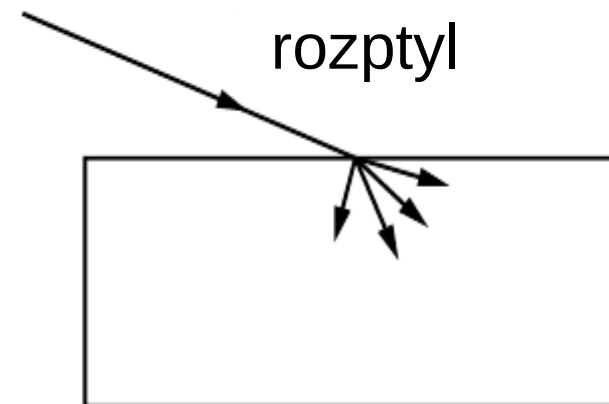
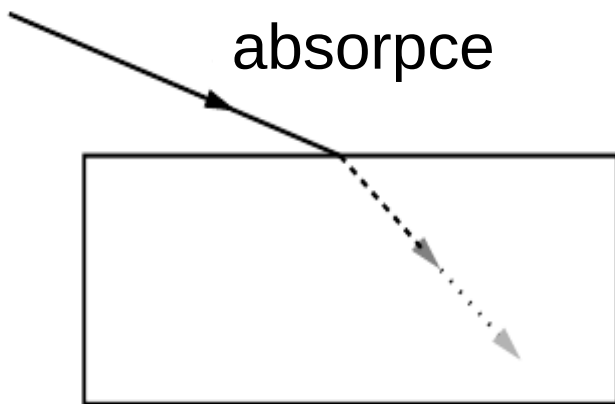
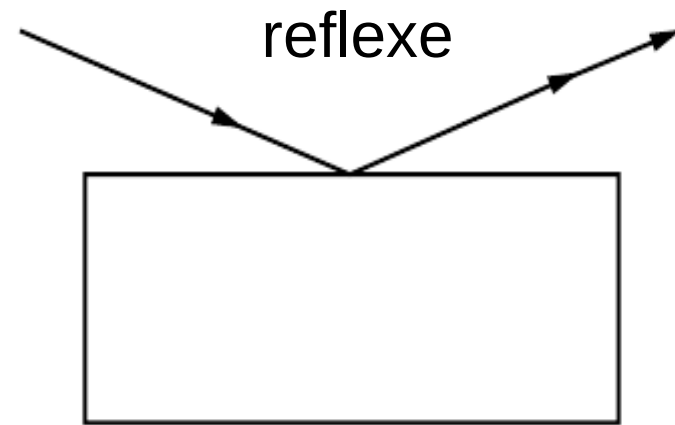
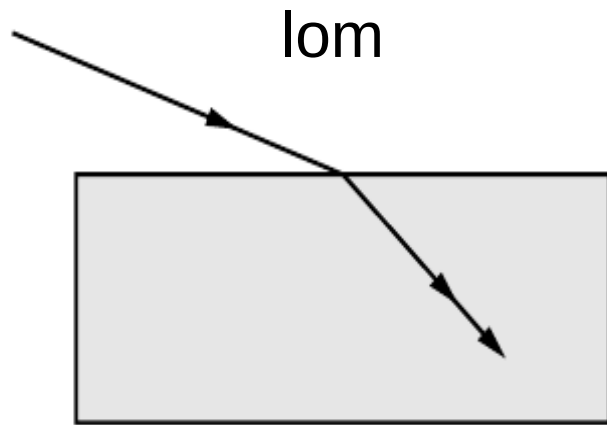


4. Interakce světla a tkáně, spektroskopie

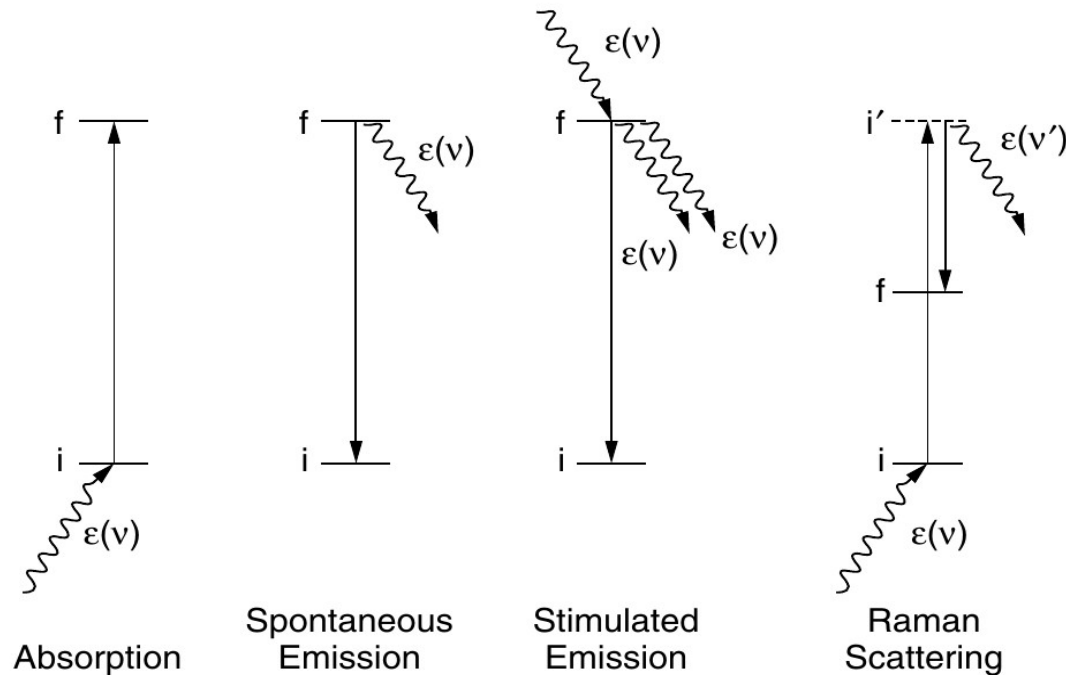
Interakce světla



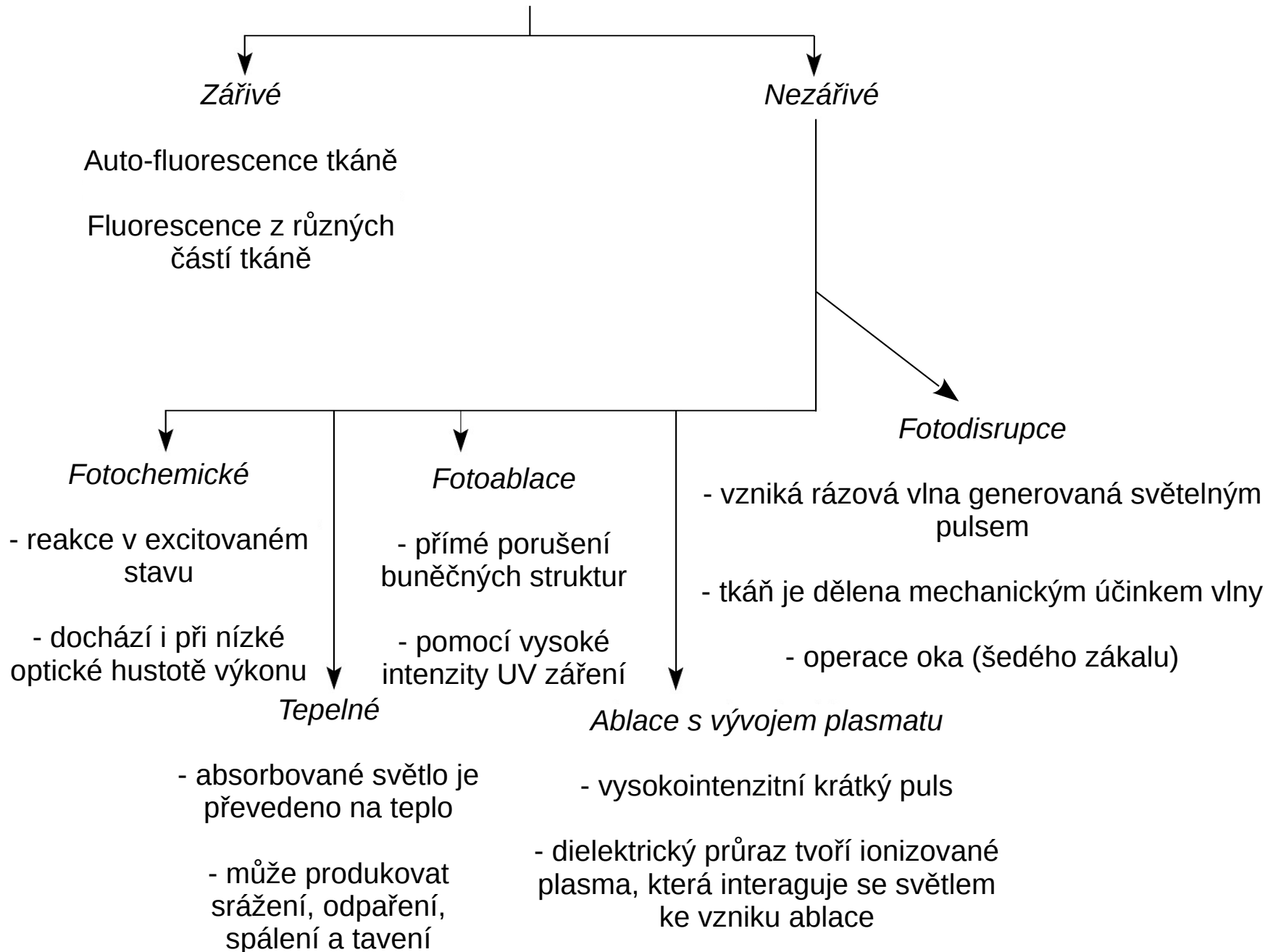
Interakce světlo – hmota

Interakce světlo-hmota lze z pohledu přestupu energie rozdělit

- Absorbce fotonu
- Spontální emise fotonu
- Stimulovaná emise fotonu
- Ramanův rozptyl - produkuje fotony s energií (frekvencí) rozdílnou od energie (frekvence) dopadajícího fotonu.



Interakce světlo – tkáň



Rozptyl světla

Pružný rozptyl

Dopadající a rozptýlené fotony mají stejnou frekvenci

Rayleighův rozptyl

- rozptyl na částicích menších, než je vlnová délka
- rozptyl závisí na λ^{-4} , tedy výrazněji pro modrou
- rozptyl ve směru a v protisměru dopadajícího světla je stejný

Mieův rozptyl

- rozptyl na částicích větších oproti velikosti vlnové délky
- slabší závislost na λ^{-X} , $0.4 \leq X \leq 0.5$
- je preferován rozptyl ve směru dopadajícího světla

Nepružný rozptyl

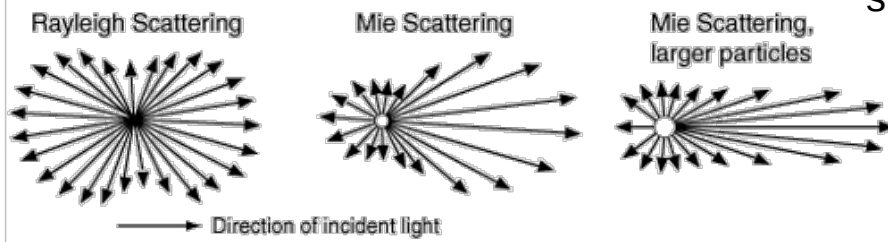
Dopadající a rozptýlené fotony mají různou frekvenci

Brillouinův rozptyl

- interakce elektromagnetické vlny se změnami indexu lomu materiálu způsobenými akustickým vlněním

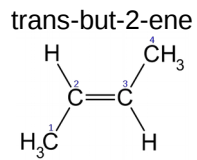
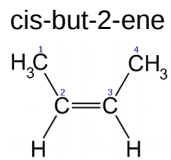
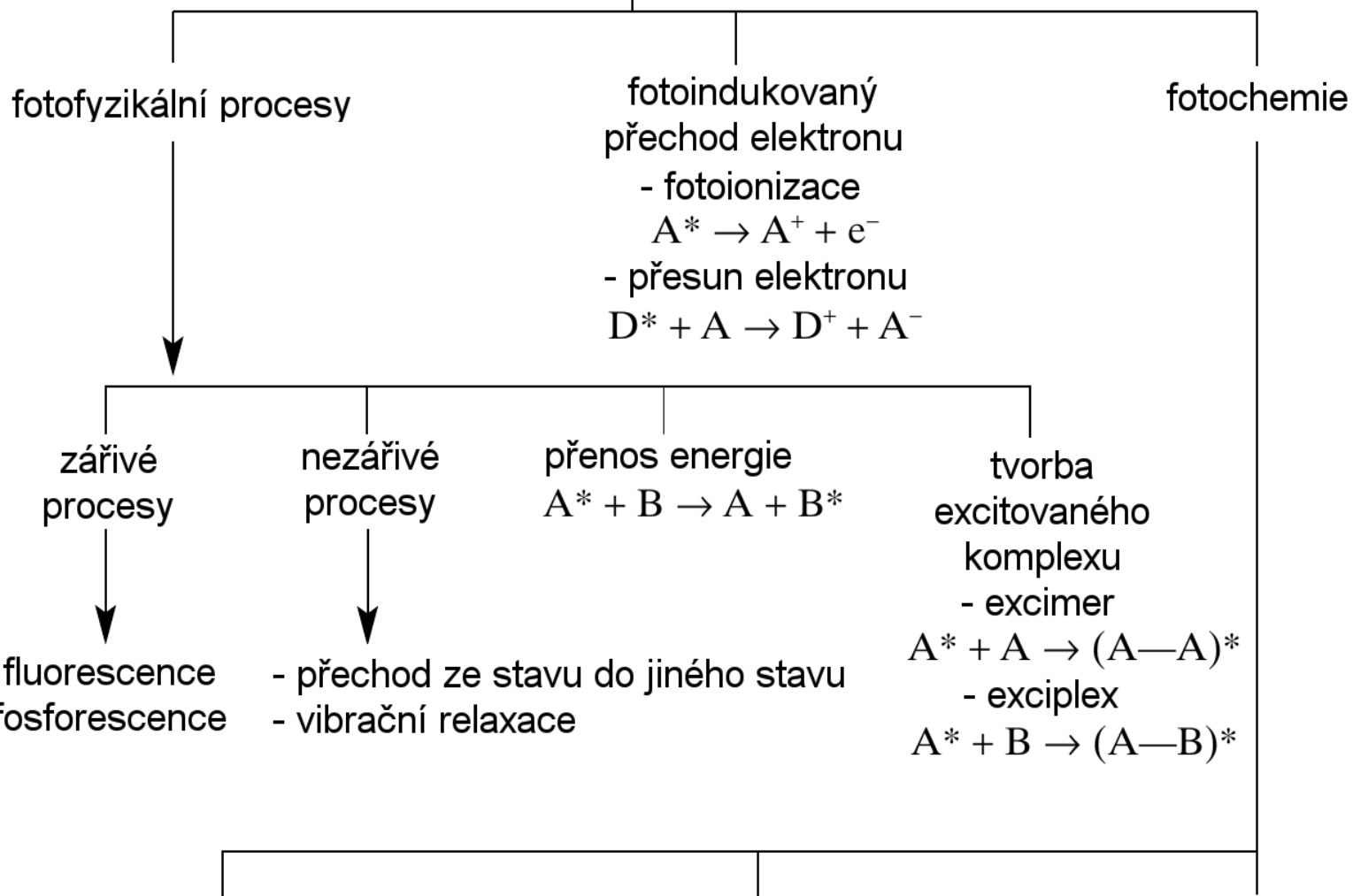
Ramanův rozptyl

- rozdíl energie generuje vibrační excitaci v molekule



Osud excitované molekuly (*)

excitace elektronu v molekule/shluku molekul



fotoizomerace
jako cis-trans
isomerace

fotodekompozice
 $A^* \rightarrow B + C$

fotoasociace
 $A^* + B \rightarrow A—B$

Vibrační stav molekuly

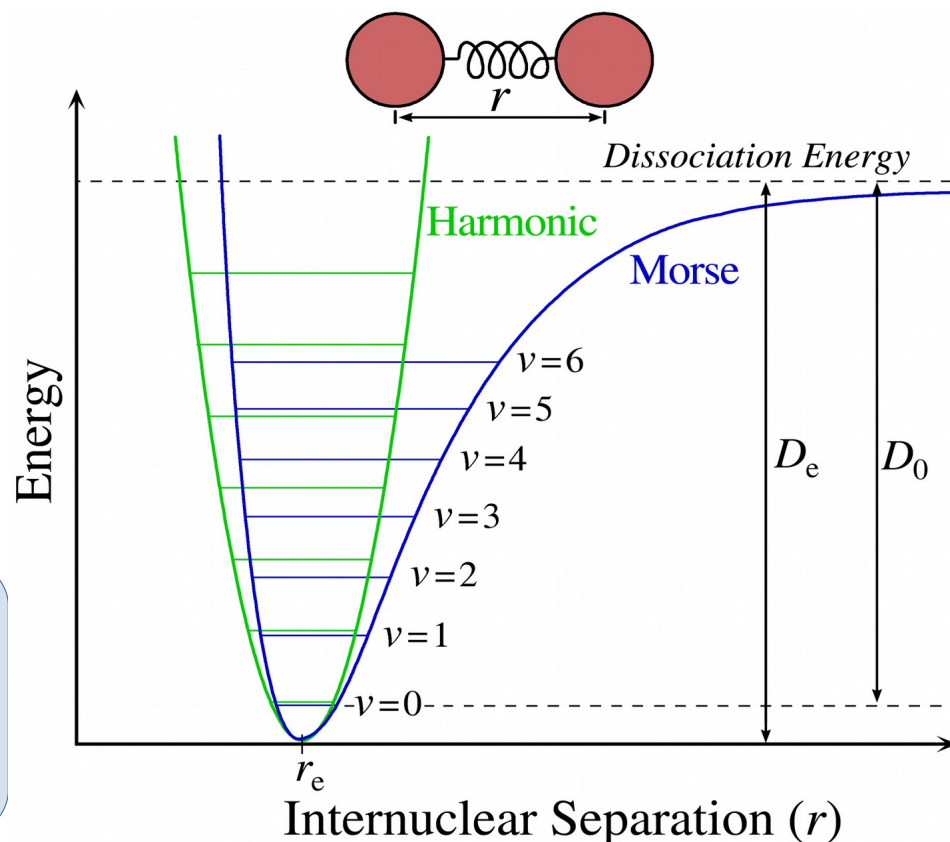
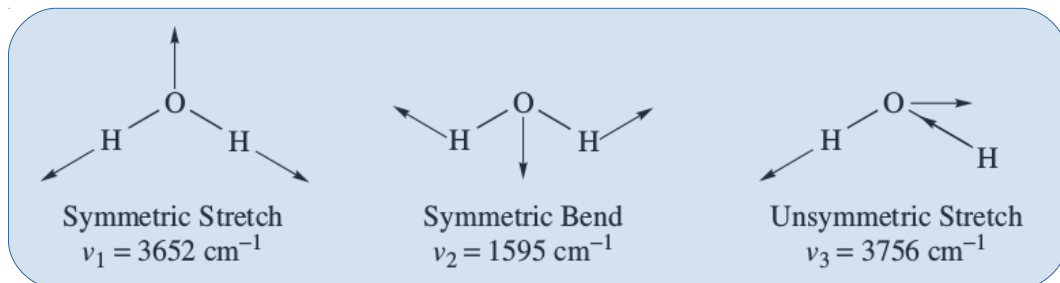
- je řešením Schrödingerovy rovnice molekuly
- dvouatomová molekula dovolující jen jeden vibrační stupeň volnosti (stlačení, natažení) má jednoduché řešení
- energie pro vibrační pohyb jader je dána Morseho potenciální energií

$$V(r) = D_e(1 - e^{-a(r-r_e)})^2, \quad a = \sqrt{k_e/2D_e},$$
 je silovou konstantou v místě minima pot. energie
- k popsání stacionárních stavů na Morseho potenciálu lze vyřešit Schrödingerovu rovnici, pomocí této harmonické aproximace s okrajovou podmínkou

$$\Psi_{vib}(x) = 0 \text{ pro } x = \infty \text{ je}$$

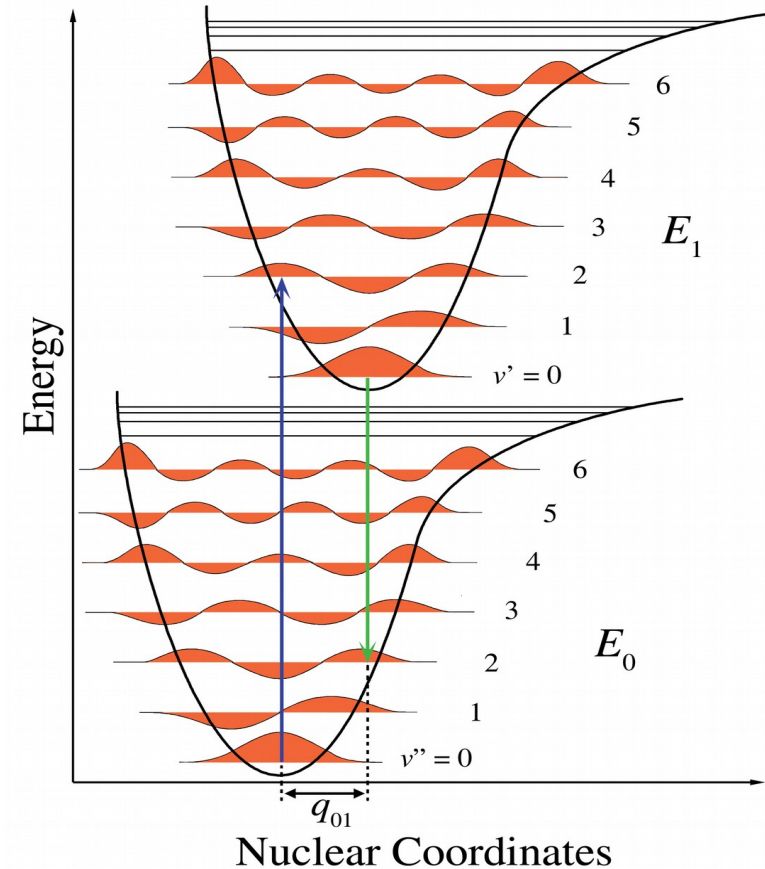
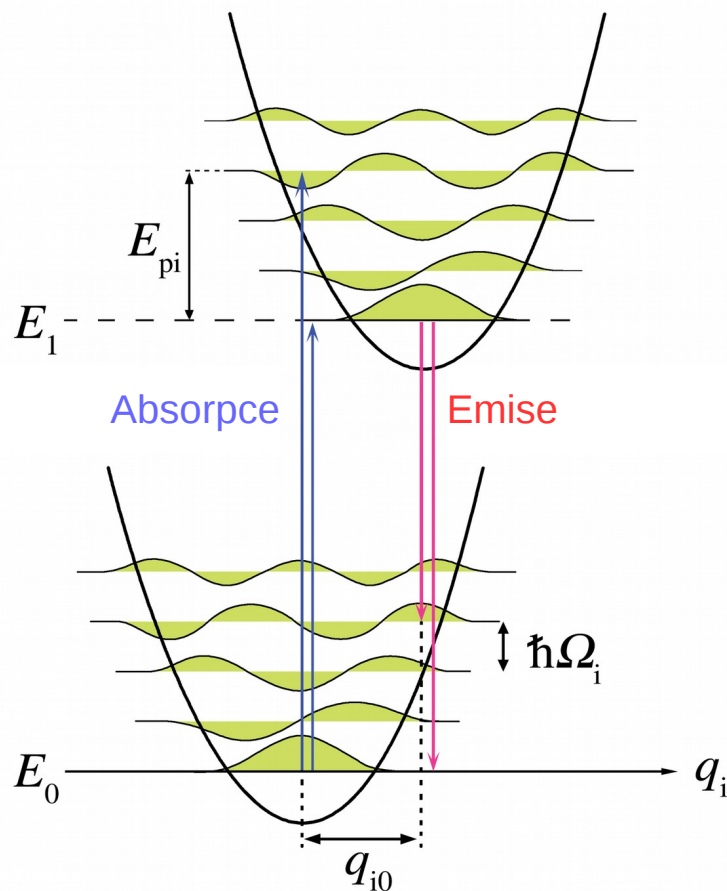
$$E_v = \left(v + \frac{1}{2}\right) h\nu$$

ν = vibrační kvantové číslo = 0, 1, 2, atd.,
 n = vibrační frekvence $(k/\mu)^{1/2}$,
 μ = redukovaná hmotnost = $m_a \cdot m_b / (m_a + m_b)$
 a m_a a m_b jsou hmotnosti jader, tvořících vazbu



Vibrační stav molekuly

- Znázornění elektronových a vibračních stavů molekuly
- Přechody se řídí pomocí Franck–Condonova principu



- Celková energie molekuly závisí nejen na elektronovém stavu E_0 a E_1 , ale také na vibračních číslech v' a v'' značící vibrační stavy základního elektronového stavu a elektronového excitovaného stavu.

Spektroskopie

- Spektroskopie se zabývá charakteristikou a aplikací přechodu mezi dvěma kvantovaným stavy atomu, molekuly, nebo shluku molekul.
- Spektrum je závislost výstupní intenzity světla opouštějící vzorek na jeho frekvenci (nebo vlnové délky).

Spektroskopie

Elektronové

Přechod mezi dvěma stavy elektronu;
spojováno s vibracemi

Vibrační přechody zahrnující současné
změny elektronových a vibračních stavů

Vibrační

Infračervená absorpční

Absorpce IR fotonu
k přechodu ze základního
do vyššího vibračního stavu

Ramanův rozptyl

Rozptyl fotonů ve
viditelném spektru
produkovaných změnou
vibračního stavu

Absorpční

Přechod z nízkého (obvykle
základního) do excitovaného
energetického stavu

je používán širokopásmový
zdroj světla. Spektrum je
získáno zeslabením nebo
absorpcí

Emisní

Přechod z vyššího do nižšího stavu

Fluorescenční

Spin excitovaného elektronu se
nemění

Fosforescenční

"zakázaný" přechodu spinu

Pozn.:

Pro emisí spektrum nebo
pro Ramanovo spektrum
je použito excitace na
specifické vlnové délce
(tzv. excitační vlnová
délka). Spektrum je
získáno detekcí
emitovaného světla.

Absorpční spektroskopie

- Beer-Lambertův zákon

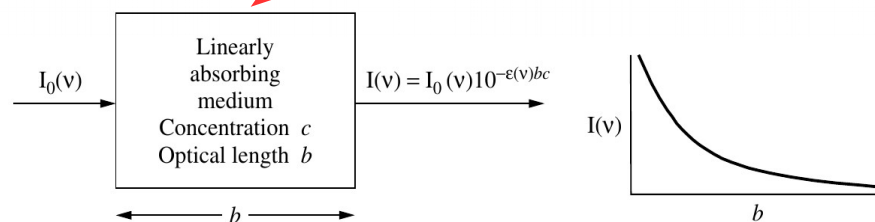
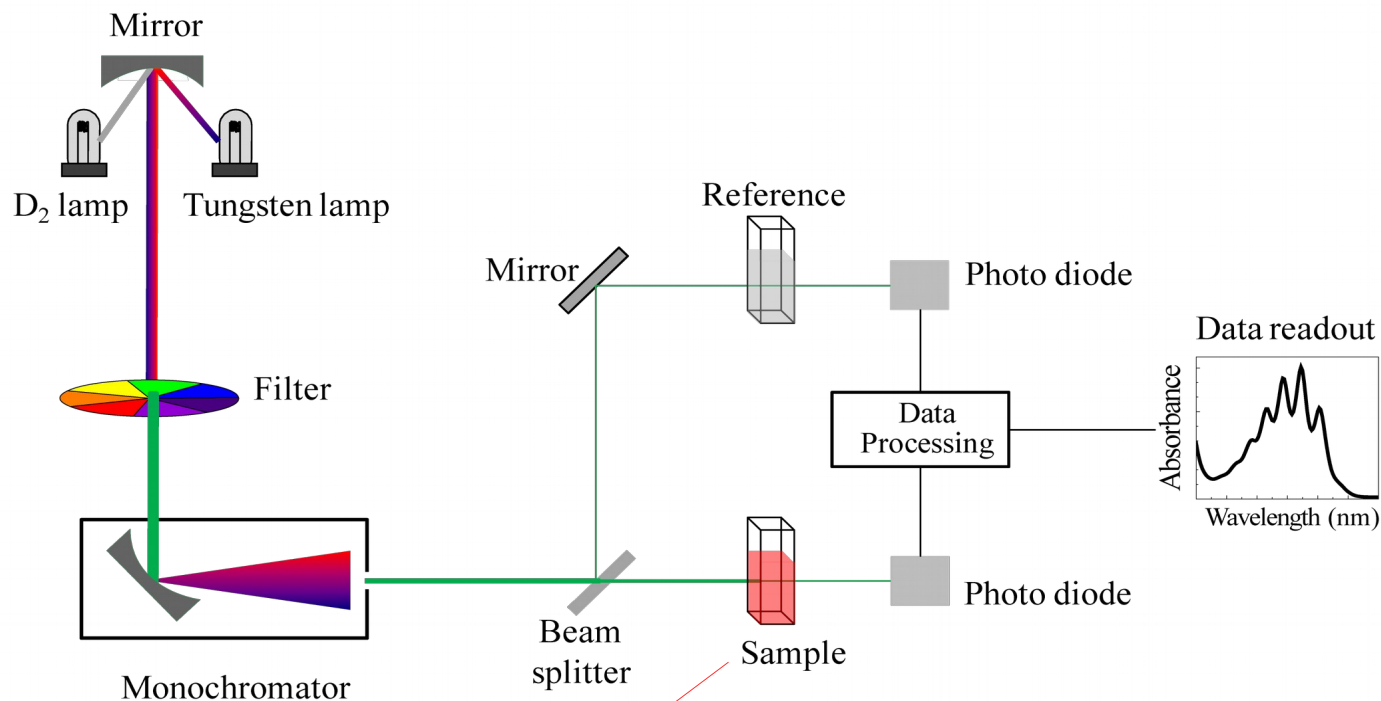
$$I(\nu) = I_0 e^{-k(\nu)bc}$$

k je molární útlumový koeficient, který je závislý na frekvenci ν , c je molární koncentrace (mol/L), b je optická dráha paprsku v měřeném prostředí

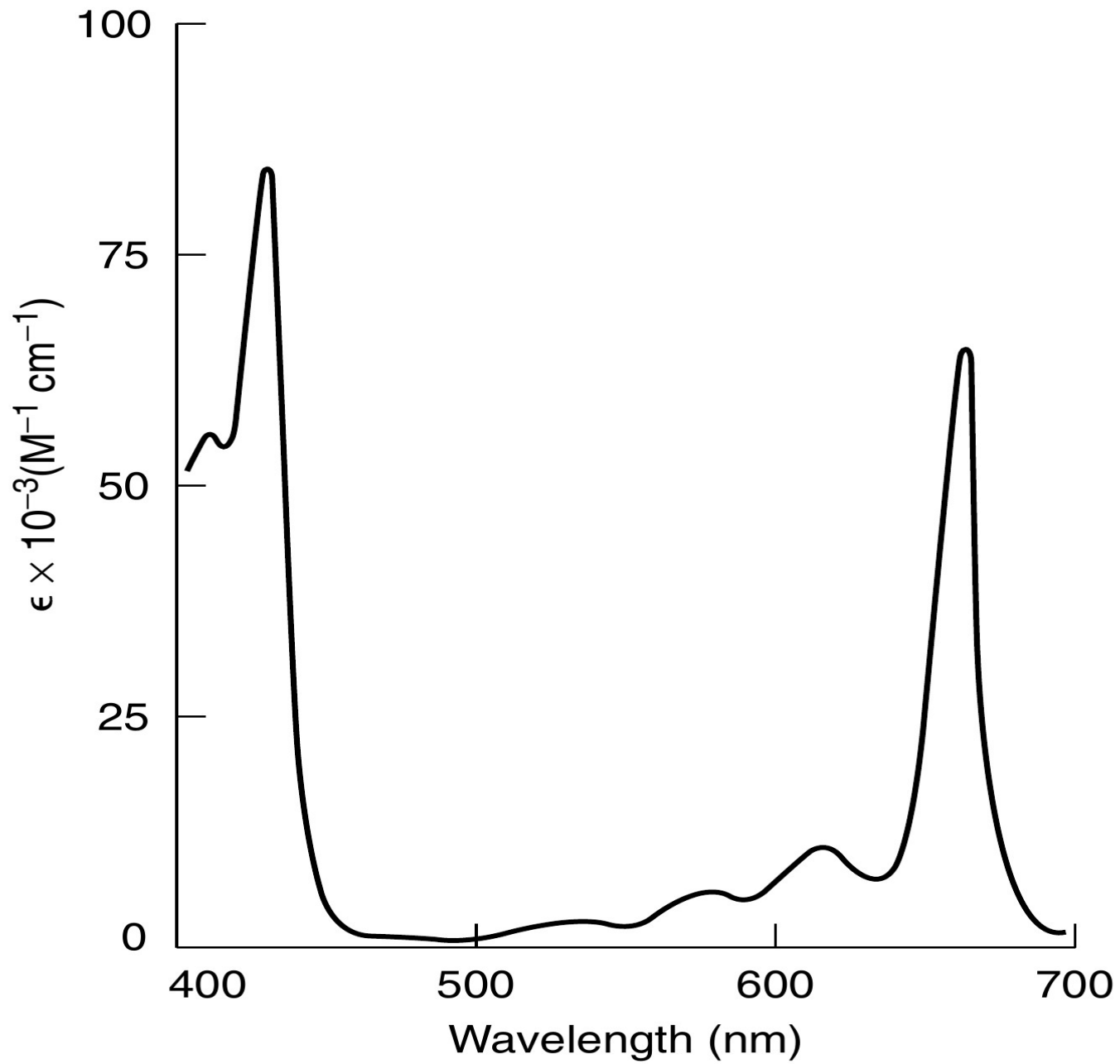
Absorbance: $A(\nu) = \log_{10} \left(\frac{I_0(\nu)}{I(\nu)} \right)$

Transmittance: $T(\nu) = \frac{I(\nu)}{I_0(\nu)}$

Optical density (OD) = $\log_{10}(1/T)$



Absorpční spektrum chlorofylu



Fluorescenční spektroskopie

- Emise je spojena s přechodem z excitovaného elektronického stavu do nižšího stavu (zpravidla základního stavu).
- Absorpce fotonů produkuje fluorescenční pásmo, které je červeně posunuto (na nižší energii). Tento posun mezi maximem absorpčního a fluorescenčního pásma se nazývá Stokesův posun. Velikost Stokesova posunu je závislá na velikosti relaxačního procesu, který se dostaví po absorpci. Rozdíl v energii absorbovaného fotonu a emitovaného fotonu odpovídá energetickým ztrátám v důsledku nezářivých procesů.
- Zpravidla modul připojitelný ke konfokálnímu mikroskopu.

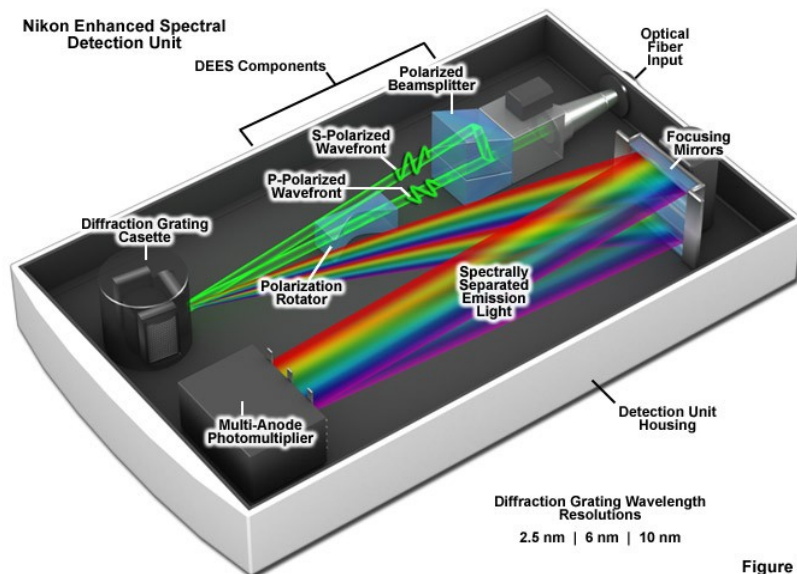
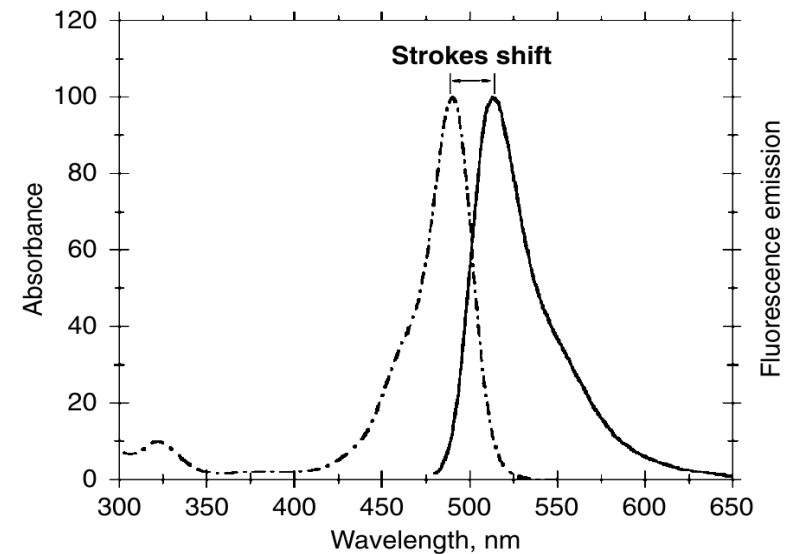


Figure 1

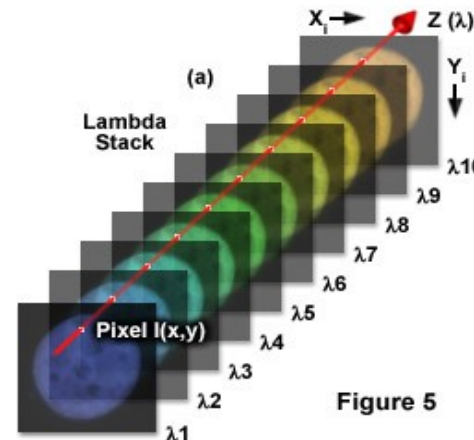
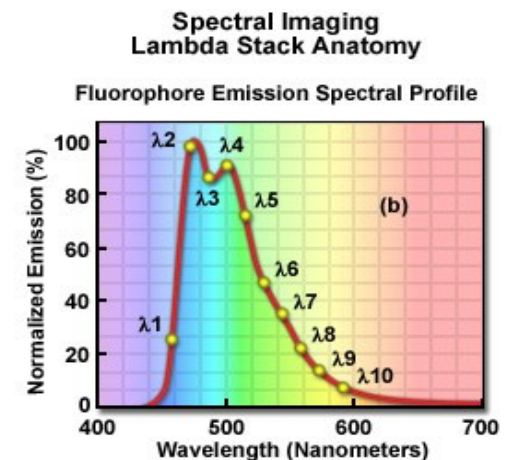
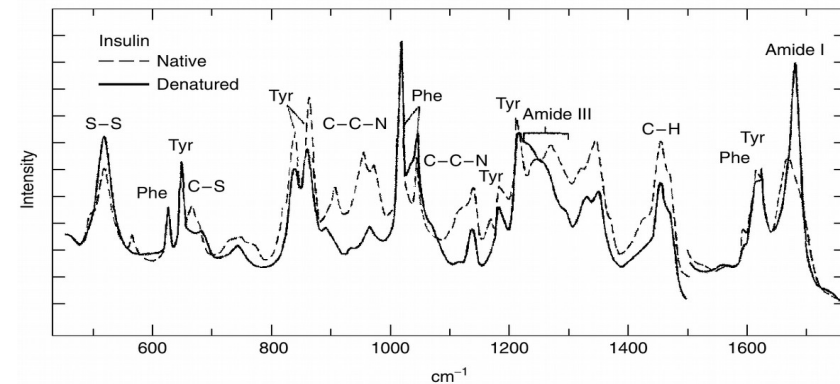
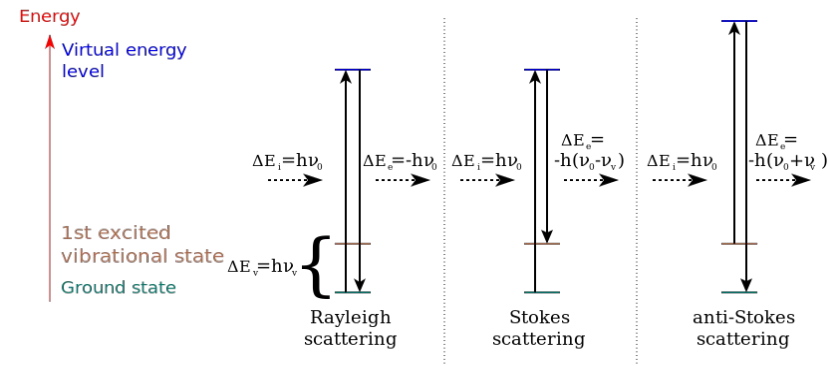


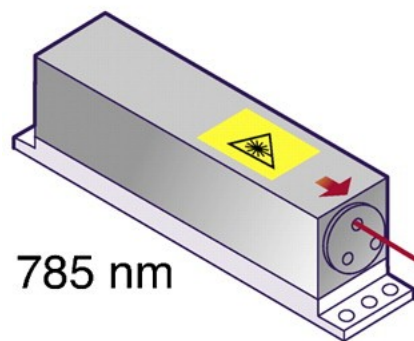
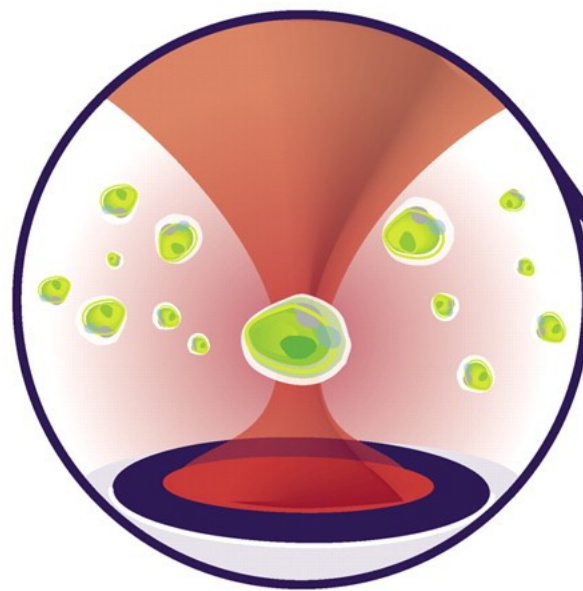
Figure 5



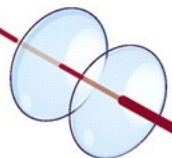
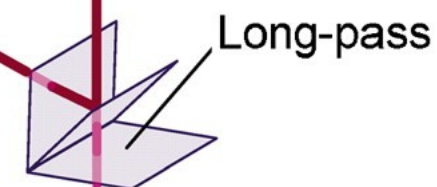
Ramanova spektroskopie

- Foton viditelného spektra (argon-iontový laser s vlnovou délkou 488 nm nebo 514.5 nm) je rozptýlen a spektrálně posunut. Rozdíl frekvence je souvislý se změnou vibrační energie molekuly.
- Pokud je frekvence rozptýleného fotonu nižší, než dopadajícího fotonu, je indukován vibrační přechod z tepelně nižší úrovně na vyšší. Nazývá se Stokes-Ramanův rozptyl a jemu odpovídají ve spektru Stokesovy Ramanovy čáry.
- Pokud je frekvence rozptýleného fotonu vyšší, než dopadajícího fotonu, je indukován přechod z vyšší vibrační úrovně na nižší úroveň. Vznikají anti-Stokesovy čáry.
- Efektivita Ramanova rozptylu je slabá. Typicky jeden ze 105ti fotonů je rozptýlen za vzniku frekvenčně posunutého fotonu. Pro excitaci se používá laser s vysokou intenzitou světla.
- Možnost měření vzorků bez nutnosti speciální přípravy, integrovatelné do mikroskopu, častá kombinace s optickou pinzetou.

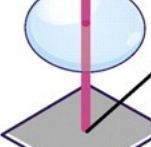


A5 μm 

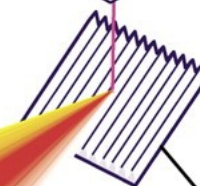
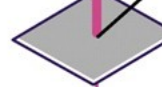
785 nm

**B**

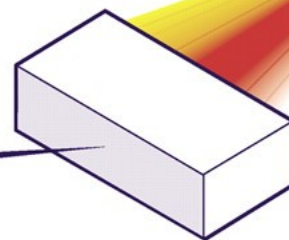
Long-pass



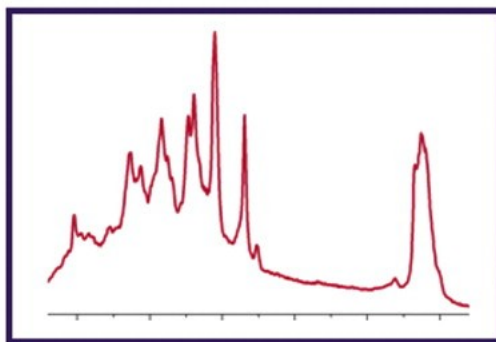
Pin-hole



Grating

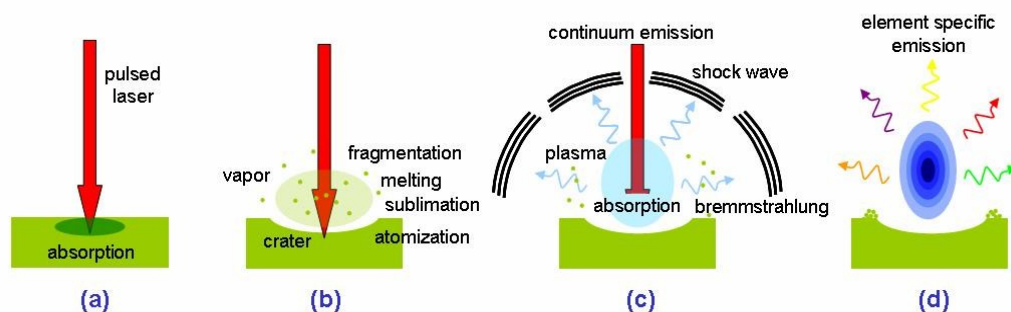


CCD

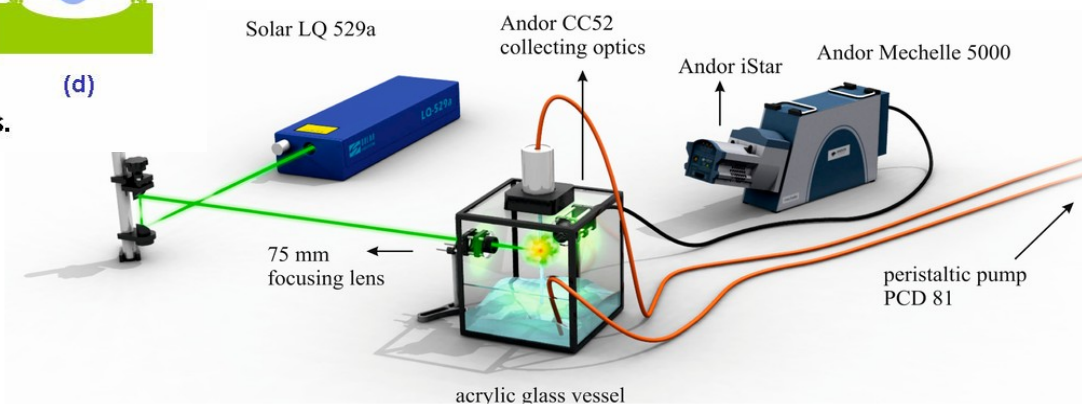


LIBS - LASER-INDUCED BREAKDOWN SPECTROSCOPY

- Atomová/molekulární spektroskopická technika, která využívá vysokovýkonných pulzů laseru k odpaření malého množství preparátu.
- Při odpaření vzniká plasma s vysokou teplotou (10 000 K – 20 000 K), ve které jsou molekuly excitovány a ionizovány.
- Při chladnutí plasmy ztrácejí atomy energii za vzniku spontánní emise světla, které je sbíráno a spektrálně analyzováno.

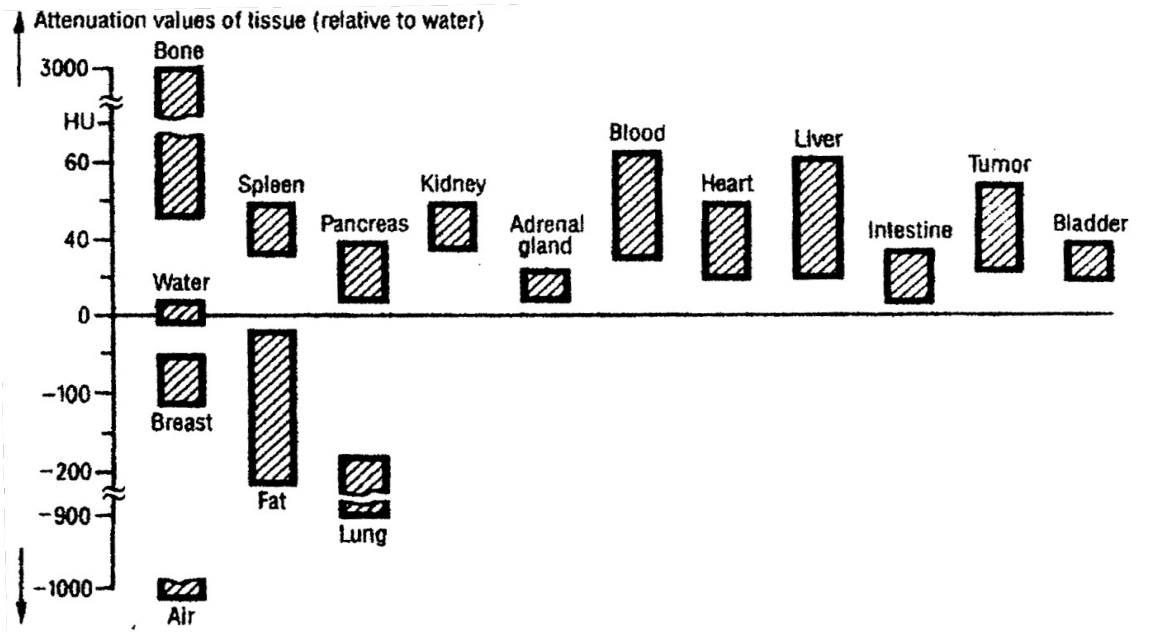


Schematic of the laser-induced breakdown process.

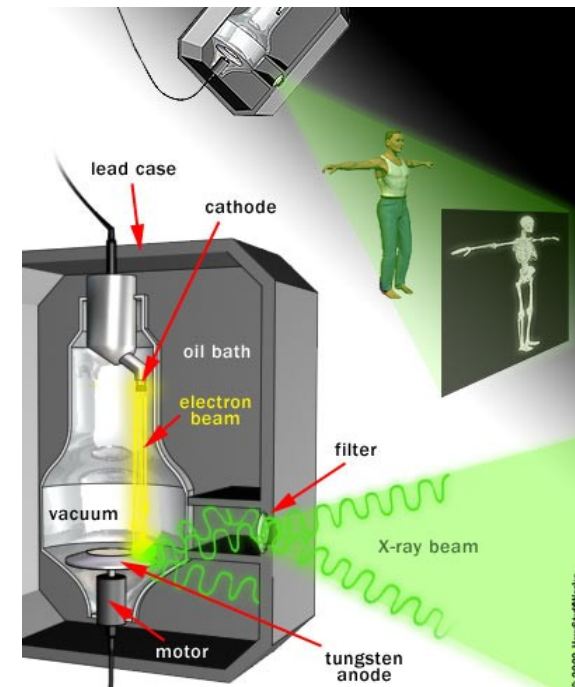
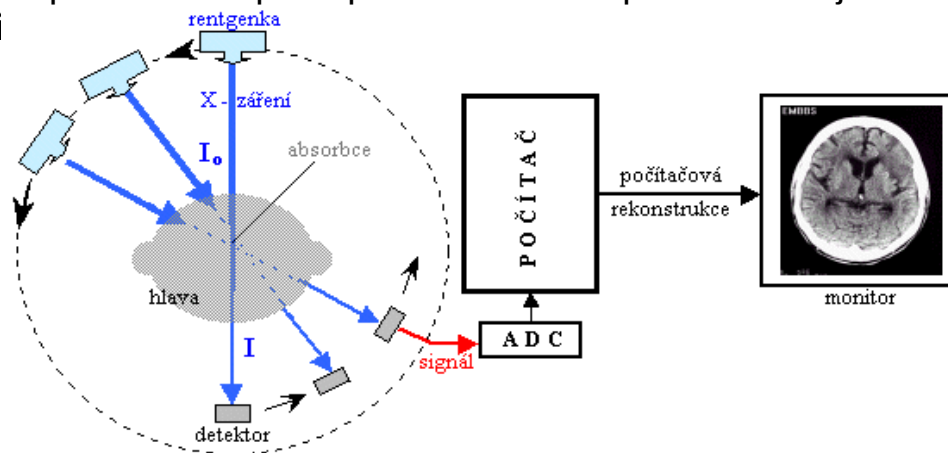


Tomografie tkání

- Využívá Roentgenovo záření
- Záření je při průchodu tkání absorbováno specificky dle druhu tkáně

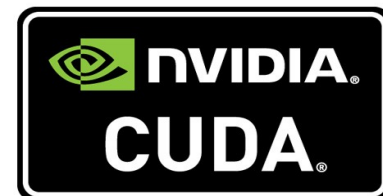
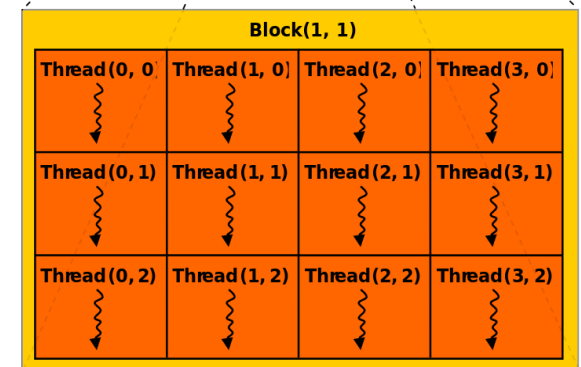
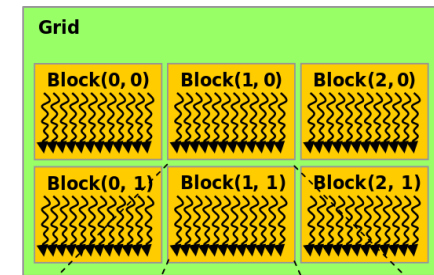
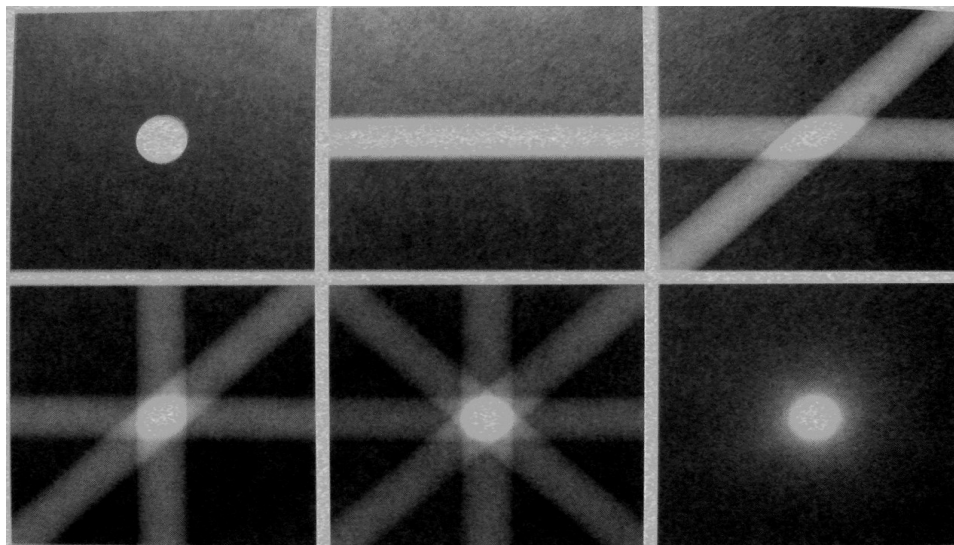


- Princip snímání – postupné snímkování při rotaci dvojice zdroj – detektor okolo sní



Tomografie tkání

- Zaznamenávají se rentgenové snímky pomocí detektorů (PMT, maticové detektory)
- Z jednotlivých snímků je možno rekonstruovat 3D obraz vzorku pomocí numerických metod (Radonova transformace) na grafických kartách s CUDA jádry.
- CUDA (Compute Unified Device Architecture) je hardwarová a softwarová architektura, která umožňuje na GPU spouštět programy při paralelních výpočtech.



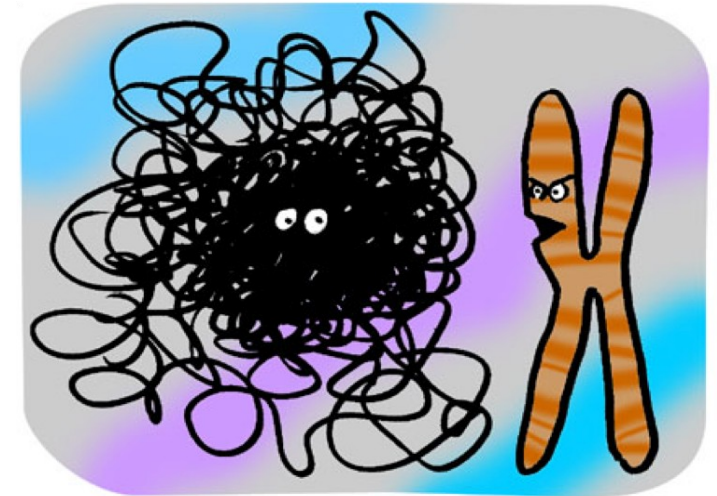
Tomografie tkání



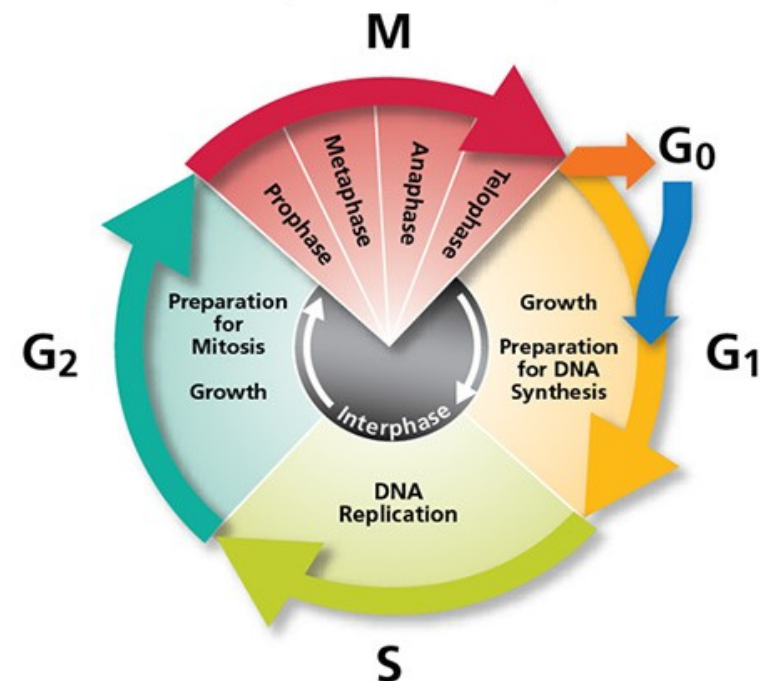
CT spočtené na grafické kartě za 2 vteřiny. Řez krysí kostí.

Radioterapie

- Proces interakce radioaktivního záření lze rozdělit do několika stádií
 - **Fyzikální stádium** - ionizace a excitace atomů. Trvá 10^{-16} až 10^{-14} s.
 - **Fyzikálně-chemické stádium** - vznik volných kyslíkových radikálů (hydroxylový, superoxidový, perhydroxylový). Trvá 10^{-14} až 10^{-10} s.
 - **Chemické stádium** - volné radikály reagují a poškozují biomolekuly. V případě DNA dochází k poškození všech jejích složek (bází, cukrů, fosfátů), vazeb a zlomům vláken DNA. Jednoduché zlomy vznikají častěji a buňka je schopna je ve většině případů opravit. Dvojitě zlomy vznikají při poškození obou vláken současně nebo ze dvou jednoduchých zlomů blízko u sebe. Toto poškození buňka již hůře opravuje. Chemické stádium trvá od tisíců sekund do řádově jednotek sekund.
 - **Biologické stádium** - dochází k rozvoji biologické odpovědi. V buňce jsou aktivovány signální řetězce, kterými buňka rozpozná signál o poškození DNA. Další postup závisí na míře poškození a stadiu buněčného cyklu, ve kterém se buňka nachází.
- Buněčný cyklus je kontrolován v několika kontrolních bodech. Nejdůležitější je místě přechodu G1/S fáze a dále G2/M fáze. Nejdůležitějšími proteiny kontrolující buněčný cyklus je p53, pRB a ATM/ATR. Protein p53 se označuje jako strážce genomu a působí v přechodu G1/S fáze. Jeho aktivace v G1 fázi vede k zastavení buněčného cyklu a zahájení oprav DNA. Po skončení oprav se množství p53 sníží a cyklus pokračuje dál k replikaci. Jestliže dojde k poškození v předmitotické fázi nebo je-li poškození tak závažné, že nelze opravit, p53 vede buňku k buněčné smrti cestou apoptózy (programovaná smrt).

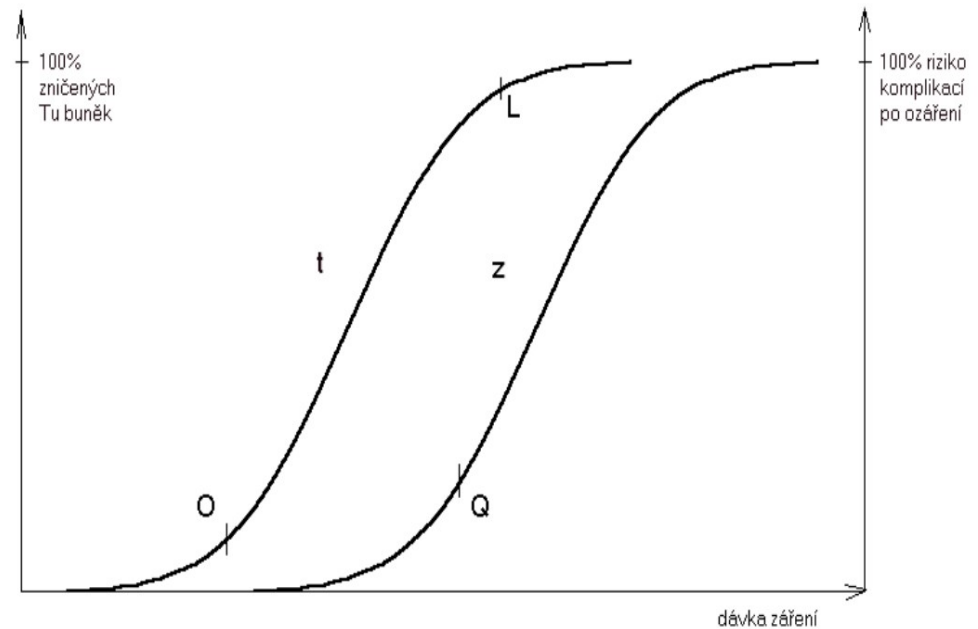


Dude, mitosis starts in five minutes...
I can't believe you're not condensed yet.



Radioterapie

- U rychle proliferujících buněk se radiační poškození projeví dříve (kostní dřeň, epitel, gonády) než u buněk neproliferujících (nervové buňky). Radiosenzitivní bývají také tkáně s rychle se dělícími a málo diferencovanými buňkami. Radiorezistentní jsou naopak tkáně s nedělícími se buňkami a dobře diferencované. U rychle proliferující tkáně se poškození projeví akutně. Pomalu proliferující tkáně mívají pozdní toxicitu.
- Mezi radiosenzitivní nádory patří hematologické malignity, seminom, meduloblastom, Ewingův sarkom.
- Mezi radiorezistentní nádory patří sarkomy, maligní melanom, meningeom.
- **Patersonův graf** znázorňuje počet zničených nádorových a zdravých buněk v závislosti na dávce záření. Křivka *t* představuje populaci zničených nádorových buněk. Dávkou v bodě *L* jsou usmrceny všechny nádorové buňky. Při aplikaci dávky nižší než v bodě *O* nedojde k ničení nádoru. Křivka *z* znázorňuje obdobnou situaci u zdravých buněk, přičemž v bodě *Q* se začíná prudce zvyšovat riziko nevratného poškození zdravé tkáně. Dle vlastností nádoru a tkání, které jej obklopují, se jednotlivé křivky od sebe vzdalují nebo přibližují. Posun křivky *t* doleva značí zvýšení radiosenzitivity, posun doprava znamená zvýšení radiorezistence.



Radioterapie

- Konformní radioterapie, resp. trojrozměrná konformní radioterapie (3D-CRT)
 - standardní léčebná metoda.
 - ozařovaný objem je individuálně přizpůsoben nepravidelnému trojrozměrnému tvaru cílového objemu.
 - Základem pro 3D plánování je použití trojrozměrných zobrazovacích vyšetření - CT vyšetření, MR vyšetření
- IMRT radioterapie - Radioterapie s modulovanou intenzitou (IMRT - Intensity Modulated Radiation Therapy)
 - vyspělejší forma 3D-konformní radioterapie.
 - upravena intenzita (fluence) svazku záření.
 - možno ozařovat geometricky složitější cílové objemy a dosáhnout i většího šetření zdravých struktur.
- IGRT - Image Guided Radiation Therapy
 - poloha cílového objemu se mění v důsledku pohybů vnitřních orgánů
 - speciální zobrazovací 3D systém přímo na ozařovacím přístroji
- Stereotaktická radioterapie a radiochirurgie
 - Léčba prováděna jednorázově a tím napodobuje chirurgický výkon.
 - vysoká dávka záření (12-25 Gy) je aplikována do ozařovaného ložiska o maximálním průměru 3-3,5 cm.
 - gama nůž a lineární urychlovače s mikrokolimatorem či konickými tubusy (X nůž), CyberKnife, TomoTherapy
- 4D-konformní radioterapie
 - zohledňuje změny cílového objemu v aktuálním čase způsobené fyziologickými pohyby orgánů, které nastávají v průběhu léčby (pohyb tumoru v průběhu dýchacího cyklu)

