.R. Anderson, M. Brenner, and B.J. Tromberg, Frequency-domain photon migration measurements of normal and malignant tissue optical properties in a human subject, *Applied Optics*, vol.36, 10-20 (1997).
101. R.E.N. Shehada, V.Z. Marmarelis, H.N. Mansour, and W.S. Grundfest, Laser induced fluorescence attenuation spectroscopy: detection of hypoxia, *IEEE Transactions of Biomedical Engineering*, vol. 47, 301-312 (2000).
102. Z. Huang, W. Zheng, S. Xie, R. Chen, Z. Zeng, D.I. McLean and H. Lui, Laser-induced autofluorescence microscopy of normal and tumor colonic tissue, *International Journal of Oncology*, vol. 24, 59-63 (2004).
103. J.M. Song, R. Jagannathan, D.L. Stokes, P.M. Kasili, M. Panjepour, M.N. Phan, B.F. Overholt, R.C. DeNovo, X. Pan, R.J. Lee, T. Vo-Dihn, Development of a fluorescence detection system using optical parametric oscillator (OPO) laser excitation for *in vivo* diagnosis, *Technology in Cancer research & Treatment*, vol. 2, 515-523 (2003).
104. A. Uppal and P.K. Gupta, Measurement of NADH concentration in normal and malignant human tissues from breast and oral cavity, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, vol. 37, 45-50 (2003).
105. კოლაგენის ბადის სტრუქტურა და დინამიკა იხილეთ მერილენდის უნივერსიტეტის შემდეგ საიტზე:  
[www.ireap.umd.edu/losertlab/collagen/index.htm](http://www.ireap.umd.edu/losertlab/collagen/index.htm), ukanasknelad iqna gadamowmebuli – 20.06.2008.
106. B.R. Masters and P.T.C. So, Confocal microscopy and multi-photon excitation microscopy of human skin *in vivo*, *Optics Express*, vol. 8, 3-10 (2001).
107. C. Xu, W. Zipfel, J. B. Shear, R.M. Williams, and W.W. Webb, Multiphoton fluorescence excitation: New spectral windows for biological nonlinear microscopy, *Proceedings of National Academy of Sciences of USA*, vol.93, 10763-10768 (1996). (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*).

108. Z.V. Jaliashvili, T.D. Medoidze, Z.G. Melikishvili, K.M. Mardaleishvili, and J.J. Ramsden, Real time noninvasive cancer diagnostics, Los Alamos electronic reprint archive (Physics/Medical Physics) paper number physics/0502102 (22 Feb 2005), accessible via the world wide web at <http://lanl.arxiv.org/abs/physics/0502102>, უკანასკნელად იქნა გადამოწმებული – 20.06.2008.
109. Z.V. Jaliashvili, T.D. Medoidze, Z.G. Melikishvili, K.M. Mardaleishvili, and J.J. Ramsden, Laser-excited fluorescence from normal and abnormal human thyroid cells: a pilot study. *Laser Physics Letters*, vol.1, 521-524 (2004).
110. V.B. Loschenov, V.I. Konov, and A.M. Prokhorov, *Laser Phys.* 10, 1188 (2000).
111. K. Sokoklov, L.T. Nieman, A. Myakov, and A. Gillenwatter, *Technology in Cancer research & Treatment*, vol. 3, 1 (2004).
112. R.R. Alfano, G.C. Tang, A. Pradham, et al., *IEEE J. Quantum Electron.* 23, 1806 (1987).
113. G. Yoon, A.J. Welch, M. Motamedi, and M.C.J. Van Germert. Development and Application of Three-Dimensional Light Distribution Model for Laser Irradiated Tissue. *IEEE Journal of Quantum Electronics*, QE-23, 1721-1733(1987).
114. S.L. Jaques, in: Proceedings of the International Symposium on Lasers in Dermatology, Ulm, Fed. Rep. of Germany, 1989 (Springer, Berlin, 1991), pp. 1-21.
115. A.S. Volkov, S.E. Kumekov, E.O. Syrgaliev, and S.V. Chernyshov, *Biofisika* 36, 770 (1991), (in Russian).
116. H. Kand'arov'a, H. Richter, M. Liebsch, and J. Lademann, *Laser Phys. Lett.* 4, 308–311 (2007).
117. C. Stuesson, Medical Laser-Induced Thermo-therapy – Models and Applications, Lund Reports on Atomic Physics LRAP-235, Doctoral Thesis (Lund Institute of Technology, Lund, 1998).
118. L. Michalik and W. Wahli, *Cell* 129, 649–651 (2007).
119. V. Laudet and H. Gronemeyer, *The Nuclear Receptor Facts- Book* (Academic Press, London, 2002).
120. H. Senoo, *Med. Electron Microsc.* 37, 3–15 (2004).

121. R. Blomhoff, M. Rasmussen, A. Nilsson, K.R. Norum, T. Berg, W.S. Blaner, M. Kato, J.R. Mertz, D.S. Goodman, and U. Eriksson, *J. Biol. Chem.* **260**, 13560–13565 (1985).
122. K. Wake, *J. Cell Biol.* **63**, 683–691 (1974).
123. N.E. Nagy, K.B. Holven, N. Roos, H. Senoo, N. Kojima, K.R. Norum, and R. Blomhoff, *J. Lipid Res.* **38**, 645–658 (1997).
124. T. Fujimoto and Y. Ohsaki, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1086**, 104–115 (2006).
125. National Research Council, *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 7-th. ed. (National Academy Press, Washington, D.C., 1996).