

5. Biofotonica

Clasificarea spectrală a undelor electromagnetice

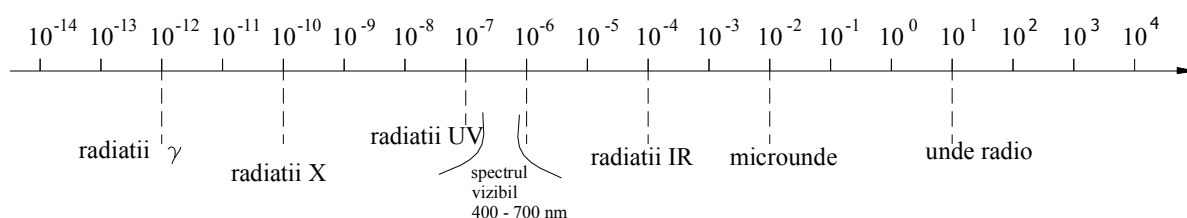


Fig. 5.1.1. Domeniul undelor electromagnetice

Din punct de vedere al energiei transportate, radiațiile electromagnetice se clasifică în:

- I. Radiații neionizante (sub 10eV)
- II. Radiații ionizante (peste 10eV)

5.1. Surse de unde electromagnetice în domeniul vizibil

- TIPURI
 - 1. după tipul radiației emise
 - monocromatice
 - policromatice
 - 2. după tipul spectrului emis
 - cu spectru continuu
 - cu spectru discret
 - cu spectru de bandă
 - 3. după timpul cât durează emisia
 - continuu în timp
 - pulsant în timp

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

Surse cu spectru continuu

O sursă cu spectru continuu emite toate lungimile de undă dintr-un anumit domeniu

Exemple: becul cu incandescență, soarele

Aplicație: microscopia în câmp luminos

Microscop = instrument construit în scopul de a obține informații sub formă de imagini specifice ale unor obiecte cu dimensiuni sub milimetrice (de exemplu: microscop optic, microscop electronic, microscop de forță atomică).

Microscop optic = instrument proiectat pentru a vizualiza imaginea mărită a unor obiecte, construit pe baza unor lentile și a unor surse de lumină în domeniul vizibil. El formează imaginea virtuală, mărită și răsturnată a obiectului observat.

Microscop optic inversat = un microscop optic care prin construcție are revolverul cu obiective poziționat sub masa pe care se așează proba.

Mod de examinare în câmp luminos = lumina de la sursă traversează direct proba, în calea optică nu mai sunt introduse și alte elemente, în afară de lentila obiectiv pentru mărirea imaginii

Rezoluția laterală = distanța minimă dintre două puncte care mai pot fi văzute distinct prin microscop.

Microscopul optic este un aparat care formează imagini virtuale, mărite și răsturnate ale obiectului, prin intermediul sistemelor de lentile grupate în obiectiv și ocular (fiecare sistem este echivalent cu o lentilă convergentă).

Pentru un microscop optic, sursa de unde electromagnetice este aleasă în domeniul vizibil (400nm-750nm). Acestea sunt transmise de-a lungul axului optic (axial) prin probă, obținându-se un câmp vizual puternic iluminat în care obiectele se disting prin opacitate sau culoare.

Obiectivul este un sistem de lentile așezat spre obiect. El formează în partea superioară a tubului microscopului o imagine reală, răsturnată, dreaptă și mărită A'B' a obiectului AB.

Ocularul acționează ca o lupă. Ocularul reprezintă sistemul de lentile îndreptat spre ochi. El formează o imagine virtuală, dreaptă și mărită A''B'', a imaginii reale dată de obiectiv (Fig. 5.1.2.). El preia imaginea formată de obiectiv și oferă detectorului (ochiul, cameră video sau foto) o imagine finală care este virtuală, răsturnată, mărită. Preparatul cu celule se află de obicei înaintea focarului obiect al obiectivului

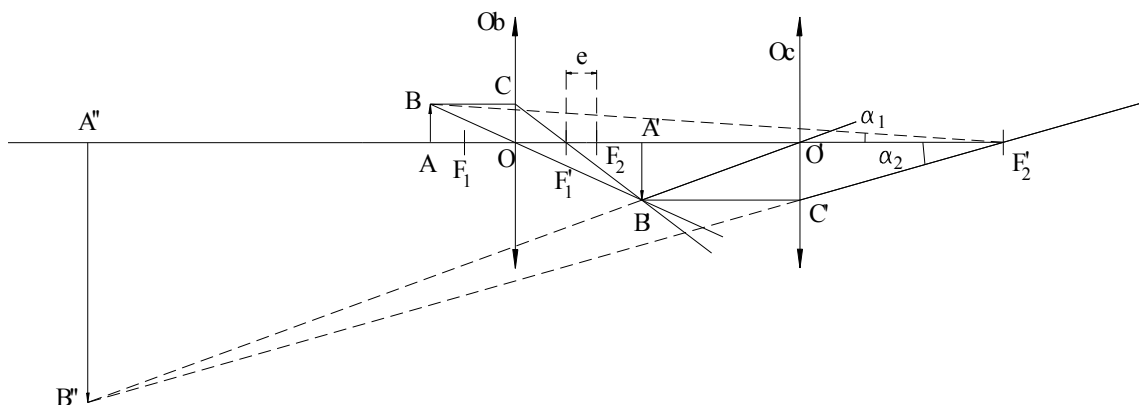


Fig. 5.1.2. Formarea imaginii finale prin sistemele de lentile obiectiv și ocular

Există o mare varietate de firme producătoare de microscopice optice. Deosebirile sunt numai din punct de vedere constructiv. Există câteva părți componente care nu pot lipsi din niciun microscop optic:

1. sursa de lumină
2. condensorul
3. platina microscopului (măsuța suport pe care se așează proba)
4. "revolverul" cu obiective de microscop
5. blocul de filtre
6. tubul microscopului cu ocularul
7. componente mecanice care permit deplasarea obiectivului sau a măsuței pe care se află proba

Ordinea în care au fost enumerate este cea logică în sensul de mers al razelor de lumină dinspre sursă spre ocular sau spre un alt senzor digital, în cazul unui microscop inversat.

Toate acestea sunt fixate pe piciorul microscopului care conține o placă grea cu rol în stabilitate.

Sursa este un bec care emite lumină albă (spectru continuu).

Condensorul are rol de a concentra fasciculul luminos într-un con având vârful situat într-un focar situat pe proba de analizat. Este format din două sau trei lentile și o diafragmă reglabilă. Cu ajutorul său se obțin imagini cât mai luminoase ale preparatului.

Obiectivul este un sistem de lentile într-un suport metalic. Fața dinspre probă a primei lentile este plană (numotarea începe dinspre probă). Rolul său este de a mări imaginea probei. Mărirea sa și apertura numerică sunt înscrise pe suportul acestuia. De asemenea mai este scris tipul de obiectiv corespunzător cu un mod de examinare (Ph-phase contrast, DIC-differential interference contrast).

Ocularul (pieasa optică cea mai apropiată de ochi) este așezat mereu în partea superioară a tubului microscopului. Mărirea acestuia este scrisă de obicei pe partea laterală. El este format din două lentile plan convexe și o diafragmă. Cea superioară, având rol de lupă, este așezată cu partea plană în sus.

Componentele principale ale Microscop optic inversat Nikon Ti-U (Fig. 5.1.3.) sunt:

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

1. Camera video DS-Fi1 pentru achiziția în timp real a imaginilor preparatului investigat;
2. Computer conectat USB cu camera video;
3. Cheie USB pentru codul de utilizator al softului specializat;
4. Softul NIS Elements pentru achiziția și prelucrarea imaginilor;
5. Micrometru obiectiv;
6. Lame de microscop cu diferite preparate biologice sau microstructuri fabricate în polimeri.

Componentele de bază pentru microscopul optic inversat Nikon Ti-U sunt:

1. Stâlpul Ti-DH de susținere a sursei de iluminare Dia de 100W.
2. Casa lămpii de iluminare de 12V, 100W
3. Sursa de tensiune TI-PS100W
4. Masa reglabilă X-Y de susținere a probelor, tip TI-SR
5. Două oculare 10x
6. Turelă tip TI-ND6 de fixare a setului de șase obiective
7. Obiective
8. Lentila condensorului
9. Mânerul de focalizare a condensorului
10. Mânerul diafragmei de câmp luminos
11. Patru suporturi pentru filtre
12. Turela condensorului
13. Mânerul dreapta de deplasare verticală a focalizării obiectivului, cu reglă fină (microviza) și grosieră (macroviza)
14. Mânerul stânga de deplasare verticală a focalizării obiectivului, cu reglă fină (microviza) și grosieră (macroviza)
15. Mâner de deplasare X-Y a măsuței de susținere a probei
16. Port pentru ieșire laterală
17. Buton de reglare a strălucirii lămpii Dia 100W
18. Buton de comutare on/off a iluminării
19. Buton de selectare a drumului optic - comută între diferite ieșiri (ochi sau CCD)
20. Buton de selectare a măririi intermediare
21. Baza microscopului
22. Blocul de susținere a tubului ocular
23. Tubul ocular
24. Șurub de centrare a condensorului
25. Diafragma aperturii
26. Inel de blocare a focalizării grosiere
27. Montura condensorului
28. Inel concentric în măsura obiectivului.

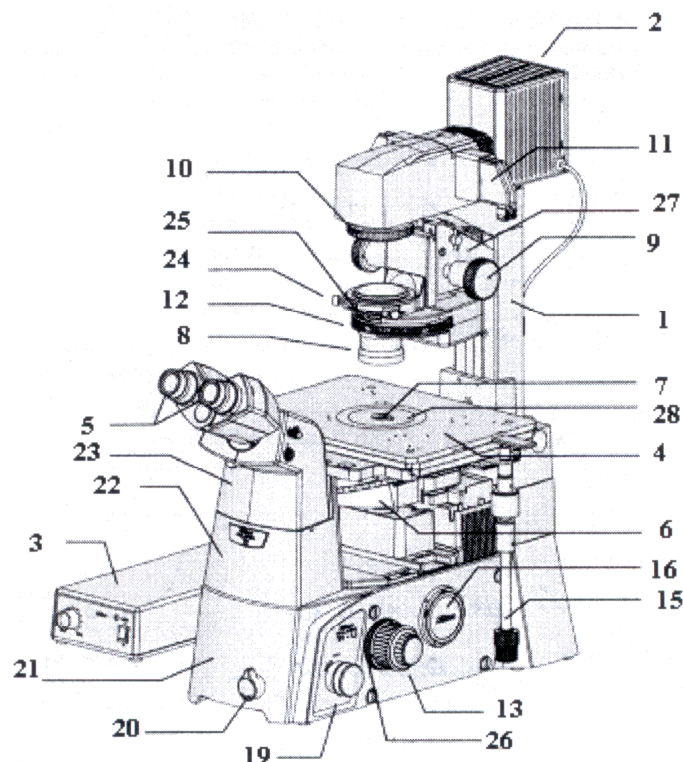


Fig. 5.1.3. Microscopul optic inversat Nikon Eclipse Ti-U
<http://www.microscopyu.com/articles/phasecontrast/phasemicroscopy.html>

Puterea optică este raportul dintre tangenta unghiului sub care se vede un obiect prin instrumentul optic și dimensiunea liniară a obiectului pe direcția perpendiculară pe axa optică.

$$P = \frac{\tan \alpha_2}{y_1} \quad (5.1.1.)$$

Ochiul preferă să privească neacomodat imaginea y_2 , de aceea, aceasta trebuie să se formeze destul de departe, impunând condiția ca razele emergente să fie aproape paralele. La limită rezultă că unghiul făcut de raza $B''F_2$ cu axul optic este egal cu unghiul făcut de raza $B''O$ cu axul optic (Fig. 1.1.).

În această aproximație, putem scrie că $\tan \alpha_2 \cong y_1' / f_{ocular}$, iar puterea optică a microscopului se poate scrie ca $P = \frac{\tan \alpha_2}{y_1} \cong \frac{y_1'}{y_1 f_{ocular}}$.

Pentru ca ultima imagine să se formeze la infinit, trebuie ca imaginea intermediară să fie în focarul obiect al celei de-a doua lentile (A' se află foarte aproape de focarul F_2 , la limită vom considera că cele două puncte chiar coincid).

Definim intervalul optic, e , distanța dintre focarul imagine al obiectivului și focarul obiect al ocularului. Din asemănarea triunghiurilor $A'B'F_1$ și ABO (obiectul se află practic în focarul obiectivului), rezultă.

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

$$\frac{y_1'}{y_1} \cong \frac{e}{f_{obiectiv}} \quad (5.1.2.)$$

iar puterea optică a microscopului se va scrie: $P \cong \frac{e}{f_{obiectiv} \cdot f_{ocular}}$ (5.1.3.)

În concluzie, putem spune că puterea microscopului crește cu creșterea convergențelor obiectivului și ocularului precum și a intervalului optic e . Prin deplasarea obiectivului în procesul de punere la punct a imaginii preparatului, se modifică distanța e .

Puterea de mărire a imaginii văzută prin microscopul optic este practic egală cu produsul dintre mărirea obiectivului și cea a ocularului.

Grosismmentul sau mărirea unghiulară este raportul dintre tangenta unghiului sub care se vede un obiect prin instrumentul optic și tangenta unghiului sub care se vede un obiect atunci când este privit cu ochiul liber așezat la distanța optimă de citire (25cm). Grosismmentul microscopului este produsul dintre grosismmentul ocularului și cel al obiectivului.

$$G_{microscop} = \frac{\tan \alpha_2}{\tan \alpha_1}, \quad G_{microscop} = G_{obiectiv} \cdot G_{ocular} \quad (5.1.4.)$$

Relația dintre puterea și grosismmentul microscopului este

$$G = \frac{P}{4} = \frac{e}{4 f_{obiectiv} f_{ocular}} \quad (5.1.5.)$$

Grosismmentul este o mărime fizică adimensională.

Adâncimea de focalizare sau adâncimea câmpului de lucru este capacitatea obiectivului de a reda clar, în același timp, detalii aflate în aceeași probă dar în plane diferite situate de-a lungul axului optic. Pentru un obiectiv obișnuit nu toate detaliile dintr-o probă pot fi puse la punct (nu se pot focaliza) simultan. Există acum obiective numite EXTRA LONG WORKING DISTANCE care sunt proiectate cu scopul de a forma clar imagini ale detaliilor aflate în plane diferite de-a lungul axului optic.

Apertura unghiulară este dată de unghiul maxim din care o lentilă colectează raze de lumină, deci și imaginea obiectului. Pentru un obiectiv de microscop se consideră apertura numerică globală a sistemului de lentile din care este format, iar valoarea acesteia este înscrisă de fabricant pe montura laterală.

Apertura numerică este egală cu produsul dintre indicele de refracție și sinusul jumătății unghiului definit ca apertură unghiulară $NA = n \cdot \sin \alpha$ (Fig. 5.4.)

Puterea de rezoluție se definește ca fiind distanța minimă dintre două puncte ce mai pot fi observate distinct. Această valoare este dată de formula Abbe

$$d = \frac{\lambda}{n NA} \quad (5.1.6.)$$

unde λ este lungimea de undă a luminii folosite, n este indicele de refracție al mediului aflat între probă și lentila frontală a obiectivului, iar NA este apertura numerică a obiectivului.

Pentru un obiectiv iluminat cu lumina albă (vom considera lungimea de undă medie $\lambda = 0.55 \mu\text{m}$), cu apertura numerică 0.3 (corespunde unui obiectiv cu mărirea de 10x), situat în aer, puterea de rezoluție este $1.83 \mu\text{m}$.

Pentru a scădea această valoare, se folosesc de obicei obiective cu mărirea mare care sunt proiectate să lucreze cu imersie (între lentila obiectivului și probă se pune o picătură dintr-un lichid cu indice de refracție mai mare, de obicei ulei sau apă pentru care $n_{ulei} = 1.5 - 1.6$ ($n_{apa} = 1.33$)).

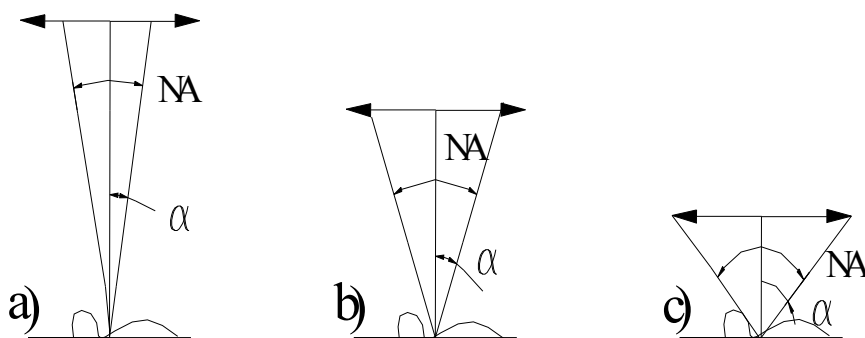


Fig. 5.1.4. Apertura numerică

a) $\alpha = 7^\circ \rightarrow NA = 0.12$, b) $\alpha = 20^\circ \rightarrow NA = 0.34$ c) $\alpha = 60^\circ \rightarrow NA = 0.87$

Pentru a calcula puterea de rezoluție maximă (distanța minimă), vom considera că lucrăm cu o lungime de undă mică din spectrul vizibil (de exemplu $\lambda = 0.4 \mu\text{m}$), apertura unghiulară maximă teoretică este de 180° , iar sinusul jumătății este 1, practic 0.95.

Va rezulta o distanță de aproximativ $0.3 \mu\text{m}$, ceea ce reprezintă o limită a microscopelor optice.

Două puncte diferite situate la o distanță sub această valoare nu se mai pot vedea distinct cu un instrument optic.

Un obiectiv de microscop se mai caracterizează prin **câmpul de vedere** (aria transversală din proba care se vede deodată într-o imagine).

Spectroscopia optică

Metodă de identificare și analiză a compoziției chimice a unor substanțe bazată pe investigarea spectrului emis sau absorbit de acea substanță

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

Spectroscopie de emisie: substanța de analizat este adusă în starea în care emite un spectru discret caracteristic (de exemplu este introdusă într-o descărcare în interiorul unei lămpi). În acest caz pe un fundal întunecos se vor vedea doar liniile sau benzile emise de către substanța respectivă.

Spectroscopie de absorbție: substanța de analizat este introdusă între o sursă de lumină cu spectru continuu și un detector. În acest caz, pe un fundal luminos colorat format din spectrul continuu al lămpii, se vor vedea linii sau benzi întunecoase (fără culoare) la lungimile de undă caracteristice substanței respective.

Elementele constructive principale:

pentru un spectroscop prin emisie:

- substanța adusă în starea în care emite un spectru
- prisma sau rețeaua de difracție
- detector
- aparat de măsură

pentru un spectroscop prin absorbție

- sursă cu spectru continuu
- substanța de analizat
- prisma sau rețeaua de difracție
- detector
- aparat de măsură

Spectroscopul este un aparat care poate avea una din următoarele elemente principale:

- o rețea de difracție, care va descompune lumina nemonocromatică, pe baza fenomenului de difracție (fenomenul care se petrece atunci când o undă întâlnește obstacole de dimensiuni comparabile cu lungimea de undă). În acest caz, obstacolele sunt fantele rețelei de difracție care vor devia lumina la unghiuri diferite în funcție de lungimea ei de undă
- o prismă, care va descompune lumina nemonocromatică, pe baza fenomenului de difracție (fenomenul prin care indicele de refracție al unui material are valori diferite pentru diferite lungimi de undă ale radiației incidente). În acest caz, combinat și cu fenomenul de refracție la suprafața de separare prismă-aer, rezultatul este descompunerea radiației incidente în componentele ei spectrale (diferite lungimi de undă vor fi deviate la diferite unghiuri).

Un spectroscop corect etalonat poate fi folosit și la determinarea concentrației unor substanțe, folosind legea Beer de atenuare:

$$I = I_0 \exp(-L \cdot c \cdot \varepsilon)$$

unde I este intensitatea radiației la ieșirea din substanță

I_0 este intensitatea radiației incidente pe substanță

L este grosimea străbătută prin probă

c este concentrația substanței

ε este o constantă care se determină din panta unei drepte realizată pe baza unor substanțe cu concentrații cunoscute

Cu ajutorul unui monocromator, se alege din totalitatea lungimilor de undă emise de sursa cu spectru continuu, acea lungime de undă care se dorește a fi analizată în corespondență cu substanța respectivă

Surse cu spectrul discret. Aplicații

Fenomenul de fluorescență: fenomenul prin care anumite substanțe pot emite o radiație luminoasă cu o lungime de undă caracteristică, atunci când asupra lor este incidentă o altă radiație luminoasă pe care o absorb. Radiația emisă are o lungime de undă mai mare față de cea incidentă; aceste substanțe se numesc fluorescente (energia fotonului emis este mai mică decât cea a fotonului incident).

Pentru a explica principiul fizic al fenomenului, considerăm un atom al unei substanțe care prezintă fenomenul de fluorescență.

În stare normală, în acest atom, electronii se află pe nivele cu valori discrete ale energiei, valori care respectă postulatele lui Bohr, satisfăcând regula de a ocupa nivelele cele mai apropiate de nucleu.

Asupra sa se trimite o radiație electromagnetică cu lungimea de undă λ_{inc} . Un foton incident va avea atunci energia:

$$E_{inc} = h\nu_{inc} = hc / \lambda_{inc} \quad (5.1.7.)$$

unde h este constanta lui Planck, c este viteza luminii în vid, ν_{inc} este frecvența radiației electromagnetice incidente. Electronul aflat pe nivelul energetic fundamental E_0 va absorbi complet această radiație și va trece pe un nivel superior, acesta având energi:

$$E_1 = E_0 + E_{inc} \quad (5.1.8.)$$

Electronul nu poate sta în această stare decât un timp finit, astfel încât el va reveni pe starea inițială, pierzând o energie egală cu diferența valorilor energiilor de pe cele două nivele:

$$E_1 - E_0 = E_{em} + Q = h\nu_{em} + Q = \frac{hc}{\lambda_{em}} + Q \quad (5.1.9.)$$

Acesta este ecuația bilanțului energetic în cazul emisiei prin fluorescență.

O parte din energie va fi emisă în exterior sub formă de radiație electromagnetică, dar vor exista și pierderi, sub alte forme de energie Q . Comparând ecuațiile (5.1.7.), (5.1.8.) și (5.1.9.), se observă că:

$$E_{em} < E_{inc} \rightarrow \lambda_{em} > \lambda_{inc} \quad (5.1.10.)$$

Valorile celor două lungimi de undă sunt specifice fiecărei substanțe care prezintă fenomenul de fluorescență (sunt destul de puține substanțe naturale care prezintă acest fenomen).

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

Un exemplu tipic este cel în care excitarea se realizează cu radiație din domeniul ultraviolet (invizibilă pentru ochiul uman), iar emisia este în domeniul vizibil.

Există și câteva cazuri particulare când un electron absoarbe doi fotoni incidenti, trece într-o stare excitată, iar în procesul de dezexcitare, emite o radiație cu o lungime de undă mai mică decât cea incidentă.

În general, nu toți fotonii absorbiți interacționează cu un electron, sau nu toți electronii aflați într-o stare excitată, vor reveni pe starea fundamentală emițând o radiație electromagnetică. În acest caz, se definește **randamentul cuantic** al fenomenului de fluorescență, ca fiind raportul dintre numărul de fotoni emiși și numărul de fotoni absorbiți. De obicei, acesta se calculează relativ la o substanță standard care se consideră a fi soluția de sulfat de chinină în acid sulfuric.

Timpul de viață pentru mecanismele implicate în fenomenul de fluorescență se referă la timpul cât electronul stă în starea excitată înainte de a reveni pe nivelul fundamental. Pentru substanțele fluorescente cel mai des folosite, timpii de viață sunt de ordinul nanosecundelor.

Diagrama Jablonski se referă la nivelele energetice din atom implicate în fenomenul de fluorescență, adică în mecanismul de excitare și dezexcitare (Fig. 5.1.5).

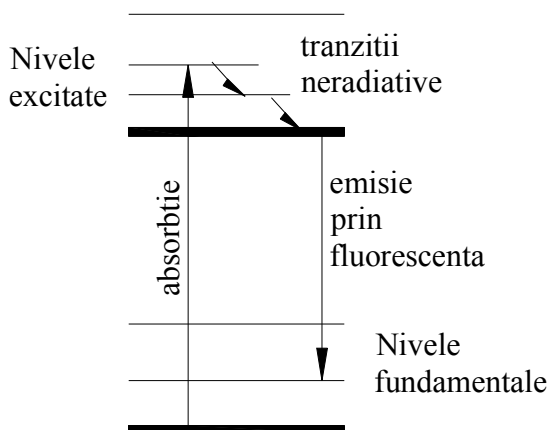


Fig. 5.1.5. Nivele energetice atomice implicate în procesul de fluorescență

Componentele principale ale unui microscop de fluorescență inversat Nikon Eclipse TiU (Fig. 5.1.6.), în ordinea în care sunt parcurse de către fasciculul luminos, care trebuie introdusă în calea optică pentru a detecta preparatele în modul de examinare - fluorescență, sunt:

1. Sursa de iluminare este o lampă cu vapori de mercur de mare presiune având un spectru discret (lungimi de undă în ultraviolet și vizibil)
2. Filtru de excitare
3. Filtru dicroic
4. Obiectiv de microscop
5. Preparat marcat cu un marker de fluorescență

6. Obiectiv de microscop
7. Filtru dicroic
8. Filtru de emisie
9. Senzor sau detector (aparatură foto, cameră video, ochi)



a)



b)

Fig. 5.1.6. a) Vedere de ansamblu a microscopului Nikon Ti-U, b) panoul frontal al sistemului de alimentare pentru lampa cu vapori de mercur

- Fasciculul provenit de la lampa cu mercur va fi incident pe filtrul de excitare. Dintre toate lungimile de undă care formează spectrul discret caracteristic mercurului, acest filtru va lăsa să treacă doar pe cele mai mici decât o valoare de prag înscrisă pe blocul de filtre. Exemple de filtre și domeniile de lungimi de undă care există F1: 380-420 nm, F2: 450-490 nm, F3: 510-580 nm (intervalele de lungimi de undă sunt enumerate în ordinea filtrelor). Celelalte lungimi de undă sunt absorbite sau reflectate de acest filtru.
- Radiațiile cu lungimile de undă selectate vor ajunge la filtrul dicroic, care are rol de oglindă și va reflecta în sus, spre probă, aceste radiații cu lungime de undă mică. Unghiul de incidență pe acest filtru este de 45° , rezultând o schimbare cu 90° a direcției de propagare. Exemple de filtre și domeniile de lungimi de undă care există F1: 430 nm, F2: 505nm, F3: 575 nm (intervalele de lungimi de undă sunt enumerate în ordinea filtrelor).
- Radiațiile vor trece prin obiectiv și vor ajunge la probă, unde se produce fenomenul de fluorescență. Sunt emise radiațiile cu lungime de undă mare.

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

- Acestea sunt preluate de către obiectiv care va mări imaginea probei.
- Ele sunt direcționate spre filtrul dicroic care, de data aceasta, nu va modifica direcția de propagare și va transmite nedeviate radiațiile cu lungimea de undă mare.
- Următorul element întâlnit va fi filtrul de emisie care nu va lăsa să treacă decât radiațiile cu lungimile de undă ce depășesc o anumită valoare de prag; restul fiind absorbite sau reflectate. Exemple de filtre și domeniile de lungimi de undă care există F1: 450 nm, F2: 520 nm, F3: 590 nm (intervalele de lungimi de undă sunt enumerate în ordinea filtrelor).
- Semnalul de fluorescență astfel format ajunge la detector/senzor. Pentru a-l vizualiza cu ochiul prin ocular, trebuie să avem indicația EYE la comutatorul din dreapta-jos-față al microscopului.
- Rotind acest comutator până în dreptul indicației L, se va obtura calea spre ochi, deschizând calea spre senzorul camerei video CCD. Imaginea preluată de aceasta va fi vizualizată pe monitorul computerului utilizând softul specializat NIS ELEMENTS. Atenție: înainte de a apela deschiderea soft-ului, camera CCD să fie pornită și stick-ul de tip DONGLE să fie introdus în computer.

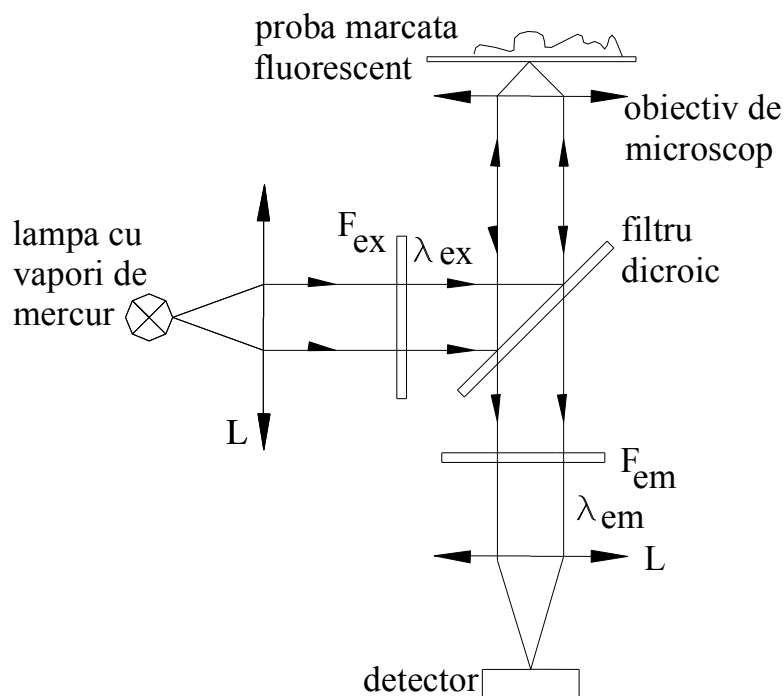


Fig. 5.1.7. Schema de principiu a unui microscop de fluorescență

Acest tip de examinare, în care excitația preparatului cât și detecția semnalului de fluorescență se realizează pe aceeași cale optică (în acest caz același obiectiv de microscop), se numește **microscopie de epifluorescență**.

Fluorimetrul

În afară de detectarea preparatelor biologice marcate fluorescent prin microscopie, aparatul cel mai des folosit în laboratoarele de medicină, biologie, biofizică, biochimie, este **fluorimetrul**. Acesta este un aparat foarte sensibil care poate detecta concentrații foarte mici, de până la o parte dintr-un trilion de substanță fluorescentă conținută într-un preparat.

După ce proba este excitată, un fluorimetru permite determinarea lungimilor de undă de emisie prin fluorescență, intensitatea acestor linii cât și durata de viață. Cu ajutorul său se pot analiza procese cum ar fi interacțiunea dintre solvent și solvit, interacțiunii inter-și intra-moleculare. Schema de principiu a unui fluorimetru este prezentată în Fig. 5.1.7.

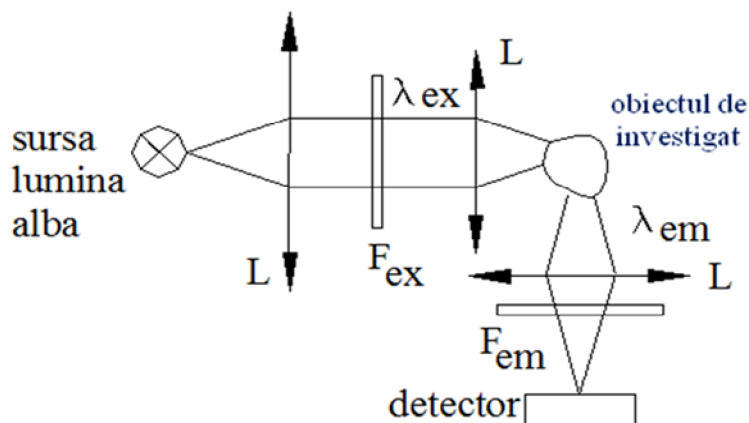


Fig. 5.1.7. Schema de principiu a unui fluorimetru

Sursa luminoasă este o lampă cu xenon sau cu mercur astfel încât spectrul de emisie să conțină și câteva lungimi de undă în ultraviolet.

Folosind un sistem de oglinzi sferice, lumina este focalizată pe fanta de intrare a unui monocromator (se preferă oglinzile în locul lentilelor deoarece acestea focalizează toate lungimile de undă în același loc pe fantă, evitându-se astfel aberațiile cromatice).

Fantele sunt ajustabile, de obicei.

Monocromatorul este practic format dintr-o rețea de difracție care desparte lumina incidentă de la lampă în componentele ei spectrale (culorile conținute).

Prin rotirea acestei rețele se aduce lungimea de undă dorită în dreptul fantei (care o direcționează spre preparatul analizat).

Înainte de a ajunge la probă, radiația este împărțită astfel încât o parte ajunge la un detector care îi monitorizează intensitatea și lungimea de undă.

Radiația emisă de probă este incidentă pe o altă rețea, a monocromatorului de emisie, având același rol.

Diferitele lungimi de undă sunt orientate spre un detector sensibil deoarece semnalul emis este mult mai slab.

Aplicațiile la care se poate folosi fluorimetrul sunt din domeniile: chimie, biochimie, biofizică, biologie, medicină, botanică, agronomie, zootehnie, studiul mediului înconjurător.

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

Surse monocromatice - LASER

Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation - două sisteme fizice în interacție:
**câmpul electromagnetic din interiorul unui rezonator optic și
un mediu activ situat în același rezonator optic.**

un sistem care să excite atomii de pe nivelul inferior pe cel superior -
sistem de pompaj.

Părțile componente principale:

mediul activ
sistemul de pompaj
rezonatorul optic

Condiție

Atomii, moleculele sau ionii mediului activ au cel puțin *două nivele energetice* a căror diferență de energie corespunde unei frecvențe care este în rezonanță cu una din frecvențele proprii ale rezonatorului optic.

Dacă atomii, moleculele sau ionii mediului activ sunt trecuți pe nivelul energetic superior printr-un mecanism oarecare, modul electromagnetic rezonant îi stimulează pentru a trece pe nivelul energetic inferior.

În decursul acestui proces de *emisie stimulată*, atomii transferă diferența de energie câmpului electromagnetic din cavitate, energia tuturor atomilor fiind transferată unui singur mod de oscilație a cărui frecvență este în rezonanță cu frecvența rezonatorului optic.

Dacă este asigurată o inversie de populație între cele două nivele atomice, dispozitivul este un *amplificator cuantic de radiație*.

TIPURI de LASER-e

- ☐ **Mediul activ** este solid (solid-state sau semiconductor), lichid sau gazos;
- ☐ **Lungimea de undă** se află în domeniul spectral infraroșu, vizibil sau ultraviolet, X-ray lasers;
- ☐ **Modul de operare** este continuu sau în pulsuri;
- ☐ Lungimea de undă este fixă sau acordabilă (tunabil).
- ☐ Au module speciale emițând fundamentala, prima armonică, a doua, sau armonici superioare

Mărimi fizice caracteristice ale unui fascicul laser

energia -

puterea - rata de energie

iradianța - densitatea de putere - puterea pe unitatea de arie

fluența - densitatea de energie - energia pe unitatea de arie (iradianța înmulțită cu timpul de expunere)

frecvența de repetiție și durata pulsului

Performanțele laserilor actuali

- Puteri de vârf $> 10^{12}$ W;
- Lungimea pulsurilor mai mică ca 10^{-15} s;
- Diode laser eficiente și ieftine 400 nm, 620 – 670 nm, 700 – 1600 nm; + **în infraroșu:** CO₂ (10,6 μm), erbiu (1,55 μm), Nd:YAG (1,064 μm), Nd:sticlă (1,054 nm); **în vizibil:** rubin (693 nm), Kr⁺ (676, 647 nm), He-Ne (633 nm), Cu (578 nm), armonica a doua Nd:YAG (531 nm), Ar⁺ (514, 488 nm), He-Cd (442 nm); **în ultraviolet:** Ar⁺ (364, 351 nm), armonica a treia Nd:YAG (355 nm), N₂ (337 nm); He-Cd (325 nm), armonica a patra Nd:YAG (266 nm), excimer (308, 248, 193, 150 nm);

Q-switch: aceasta este o tehnică prin care un laser poate fi fabricat încât să producă un puls de lumină de o mare putere de vârf (GW).

Mode-locking: aceasta este o tehnică în optică, prin care un laser poate fi fabricat încât să producă un puls de lumină de o durată extrem de scurtă de ordinul ps sau fs.

Proprietățile radiației laser

Strălucirea

Considerând Soarele ca un corp negru la $T = 10^3$ K care emite în domeniul $10^3 \text{ \AA} - 1 \text{ cm}$, intensitatea totală a radiației este aproximativ 10^7 W/m^2 , iar strălucirea la suprafață $B \approx 10^6 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1}$.

În cazul unui laser cu He-Ne având puterea $P = 1 \text{ mW}$ $d_0 = 1 \text{ mm}$, $\lambda = 6328 \text{ \AA}$, intensitatea maximă este $6,4 \cdot 10^2 \text{ W/m}^2$, iar strălucirea $B \approx 5 \cdot 10^9 \text{ W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1}$. Valori mult mai mari ale strălucirii se obțin în cazul laserelor cu rubin care funcționează în regim *Q-switched*, $B \approx 10^{16} \text{ W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1}$, respectiv cel cu sticlă dopată cu Nd care emite la lungimea de undă $\lambda = 1,06 \text{ μm}$ și are puterea de $3 \cdot 10^{14} \text{ W}$, $B \approx 5,34 \cdot 10^{26} \text{ W} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{sr}^{-1}$.

Direcționalitatea determinată de unghiul de divergență. Un laser cu He-Ne având puterea $P = 1 \text{ mW}$ și o dimensiune a spotului fasciculului gaussian $d_0 = 1 \text{ mm}$, $\lambda = 6328 \text{ \AA}$, are unghiul de divergență $\theta = 2 \cdot 10^{-4} \text{ rad}$, iar unghiul solid $\Omega = 1,3 \cdot 10^{-7} \text{ sr}$.

Monocromaticitatea. este proprietatea unei radiații de a avea o unică lungime de undă (frecvență) constantă în tot timpul propagării. Orice sursă de lumină este caracterizată de un interval de lungimi de undă, sau de frecvențe

$\delta\nu$ fiind lărgimea de bandă spectrală

De exemplu, un laser HeNe are o lărgime de bandă de 0.002nm în jurul valorii de 632.8nm, iar un laser cu Ti:Sapphire are lărgimea de bandă de 30nm în jurul valorii de 800nm.

Coerența. Coerența reprezintă proprietatea undelor de a avea aceeași lungime de undă și o diferență de fază constantă în timp. În cazul suprapunerii undelor coerente ia naștere fenomenul de interferență staționară.

Coerența spațială. Coerența spațială este determinată de proprietățile transversale ale undelor electromagnetice. Din punct de vedere al proprietăților spațiale, radiațiile emise de sursele clasice sunt net inferioare celor laser. Se referă la posibilitatea ca două fascicule care provin de la aceeași sursă să interfere chiar și după ce au străbătut drumuri cu lungimi diferite (dar diferența de drum optic nu trebuie să depășească lungimea de coerență).

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

Coerența temporală. Dacă radiația emisă la un moment dat de un punct al sursei poate interfera cu radiația emisă la un moment ulterior de același punct al sursei, cele două radiații sunt coerente temporal, mărimea intervalului de timp caracterizând *coerența temporală* a sursei. Lungime de coerență temporală

$$\tau_{coer} = \frac{1}{2\pi \cdot \delta\nu} \quad \text{timp de coerență al radiației monocromatice,}$$
$$l_{coer} = c \cdot \tau_{coer} = \frac{c}{2\pi \cdot \delta\nu} \quad \text{lungimea de coerență.}$$

Tipuri de tranziții între nivelele energetice ale atomilor -

1. Bohr

Să ne imaginăm doi atomi aflați în diferite stări cuantice: unul în starea fundamentală 1 și altul în starea excitată 2. Atunci, fiecare se află în stările caracterizate de energiile discrete: W_1 și W_2 (vom presupune că $W_1 < W_2$). Atomul care se află în starea W_2 poate reveni în starea W_1 după un timp dt , emițând o radiație cu frecvența:

$$\nu_{21} = \frac{W_2 - W_1}{h}$$

Această tranziție cuantică este un proces aleatoriu, putându-se vorbi de probabilitatea ei de producere.

Se poate petrece și fenomenul invers de trecere a atomului din starea 1 în starea 2, dar în acest caz, este necesară absorbția din exterior a unei radiații cu frecvența

$$\nu_{12} = \nu_{21} = \nu$$

Această teorie a lui Bohr de emisie și absorbție, nu explică faptul constatat experimental, că diferite linii spectrale au intensități diferite.

2. Einstein

Einstein a dezvoltat această teorie, considerând că intensitatea liniilor spectrale este proporțională cu probabilitatea de tranziție de pe un nivel discret din atom pe un alt nivel discret din atom.

Pentru a descrie interacția dintre substanță și radiația electromagnetică, Einstein a considerat substanța ca un ansamblu de atomi, caracterizați doar de cele două nivele energetice considerate mai sus (considerăm doar două nivele pentru simplitate).

Acești atomi se află într-o incintă.

Ei nu interacționează între ei, ci doar cu radiația termică de echilibru din interiorul incintei.

Ei pot absorbi energie de la aceasta sau pot ceda o parte din energia lor, câmpului electromagnetic.

În timpul interacției, pot avea loc trei categorii distincte de tranziție:

absorbție: un foton incident cedează energia sa unui electron aflat pe un nivel inferior în atom. Electronul se va deplasa pe un nivel superior, primind de la foton energia egală cu diferența energiilor celor două nivel eîntre care s-a deplasat.

emisie spontană: un electron aflat pe un nivel superior trece spontan pe un nivel inferior cedând în exterior energia egală cu diferența energiilor celor două nivele. Această energie este preluată de către un foton.

emisie stimulată: un foton incident ciocnește un electron aflat pe un nivel superior. Electronul trece pe un nivel inferior, cedând în exterior o energie egală cu diferența energiilor celor două nivele. Această energie este preluată de către un foton. Și fotonul inițial avea o energie egală cu diferența energiilor celor două nivele. Rezultă doi fotoni cu energii egale formând o radiație coerentă.

Considerăm în continuare că populațiile celor două nivele sunt: N_1 și respectiv N_2 . În cazul considerat mai sus dacă $W_1 < W_2$, atunci avem $N_2 < N_1$ în condiții normale. Acest lucru se poate demonstra considerând atomii mediului respectiv la echilibru termodinamic.

$$N_1 = g_1 \cdot \exp\left(-\frac{W_1}{kT}\right) \quad N_2 = g_2 \cdot \exp\left(-\frac{W_2}{kT}\right)$$

la temperaturi suficient de mari, raportul celor două populații este:

$$\frac{N_2}{N_1} = \frac{g_2 \cdot \exp\left(-\frac{W_2}{kT}\right)}{g_1 \cdot \exp\left(-\frac{W_1}{kT}\right)} = \frac{g_2}{g_1} \exp\left(-\frac{W_2 - W_1}{kT}\right) = \frac{g_2}{g_1} \exp\left(-\frac{\hbar\omega}{kT}\right)$$

g_1 și g_2 sunt constante, iar aceste dependențe ale numărului de sisteme atomice care populează un nivel energetic într-un mediu aflat în echilibru termodinamic la temperatura T , sunt date de legea Boltzmann.

EMISIE SPONTANĂ $2 \rightarrow 1$

Procesul de *emisie spontană* constă în fenomenul prin care un atom aflat pe nivelul (2) trece spontan pe nivelul (1) cu energie mai mică, emițând diferența de energie sub forma unui foton.

Datorită acestui proces, numărul de atomi ai nivelului (2) scade în timpul dt , conform :

$$dN_2 = -A_{21}N_2 dt$$

Numărul de tranziții ale atomilor în intervalul dt este proporțional cu probabilitatea A_{21} a tranziției cuantice

A_{21} reprezintă *coeficientul de emisie spontană al lui Einstein* și are semnificația probabilității ca în unitatea de timp să aibă loc un proces de emisie spontană.

Observăm că acest proces nu depinde de prezența radiației electromagnetice.

Minusul arată că numărul de sisteme de pe nivelul 2 scade în timp datorită procesului de emisie spontană.

Integrând această ecuație știind că în momentul inițial avem un număr cunoscut de atomi în starea (2), atunci scăderea populației este de tipul:

$$N_2(t) = N_2(0) \cdot \exp(-A_{21}t) = N_2(0) \cdot \exp(-t/\tau_2)$$

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

unde τ_2 este timpul de viață mediu al nivelului (2), adică timpul după care populația inițială a nivelului scade de e ori. Acest timp de viață este foarte scurt, de obicei de ordinul 10^{-8} s.

EMISIE STIMULATĂ

Este fenomenul prin care un atom de pe nivelul (2) trece pe nivelul (1) în prezența unei electromagnetice cu frecvența ν_{21} și cu densitatea spectrală de energie w_ω .

Ca urmare a acestui proces, fotonul emis se adaugă fotonului incident cu aceeași pulsație de care este legat printr-o relație de fază. Se obține o radiație electromagnetică coerentă, cu proprietăți deosebite. Această radiație este emisă de un laser.

Prin acest proces, populația nivelului (2) scade conform relației:

$$dN_2 = -B_{21} \cdot w_\omega \cdot N_2 \cdot dt$$

B_{21} este *coeficientul de emisie stimulată al lui Einstein*, iar

$B_{21} \cdot w_\omega$ este probabilitatea ca în unitatea de timp să aibă loc un proces de emisie stimulată.

ABSORBȚIE

Absorbția energiei electromagnetice de către atomii de pe nivelul (1), este fenomenul în urma căruia numărul de atomi de pe nivelul (1) scade în timp conform relației:

$$dN_1 = -B_{12} \cdot w_\omega \cdot N_1 \cdot dt$$

B_{12} este *coeficientul de absorbție al lui Einstein*,

iar w_ω densitatea de energie spectrală

$B_{12} \cdot w_\omega$ reprezintă probabilitatea ca în unitatea de timp să aibă loc un proces de absorbție.

În urma absorbției unui foton are loc o tranziție a electronului între nivelele (1) $\rightarrow$ (2).

Echilibrul termodinamic este atins când numărul proceselor de absorbție este egal cu cel al proceselor de emisie (stimulată și spontană) într-un interval de timp dat:

Inversia de populație

Din relația raporturilor populațiilor, se observă că dacă avem $W_1 < W_2$, atunci avem și $N_2 < N_1$ pentru temperaturi pozitive. Dacă însă printr-un sistem de pompaj se realizează inversia de populație $N_1 < N_2$, atunci rezultă temperatură negativă. Dacă un foton este incident într-un astfel de mediu în care s-a realizat inversia de populație. Atunci, datorită fenomenului de emisie stimulată, dintr-un foton incident se obțin doi, din care se obțin apoi patru..... Astfel, avem o reacție în lanț care duce la apariția unui mare număr de fotoni.

Aplicații ale laserelor -

1. Terapia

Laserele au diverse aplicații, atât în domeniul fundamental al științei (fizică, chimie, biologie) cât și în domeniul aplicativ: telecomunicații, producerea plasmelor termonucleare, fotografiere ultrapidă, separarea izotopilor, uzinaj fonic, măsurători tehnologice nedistructive, telemetrie, meteorologie, metrologie, medicină etc.

Laserii implicați în medicină au evoluat în timp, acum fiind disponibil un mare număr de sisteme laser, dar toate au folosit

principiul de fototermoliză selectivă.

Acest principiu stabilește:

cantitatea exactă de energie, lungimea de undă exactă pentru un anumit țesut care să distrugă sau să deterioreze doar acel țesut și să nu afecteze țesuturile vecine

Timpul de relaxare termică: *timpul de care are nevoie un țesut pentru a conduce termic 50% din energia laserului către țesuturile vecine. Aproximativ, poate fi considerat proporțional cu pătratul diametrului fascicolului laser.*

Dacă laserele care emit în continuu sunt ținute pe țesut un timp mai mare decât timpul de relaxare, atunci o cantitate excesivă de căldură va fi condusă spre țesuturile vecine

Timpul de izolare, este timpul în care căldura cedată mediului de către fasciculul laser, nu este transferată mediului înconjurător și este aproximativ un sfert din timpul de relaxare.

Se consideră că dublând mărimea spotului, se mărește volumul efectiv de interacție de 8 ori.

Radiația laser are capacitatea de a stimula unele procese biologice, de a grăbi vindecarea rănilor și a fracturilor, de a produce efecte terapeutice prin **lasero-punctură** (echivalent al acupuncturii)

se bazează tot pe fenomenul de fototermoliză selectivă

- - energia laserului este transferată restrictiv unui anumit loc din țesut datorită absorbției selective a **cromoforului** din acel loc
- - se alege o anumită lungime de undă și timp de expunere pentru a atinge doar țesutul dorit, fapt ce distinge laserul ca unealtă selectivă față de altele din medicină
- - efectele pot fi: vaporizarea, coagularea, fotoruperea.

Atunci când radiația laser este folosită la tratamentul cancerului de piele, sau tumori: se folosește principiul:

când se iradiază cu o radiație de o lungime de undă adecvată, are loc o reacție chimică în urma căreia se eliberează o substanță toxică care apoi distruge selectiv tumoarea. producerea radicalilor liberi care sunt foarte toxici pentru celulele vii

Factori

Proprietățile optice ale țesuturilor biologice

sunt neomogene și în general absorbante,

cu un indice de refracție mai mare decât al aerului - responsabil de reflexia la interfața aer-țesut

Cele mai importante proprietăți sunt:

- coeficientul de reflexie
- coeficientul de absorbție
- coeficientul de împrăștiere
- anizotropia optică (probabilitatea de împrăștiere depinde de unghi)

- Ele împreună determină transmisia totală care este diferită la diferite tipuri de țesut și la diferite lungimi de undă.

De obicei, la suprafața țesuturilor, apare fenomenul de reflexie difuză dacă nu sunt șlefuite, excepție făcând suprafața mediilor transparente (cornea).

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

Partea dintr-o moleculă, responsabilă de culoarea ei, este **cromoforul** - absoarbe o anumită lungime de undă și transmite sau reflectă celelalte, dând moleculei culoarea. El determină schimbarea configurației moleculei când asupra sa este incidentă o radiație luminoasă.

Principalele componente-cromofore absorbante sunt:

- **hemoglobina în sânge** - predominantă în țesuturile vascularizate. Absoarbe puternic lungimile de undă din vizibil și ultraviolet și este transparentă pentru celelalte lungimi de undă. Maximele de absorbție sunt la: **280nm, 420nm, 540nm, 580nm**.
- **melanina în piele, păr** - este pigmentul de bază din piele. Coeficientul ei de absorbție crește monoton de-a lungul domeniului **vizibil, spre UV**.
- **apa** (constituentul de bază al tuturor țesuturilor) absoarbe puternic în IR și de aceea, radiația laserelor cu CO₂ care emit la 10600nm nu pătrund prea adânc în țesuturi 0.1mm, dar pot produce încălziri. Radiația laserului cu Nd:YAG (1064nm) are o adâncime de pătrundere mai mare 5-10mm.
- **proteinele** - sunt macromolecule cu efect secundar în absorbție. Absorb mai ales în **UV** și vizibil, cu maximul cel mai mare la 280nm.

Când radiația este absorbită, ea furnizează o mare energie țesuturilor, iar reacția țesutului depinde de intensitatea radiației și de timpul de expunere. Categoriile importante de interacție sunt:

1. fotomecanică - la aplicarea de pulsuri scurte (ns-fs) și intense (10^6 - 10^7 W/cm²) care produc o încălzire rapidă cu evaporarea și formarea unui nor de plasmă (ioni) care se extinde termic rapid. Se produc și unde de șoc.
2. fototermică - la aplicarea pulsurilor cu energii puțin mai mici și cu durata puțin mai mare care sunt absorbite de cromofor și transformate în căldură care e disipată ducând la denaturarea proteinelor (la 42-65°C). Pentru a minimiza efectele nedorite trebuie ca timpul de expunere să fie mai mic decât cel de relaxare termică (pulsuri de ms 10 - 10^6 W/cm²).
3. fotochimică - la aplicarea pulsurilor cu intensitate și mai mică, durată și mai mare (min-sec) duc la un transfer de energie încet care induce reacții chimice folosite în terapia fotodinamică (PDT) și în LASIK corectarea vederii. Laserele cu excimeri (UV) sunt folosite pentru a rupe legăturile covalente în proteine.

Ele de obicei coexistă în același timp în același loc, dar prin selectarea adecvată a lungimii de undă, a intensității și a duratei pulsului, se poate maximiza unul sau altul dintre efecte.

2. Chirurgia

- chirurgie cosmetică: îndepărtează cicatrici, tatuaje, semne din naștere, păr, riduri
- stomatologie: îndepărtarea cariilor, albirea dinților, chirurgie orală
- dermatologie: tratamentul acneei, cancer de piele
- chirurgie laser pentru desprinderi de retină, cataractă și glaucom, otorinolaringologie, histologie (forarea și tăierea țesuturilor osoase), gastroenterologie

- microfascicule pentru chirurgie intracelulară
- cardiologie: angioplastie și recanalizarea vaselor
- neurologie: tăierea, vaporizarea și coagularea țesuturilor fără contact mecanic
- urologie: litotripsy (îndepărtarea pietrelor)
- terapie fotoradiativă
- tehnici de colorare și marcarea pentru distrugerea selectivă a celulelor cancerigene

produce leziuni mai mici
 necesită un timp mai scurt
 energie mică, deci stricăciuni mici în zonele vecine
 poate fi focalizat în volume de zecimi de micrometri cubi
 poate distruge structuri celulare în număr mic
 precizia în poziționare
 posibilitatea lucrului în locuri greu accesibile utilizând fibrele optice
 puțină sângerare (evaporă celulele atinse și le cauterizează pe celelalte)
 traumatism redus în vecinătatea impactului (absența edemului)
 reducerea durerii sau chiar dispariția ei
 zona afectată termic de bisturiul laser are grosimea sub 10microni
 atunci când viteza de tăiere este lentă, trebuiesc luate măsuri de securizare față de fascicul

Chirurgia cu laser este foarte precisă, nu solicită efort mecanic și nu este însoțită de sângeri importante, deoarece pereții plăgii se coagulează termic iar vasele mai mici se închid

Prima intervenție cu laserul pe ochiul uman - în 1988 în Germania
 ACUM pentru: corectarea defectelor de vedere (miopiei, hipermetropiei și astigmatismului), în cataracta secundară, în unele forme de glaucom
 Tehnica **LASIK** (laser assisted *in situ* keratomileusis) este mai eficientă în viciile de refracție severe. /nedureroasă /după câteva ore de la operație, pacientul fiind complet refăcut.
 Raza laser, ghidată de computer, șlefuieste corneea, modelând curbura acesteia. Cu o precizie extraordinară, laser-ul înlătură straturi ultrasubțiri de țesut.
 În cazul **miopiei**, laser-ul scurtează axul ochiului, aplatizând corneea. Pentru **astigmatism**, se îndepărtează o suprafață eliptică dintr-un anumit meridian.
 În **dezlipirile de retină**, deoarece fasciculul laser poate străbate mediile transparente ale ochiului fără a fi absorbit de acestea, întreaga lui energie fiind cedată retinei, care se lipește de sclerotică prin fotocoagulare de artere ale căror scăpări dau naștere la borosulfuri.
 Tratamentul **glaucomului**, permițând refacerea sistemului de drenaj al lichidului intraocular și scăzând, astfel, presiunea intraoculară.

PERICOLE:

- + încălziri peste limită
- + densități mari de putere localizată chiar la distanțe mari de sursă
- + cristalinul ochiului poate acționa ca o lentilă ce focalizează pe retină, ducând la apariția unor pete-zone moarte.
- + 0.01W de la un laser pe retină este periculos, pe când 60W de la un bec obișnuit este suportat

Gradele de periculozitate ale laserelor:
 CLASA 1 - siguri în orice condiție

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

CLASA 2 - nesiguri pentru ochi până la 1mW și timp de expunere pe ochi sub 0.25s

CLASA 3A - în continuu până la 5mW radiația directă pe ochi e periculoasă

CLASA 3B - în continuu până la 0.5W siguri doar pentru a vedea radiația difuzată

CLASA 4 - nesiguri - produc și arsuri pielii, iar pt ochi foarte periculoși

Tomografie optică coerentă (optical coherence tomography OCT)

Montajul experimental se bazează pe interferometrul Michelson

Proba este fixată într-unul din brațe

Pe detector (cameră video sau foto) se înregistrează imaginea de interferență dintre fascicolul provenit de la probă și cel de referință

Prin rotații ale oglinzii din același braț cu proba, se realizează scanări la o anumită adâncime din probă, în plan transversal, obținându-se imaginea unei secțiuni (*tom* – secțiune)

Prin deplasări de-a lungul axei ale oglinzii din brațul de referință se obțin secțiuni de la diferite adâncimi, investigându-se corneea sau sub nivelul pielii

- se alege secțiunea de investigat și se împarte în elemente de volum, numite **voxeli** (*volume elements*). De la fiecare voxel se obține un semnal.

- Semnalul provenit de la un voxel este detectat de către un dispozitiv specific (traductor) și prin intermediul unui convertor analogo-digital este introdus într-un calculator unde se reconstruiește imaginea pe baza semnalelor primite de la toți voxelii.

- Fiecărui voxel îi corespunde un element de imagine digitală numit **pixel** (*picture element*). Elementele de imagine sunt ordonate într-o matrice, în general pătratică, cu n linii și n coloane, astfel încât numărul total de pixeli va fi n^2 .

- Fiecărui element (punct al imaginii) i se asociază convențional o anumită culoare sau nuanță de gri și un grad de luminozitate.

- Are rezoluție de micrometri.

- există sisteme comerciale pentru: conservarea obiectelor de artă (se analizează diferite strate), diagnosticarea în medicină, în oftalmologie pentru a obține imagini detaliate ale retinei, în cardiologie pentru a diagnostica boli coronariene.

În interferența care implică lasere cu lungime de coerență mare, figura cu franje apare și după distanțe de metri. În OCT, interferența este obținută cu surse cu spectru larg de frecvențe. Orice radiație care nu respectă condiția de coerență, nu interferează.

Această tehnică oferă imagini de sub suprafața unui obiect transparent, poate studia probe vii, direct, în timp real, nu e nevoie de o pregătire anterioară a probei, nu folosește radiații ionizante.

Rezoluția ei este mai bună decât cea a imaginilor obținute cu sunete sau ultrasunete.

Sursele care se folosesc nu sunt periculoase (IR apropiat), nu se strică proba.

De notat este faptul că o parte din radiație nu este reflectată ci împrăștiată, dar numai radiația reflectată este coerentă.

În OCT, interferometrul optic este astfel folosit încât să detecteze doar lumina coerentă. Tehnica este mărginită la obținerea imaginilor cu 1-2mm sub suprafața țesuturilor biologice, deoarece la adâncimi mai mari, radiația care nu este împrăștiată este foarte mică pentru a mai putea fi detectată.

Citometria de flux

Un alt aparat comercial, introdus de curând în laboratoarele din clinicile medicale sau spitale, este **citometrul** (Fig. 5.1.8.) care folosește fenomenul de fluorescență.

Sursele de radiații sunt diferite lasere.

Scopul principal al acestui aparat este de a număra celulele pe anumite categorii, după caracteristicile lor.

Pentru a fi încadrate într-una dintre categorii, celulele sunt marcate fluorescent și introduse într-un sistem fluidic.

Acestea vor curge prin fața unui sistem format din mai mulți laseri, unul din ei având acea lungime de undă specifică pentru a produce fenomenul de fluorescență a unei anumite categorii de celule (și pentru alte categorii, nu).

Semnalul de fluorescență specific trece printr-un sistem de filtre dicroice care reflectă (la 45°) anumite lungimi de undă, lăsându-le pe celelalte nedeiate spre filtrul următor. În dreptul fiecărui filtru este poziționat un detector pentru o lungime de undă specifică. În momentul în care unul din detectori primește un semnal, acesta este asociat cu o anumită clasă de celule. În acel moment, sunt comandate anumite circuite aflate în calea pe care o urmează apoi celula. Acestea acționează impedimetric sau electrostatic asupra celulei respective (care trece în acel moment prin dreptul lor), direcționând-o pe un drum specific, în concordanță cu semnalul de fluorescență detectat.

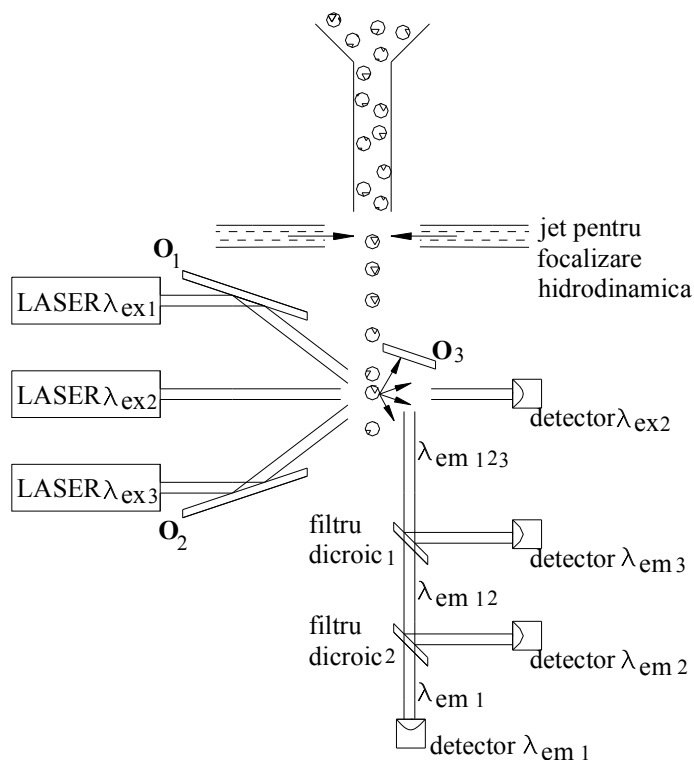


Fig. 5.1.8. Schema de principiu a unui citometru de flux

Multe aparate au posibilitatea și de a **sorta celule/particule** cu diferite proprietăți.

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

Acestea furnizează semnale diferite detectorului, care, în timp real analizează semnalul și îl compară cu o bază de date. Dacă semnalul se încadrează într-un anumit tipar de sortare aflat în memoria aparatului, atunci celula este de un anumit tip și se aplică un câmp electric exact în momentul precis în care trece acea celulă. Tot lichidul se sparge în picături conținând celule.

Apoi ea cade din microcanal între două plăci metalice care sunt puternic pozitive și negative, respectiv. Particula încărcată, se îndreaptă spre placa încărcată opus și direcționată spre un anumit vas.

Apoi câmpul electric este îndepărtat.

5.2. Analizatorul vizual. Defecte de vedere

Notiuni de optică geometrică

O lentilă optică este un mediu transparent pentru lungimile de undă din vizibil separat de mediul exterior prin două suprafețe, dintre care cel puțin una este curbă.

Suprafața curbă poate fi sferică, cilindrică sau alte combinații.

O lentilă este considerată subțire atunci când grosimea ei d este mică în comparație cu razele de curbură ale suprafețelor care o delimitează.

Dacă focarele sunt reale, adică razele paralele se strâng, după trecerea prin lentilă, într-un punct real, lentila se numește **convergentă sau pozitivă**.

În cazul focarelor virtuale, fasciculele paralele devin, după refracție, divergente, iar lentila se numește divergentă sau negativă.

Lentilele convergente au marginile subțiri, iar cele divergente au marginea mai groasă decât centrul.

O **lentilă sferică** reprezintă un mediu transparent caracterizat de două raze de curbură a suprafețelor sale șlefuite (R_1 și R_2) și de un anumit indice de refracție ($n_{\text{lentilă}}$). Lentilele sunt considerate subțiri dacă razele de curbură ale suprafețelor sunt mult mai mari decât grosimea lor. (este decupată dintr-o sferă)

Lentile cilindrice - ale căror fețe sunt decupate din niște cilindrii.

focarul este acel punct în care se întâlnesc razele de lumină care vin de la infinit, paralel cu axul optic principal după ce străbat lentila, respectiv punctul din care pleacă razele de lumină care, după refracția pe lentilă, merg paralel cu axul optic principal.

Vom vorbi în continuare despre lentile sferice convergente.

Dreapta care trece prin centrele de curbură ale celor două suprafețe este considerată **axul optic principal al lentilei** (Fig. 5.2.1.a), iar punctul său de intersecție cu dreapta ce unește marginile lentilei, se numește **centrul lentilei**.

Orice altă dreaptă care trece prin centrul lentilei, se numește **ax optic secundar**.

O lentilă este caracterizată prin valoarea **distanței focale**, care este distanța dintre lentilă și punctul în care se strâng razele unui fascicul ce intră în lentilă paralel cu axul optic principal. Orice lentilă are două focare principale, situate pe axul optic: F_1 este focarul

obiect principal, F_1' este focarul imagine principal (Fig. 5.2.1.). Mai există o infinitate de puncte focare secundare situate în cele două plane focale.

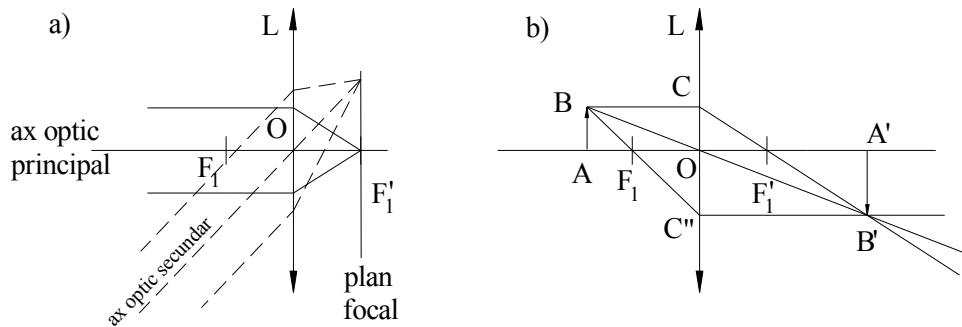


Fig. 5.2.1. Drumul principalelor raze printr-o lentilă convergentă

Inversul distanței focale se numește **convergența lentilei** și are ca unitate de măsură dioptria. **Dioptria** este convergența unei lentile care are distanța focală egală cu un metru. Pentru lentile convergente $C > 0$ (focare reale), Pentru lentile divergente $C < 0$ (focare virtuale).

Mărirea liniară a unei lentile arată de câte ori este mai mare dimensiunea imaginii față de dimensiunea obiectului, pentru obiecte situate perpendicular pe axul optic principal

$$\beta = \frac{y_2}{y_1} = \frac{x_2}{x_1} \quad (5.2.1.)$$

Reguli generale pentru determinarea poziției și a mărimii imaginii formate printr-o lentilă (urmăriți Fig. 5.2.1.b):

- o rază de lumină care traversează lentila prin centrul său, rămâne nedeviată după refracția prin lentilă
- o rază care trece prin focar, devine paralelă cu axul optic principal după refracția prin lentilă
- o rază care intră în lentilă paralelă cu axul optic principal, va ieși din aceasta prin focarul imagine principal
- un fascicul care intră în lentilă paralel cu axul optic principal, va forma la ieșire din aceasta, un punct luminos în focarul imagine principal al lentilei
- un fascicul care intră în lentilă paralel cu unul din axele secundare, va forma la ieșire din aceasta, un punct luminos în planul focal imagine (deasupra sau dedesubtul axului optic principal)

Relația fundamentală a lentilelor sferice subțiri se aplică pentru calculul distanței la care se formează imaginea, x_2 , dacă se cunoaște poziția obiectului, x_1 :

$$\frac{1}{x_2} - \frac{1}{x_1} = (n-1) \cdot \left(\frac{1}{R_1} - \frac{1}{R_2} \right) = \frac{1}{f} \quad (5.2.2)$$

unde R_1 și R_2 sunt razele de curbură ale celor două suprafețe, n este indicele de refracție al materialului din care este confecționată lentila considerată a se afla în aer, iar f este

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

distanța sa focală. Distanța x_1 este cea dintre obiect și lentilă, iar distanța x_2 este cea dintre lentilă și imaginea obiectului.

Se consideră un sistem de axe de coordonate xOy care au originea în centrul lentilei (sensul convențional matematic). Segmentele x_1 , x_2 , R_1 , R_2 , y_1 , y_2 , f_1 , f_2 , vor fi considerate cu semnul lor algebric

Pentru un **sistem de lentile alipite** convergența totală este egală cu suma convergențelor individuale.

Pentru un obiect situat la distanțe diferite de o lentilă convergentă, se observă că imaginea este reală (se află la intersecția razelor de lumină și poate fi captată pe un ecran) dacă obiectul este situat la o distanță mai mare decât distanța focală față de lentila convergentă. Dacă obiectul este situat între focar și centrul lentilei convergente, imaginea devine virtuală (aflată la intersecția prelungirilor razelor de lumină, nu poate fi captată pe un ecran) Lentilele divergente dau imagini virtuale ale obiectelor reale, indiferent de poziția acestora față de lentilă.

Dacă se consideră o suprafață sferică de rază R de separare între două medii cu indicii de refracție: n_1 și n_2 , atunci se definește **puterea refractivă** ca fiind:

$$P = \frac{n_2 - n_1}{R}$$

aceasta este pozitivă pentru suprafețele convergente și negativă pentru cele divergente.

Dacă lentila nu este subțire, ci de grosime, d , atunci puterea refractivă a sa se scrie în funcție de puterile refractive ale celor două interfețe:

$$P = P_1 + P_2 - P_1 \cdot P_2 \cdot \frac{d}{n}$$

unde n este indicele de refracție al materialului din care este confecționată lentila situată în aer.

În ochi sunt cel puțin patru suprafețe sferice de separație: 1) aer-cornee, 2) cornee și umoarea apoasă, 3) Suprafața anterioară cristalinului, 4) Suprafața posterioară a cristalinului

cea mai mare convergență provine de la interfața cornee-aer. Restul sunt mici corecții.

Aberații optice

Aberațiile care afectează aparatele optice se pot clasifica în:

1. **aberații de sfericitate**: razele care trec prin lentilă la diferite distanțe față de axul optic principal se întâlnesc în puncte diferite de-a lungul acestuia. În loc de un punct focal, se observă o pată focală. Aceasta se datorează faptului că porțiunile laterale ale lentilei refractă razele la un alt unghi de refracție decât porțiunea centrală (Fig. 5.2.2.a).

Aberația de sfericitate apare în cazul în care se folosesc fascicule largi de lumină.

Ea depinde de curbura suprafețelor lentilei și de indicele de refracție al materialului din care este confecționată.

Deoarece lentilele divergente prezintă aberația de sfericitate într-un sens, iar cele convergente în celălalt sens, acestea se combină pentru a obține corectarea aberației de sfericitate.

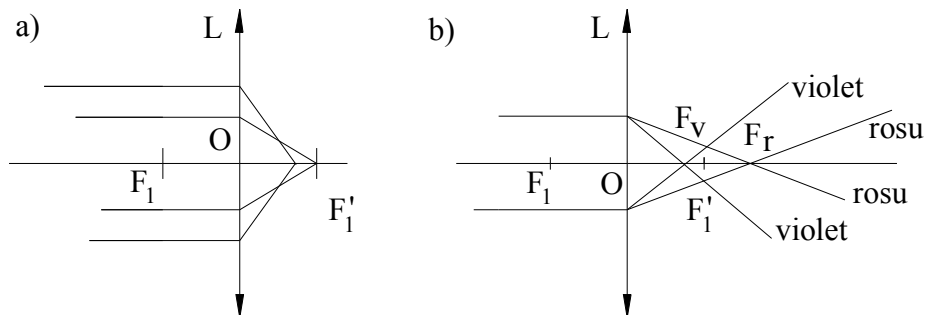


Fig. 5.2.2. Aberația de sfericitate (a) și aberația cromatică (b)

2. **aberații cromatice:** apar atunci când se lucrează cu o sursă de lumină albă (mai multe lungimi de undă) și se datorează fenomenului de dispersie. Undele luminoase având diferite lungimi de undă vor fi refractate la unghiuri diferite (deoarece materialul din care e confecționată lentila prezintă indici de refracție diferiți pentru diferite lungimi de undă) (Fig. 5.2.2.b).

Ca efect, razele corespunzătoare diferitelor lungimi de undă vor forma focare în poziții diferite pe axul optic, iar marginile obiectelor apar colorate.

3. **aberații datorate fenomenului de difracție:** apar atunci când obiectele sunt foarte mici, de dimensiuni comparabile cu lungimea de undă. Fenomenul de difracție se produce pe detaliile probei de analizat.

Efectul constă în apariția maximelor și minimelor de difracție care vor înconjura diferitele detalii, imaginea apărând neclară. Datorită acestui fenomen nu se pot observa optic obiecte mai mici decât o anumită limită, cunoscută sub denumirea de "limita de difracție".

Valoarea acesteia este dată de formula lui Abbe:

$$d = \frac{\lambda}{n \sin \alpha}$$

unde λ este lungimea de undă a luminii folosite, n este indicele de refracție al mediului aflat între probă și lentila frontală a obiectivului, α este jumătate din apertura unghiulară.

Ochiul uman liber nu poate observa ca elemente distincte două puncte sau două linii separate printr-o distanță mai mică de 0.1 mm

Elementele principale ale analizatorului vizual

Cu ajutorul analizatorului vizual se recepționează, se analizează și se traduc în impulsuri nervoase informațiile privind forma, dimensiunile, poziția, mișcarea și culoarea obiectelor.

Semnalul fizic ce poate fi recepționat de către analizatorul vizual este radiația electromagnetică cu lungimea de undă λ cuprinsă între 400 - 750 nm.

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

Absorbția radiațiilor electromagnetice de către ochi este selectivă.

Elementele componente:

ochi,
traiectele nervoase,
stații de prelucrare intermediare și
proiecția corticală.

În cele ce urmează va fi abordat numai segmentul periferic – ochiul.

Structura ochiului

Ochiul are o formă globulară cu diametrul de cca. 2,5 cm.

În ordine, antero-posterior, elementele ochiului sunt:

- **corneea** (transparentă, grosimea ei crește de la centru spre periferie unde atinge aproximativ 1 mm)
- **sclerotica** (țesut opac, fibros și elastic care acoperă globul ocular pe 5/6 din suprafața sa)
- **camera anterioară cu umoarea apoasă**
- **irisul** (diafragmă inelară pigmentată, din fibre de țesut conjunctiv și fibre netede); fața anterioară a irisului, colorată diferit la diferiți oameni se vede bine prin corneă
- **cristalinul** – lentilă biconvexă menținută de fibrele zonulei lui Zinn; cristalinul este înconjurat de un înveliș elastic numit cristaloidă care cuprinde un sistem de fibre transparente așezate în pături concentrice;
- **camera posterioară cu umoarea vitroasă**
- **retina** (cu foveea, pata galbenă (*macula lutea*) – zonă perifoveală pigmentată în galben și papila (*pata oarbă*) – stratul prin care nervul optic străbate tunicile globului ocular) constituită din prelungirea nervului optic, se întinde până la zonula lui Zinn; grosimea totală a retinei este de 0,4mm; dintre toate straturile care o formează, cel mai important este cel cu conuri și bastonașe, prelungire diferențiată a celulelor nervoase terminale ale nervului optic.
- **coroida** (țesut puternic pigmentat care absoarbe lumina parazită, împiedicând difuzia acesteia în interiorul ochiului); înspre partea anterioară coroida este îngroșată și formează corpul ciliar format în parte de mușchiul ciliar, constituit din două grupe de fibre netede, unele rectilinii în direcția meridianului ochiului, altele circulare la periferia corneei.

Mușchii ciliari (fibre radiale și circulare) și zonula lui Zinn (ligament inelar legat de sclerotică, alcătuit din fibre elastice) permit modificările convergenței cristalinului. Zonula menține cristalinul în poziția sa în stare de tensiune mecanică. Mușchii ciliari pot elibera, prin contracție, cristalinul de sub tensiunea zonulei.

Proprietăți ale vederii

Acuitatea vizuală

Dimensiunea imaginii unui obiect este dată de unghiul format de dreptele care trec prin centrul optic și extremitățile obiectului, unghi care definește diametrul aparent (măsurat în minute de arc).

Obiectele de dimensiuni diferite pot avea același diametru aparent, în funcție de distanța la care se află..

Numim **distanță separatoare minimă** diametrul aparent limită sub a cărui valoare, imaginile a două puncte se suprapun.

Acuitatea vizuală sau **puterea de rezoluție** este definită ca fiind *inversul distanței separatoare minime*.

Acuitatea vizuală depinde de:

- factori dioptrici: aberația de sfericitate și cromatică, difracția datorită imperfecțiunilor mediilor oculare, difuzia luminii datorită reflexiilor pe retină, erori de refracție
- factori retinieni: legați de structura granulară și discontinuă a retinei, centrul petei ce reprezintă imaginea trebuind să se găsească pe celule receptoare distincte;
- factori legați de stimul: forma și mărimea detaliului, contrastul de luminozitate, iluminarea fondului, timpul de expunere, compoziția cromatică (prin eliminarea aberațiilor cromatice, lumina monocromatică mărește acuitatea vizuală).

Diminuarea acuității vizuale se numește *ambliopie*.

Vederea clară se realizează între două puncte: *punctum proximum* – pp- și *punctum remotum* –pr-.

Pp – cel mai apropiat, văzut clar cu acomodare maximă.

Pr – cel mai depărtat, văzut clar fără acomodare.

Câmpul vizual

Câmpul vizual reprezintă ansamblul punctelor vizibile aflate pe o calotă sferică având ochiul în centru (considerăm capul nemișcat și privirea îndreptată într-o direcție fixă). Câmpul vizual al ochiului uman are în total **170 de grade pe orizontală și 150 de grade pe verticală**.

Adaptarea la lumină (reflexul pupilar)

Irisul reprezintă o diafragmă care limitează fluxul luminos ce cade pe retină și contribuie la micșorarea aberațiilor cromatice și de sfericitate produse de lentilele ochiului. Dimensiunea pupilei este controlată de doi mușchi netezi, un sfincter inelar și un dilatator radial, plasați în iris.

Când luminozitatea este slabă, fibrele radiale ale irisului se contractă (midriază), diametrul pupilei crește.

La iluminare excesivă, fibrele circulare ale irisului micșorează pupila (mioză).

Acomodarea la distanță Într-un ochi normal, imaginea unor obiecte foarte îndepărtate se formează pe retină.

Dacă obiectele sunt situate la o distanță mai mică de 6 m de ochi, imaginea lor s-ar forma în spatele retinei dacă cristalinul nu s-ar bomba mărimu-și convergența.

Aceasta se realizează astfel: cristalinul este înconjurat de un ligament circular, zonula lui Zinn, pe care se află înserați mușchii ciliari circulari și radiali. La contracția fibrelor circulare, zonula se relaxează și cristalinul iese de sub tensiune, bombându-se sub efectul propriei elasticități. Convergența sa va crește și imaginea se formează mai aproape de centrul optic (mai în față, deci pe retină). Invers, la contracția fibrelor radiale, zonula este din nou pusă sub tensiune, cristalinul se subțiază și își micșorează convergența.

Defectele geometrice ale vederii (ametropiile)

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

Ochiul normal se numește ochi **emetrop**, el poate vedea clar obiectele depărtate, fără acomodare. Ochiul emetrop, din punct de vedere fizic, are focarul posterior pe retină.

În cazul în care ochiul nu vede clar, fără acomodare, obiectele situate la infinit, el se numește **ametrop**.

Defectele geometrice ale vederii pot fi clasificate astfel, în funcție de cauza lor:

- defecte axiale (dimensiunile globului ocular)
- defecte de curbură (forma dioptrilor)
- defecte de indice (indicii de refracție ai mediilor transparente)
- defecte de elasticitate (proprietățile mecanice ale cristalinului)

Miopia

Acest defect de vedere se manifestă prin creșterea convergenței ochiului, ducând la micșorarea distanței focale.

Pentru un obiect situat la distanța x_1 , imaginea sa se va forma la o distanță mai mică pentru ochiul bolnav decât pentru cel sănătos $\frac{1}{x_2} - \frac{1}{x_1} = \frac{1}{f} \rightarrow$ imaginea se formează înaintea retinei

În funcție de cauza acestei creșteri există mai multe tipuri de miopii:

- Miopia *axială*, cel mai frecvent întâlnită, este caracterizată de axul anteroposterior mai lung decât cel al ochiului emetrop (anatomic se departează retina de cristalin), din această cauză **imaginea se formează înaintea retinei**. P_p și p_r se află mai aproape de ochi.
- Miopia de *curbură*: curbura cristalinului este mai mare, convergența va fi mărită (de obicei este legată de oboseală).
- Miopia de *indice* caracterizată de creșterea indicelui de refracție datorită creșterii concentrației saline în anumite stări patologice (vărsături incoercibile, diaree rebele, mari hemoragii și plasmoragii, expuneri excesive la soare, șocuri traumatice, lipotimie – în aceste din urmă două cazuri, deshidratarea și hiperconcentrarea salină consecutivă apar ca o consecință a fugii apei din țesuturi spre patul vascular lărgit ca urmare a epuizării mecanismelor neuro-hormonale de menținere a tonusului vascular).

În toate cazurile se corectează cu **lentile divergente** care au convergența negativă ($C < 0$, focare virtuale) care, adăugată convergenței crescute a ochiului, o aduc în limitele normale, imaginea se formează pe retina.

Hipermetropia

Se caracterizează prin **scăderea convergenței** totale a ochiului.

Imaginea se formează în spatele retinei, p_p cât și p_r se află mai departe de ochi decât în cazul ochiului emetrop.

Tipuri de hipermetropie:

- Hipermetropia *axială* caracterizată de modificări anatomice ale axului anteroposterior (acesta devine mai scurt decât cel al ochiului emetrop)

- Hipermetropia de *curbură* caracterizată prin cristalinul mai alungit. Cristalinul trebuie să se bombeze în permanență pentru a aduce imaginea pe retină.

În ambele cazuri corectarea vederii se face cu ajutorul **lentilelor convergente** care au o convergență pozitivă ($C > 0$, focare reale), prin urmare, însumând convergența lentilei cu convergența scăzută a ochiului hipermetrop se obține o convergență totală corectă egală cu cea a ochiului emetrop.

Se produc uneori și hipermetropii din cauza absenței cristalinului (congenital – foarte rar sau extirpat printr-o operație de cataractă), caz în care ochiul se numește *afac*.

Presbiopia sau **prezbitismul** este o ametropie de elasticitate care apare, în general, după vârsta de 40 de ani. Bombarea cristalinului se face mai dificil, deoarece elasticitatea acestuia se diminuează odată cu înaintarea în vârstă. Se folosesc **lentile convergente** pentru a vedea obiectele apropiate.

Biofizica receptiei vizuale Structura retinei

retina este o structură complexă cu o suprafață de cca 2 cm^2 și grosimea de $350 \text{ }\mu\text{m}$ compusă din 6 tipuri de celule, dispuse în straturi succesive:

- *celulele epitelului pigmentar* - un singur șir de celule epiteliale; pigmentul conținut de acestea – melanina – absoarbe lumina (pentru a evita difuzia).

- *celulele fotoreceptoare*, celulele cu conuri și bastonașe, care conțin pigmenții fotosensibili. Sunt orientate cu extremitatea fotosensibilă înspre coroidă, fiind parțial îngropate în epiteliul pigmentar. În *pata oarbă*, pe unde ies fibrele nervului optic, celulele fotoreceptoare lipsesc complet.

- *celulele orizontale* fac sinapsă cu celulele fotoreceptoare

- *celulele bipolare*, alcătuind primul strat al neuronilor vizuali (de aceea retina poate fi considerată o porțiune de creier periferic), realizează legături între celulele receptoare și cele ganglionare.

În **zona foveală** o celulă con realizează legături sinaptice cu o bipolară și fiecare bipolară cu o ganglionară. Spre **periferia foveei** și în afara acesteia, mai multe celule con o bipolară și mai multe bipolare o ganglionară.

- *celulele amacrine* realizează conexiuni între neuronii bipolari, Sunt lipsite de axon și trimit informații dinspre centru spre periferie.

- *celulele ganglionare* – fac sinapsă cu cele bipolare, iar axonii lor alcătuiesc nervul optic. Pata oarbă, lipsită de celule fotoreceptoare, este locul în care nervul optic se îndreaptă spre corpii geniculați laterali, după ce strabate învelișul globului ocular.

Când rodopsina este inactivată (adică în lipsa radiației) se găsește în forma izomeră 11 – *cis*.

Absorbția fotonului duce la izomerizarea rapidă a cromoforului, în forma 11 – *trans*, catena întinzându-se.

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

Izomerizarea spontană are o probabilitate de apariție de o dată la 1000 de ani.

Activarea rodopsinei are ca finalitate desprinderea retinalului de opsină. Transformările au loc în mai multe etape, trecând prin produși intermediari care au timpi de viață diferiți (dar de ordinul 10^{-9} s până la secunde).

Regenerarea rodopsinei cuprinde izomerizarea inversă a retinalului din forma *trans* în forma *11-cis* și alipirea retinalului de opsină.

Membrana bastonașului conține numeroase canale de Na^+ și Ca^{++} , astfel încât, la întuneric, există un influx pasiv de Na^+ și Ca^{++} (*curent de întuneric*) (10-15% Ca^{++}).

În întuneric membrana este polarizată negativ (-20 – -40 mV). Ioni de Na^+ intră în celulele fotoreceptoare prin canale, dar nu se acumulează deoarece sunt evacuați pe măsură ce intră. Calciul este evacuat printr-un mecanism antiport. Curentul de Na^+ (Ca^{++}) reprezintă **curentul de întuneric**.

În urma fotoexcitării și activării rodopsinei, se închid canalele de Na^+ (Ca^{++}), curentul de întuneric dispare și membrana **se hiperpolarizează**.

Potențialul celular poate ajunge la -80 mV, depinzând de intensitatea luminii.

Variația de potențial declanșează excitația neuronilor bipolari, astfel încât potențialele de acțiune apărute în aceștia ajung în final la sinapsa cu neuronul ganglionar, pe care-l excită.

De la neuronul ganglionar vor porni trenuri de potențiale de acțiune tot sau nimic care, pe calea nervului optic, ajung în corpii geniculați și apoi în scoarța cerebrală (scizura calcarină) unde produc senzația vizuală.

Bastonașele au o sensibilitate foarte mare: un singur foton poate duce la blocarea intrării în celulă a 10^6 sarcini pozitive – amplificare de putere.

5.3. Interacția undelor electromagnetice cu substanța

La interacția cu substanța, radiațiile electromagnetice cedează energie atomilor și moleculelor.

Efectele interacției pot fi:

- creșterea energiei de agitație termică a atomilor și moleculelor
- excitarea atomilor și moleculelor (electronii ce intră în alcătuirea acestora pot trece pe nivele de energie superioare, tranzițiile fiind cuantificate)
- ionizarea atomilor și moleculelor (extragerea electronilor din învelișurile electronice ale acestora).

La interacția cu substanța, radiațiile electromagnetice cedează energie atomilor și moleculelor. Efectele interacției pot fi:

- creșterea energiei de agitație termică a atomilor și moleculelor
- excitarea atomilor și moleculelor (electronii ce intră în alcătuirea acestora pot trece pe nivele de energie superioare, tranzițiile fiind cuantificate)

- ionizarea atomilor și moleculelor (extragerea electronilor din învelișurile electronice ale acestora).

În funcție de energie, efectul radiațiilor incidente asupra substanței cu care interacționează poate fi diferit și de aici decurge clasificarea lor în:

- Ionizante – cele care sunt capabile să producă ionizarea, datorită energiei mari
- Neionizante – radiații de energie mică, incapabile să producă ionizarea.

FOTOBIOLOGIA studiază interacțiunea radiațiilor electromagnetice neionizante cu sistemele biologice.

Energia de ionizare a principalilor atomi care intră în structura biomoleculelor este:

- 13,54 eV pentru hidrogen,
- 13,17 eV pentru oxigen,
- 11,24 eV pentru carbon (cea mai mică)
- 14,51 eV pentru azot.

lungimea de undă a radiației care are energia suficientă pentru a produce ionizarea carbonului:

$$E = hc/\lambda \rightarrow \lambda = hc/E = 6,62 \cdot 10^{-34} \cdot 3 \cdot 10^8 / 11,24 \cdot 1,6 \cdot 10^{-19} = 110 \text{ nm}$$

Radiațiile X și γ îndeplinesc condiția, deci numai acestea pot produce ionizări ale principalilor atomi din componența materiei vii.

Radiațiile X și γ se numesc **radiații ionizante**.

Radiațiile cu lungimea de undă mai mare de 100 nm începând cu UV (radiații ultraviolete) extrem (100-190 nm) și mergând spre undele radio lungi sunt **radiații neionizante**.

Ele sunt radiații cu care aproape toate sistemele vii conviețuiesc și sunt absorbite selectiv de către moleculele componente ale sistemelor vii.

1. Transferul energiei undelor electromagnetice către molecule, ducând la creșterea energiei acestora: $E = E_e + E_v + E_r$

E_e – energia electronilor

E_v – energia de vibrație

E_r – energia de rotație

Prin creșterea energiilor de rotație și vibrație are loc încălzirea substanței (creșterea agitației termice):

$$\Delta E = \Delta E_v + \Delta E_r$$

Radiațiile infraroșii (IR) pot mări numai energiile de vibrație și rotație ale moleculelor, pe când radiațiile ultraviolete pot mări toate tipurile de energie.

2. Transferul energiei undelor electromagnetice către electronii periferici ai atomilor și moleculelor - excitarea.

Conform principiului de incertitudine al lui Heisenberg, electronii nu pot rămâne mult timp în stare excitată ($10^{-8} - 10^{-6}$ s în starea de singlet – cu spinii orientați antiparalel – și $10^{-3} - 100$ s în starea de triplet – cu spinii orientați paralel). După aceste intervale de timp, electronii se dezexcită, iar dezexcitarea poate fi de două feluri:

a – dezexcitare radiativă **fotoluminescență**. Absorbția fotonului este urmată de emisia unui foton cu o lungime de undă mai mare sau egală cu cea a fotonului absorbit.

b – dezexcitare neradiativă.

Există două tipuri de fotoluminescență:

fluorescența (reemisii din starea singlet) Durata fluorescenței este foarte mică, practic emisia se face în același timp cu excitarea. Atunci când lungimea de undă în reemisie este egală cu cea a fotonului absorbit, fluorescența se numește de rezonanță.

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

fosforescența (reemisia din starea triplet). emisia continuă și după încetarea excitării.

3. Transferul energiei undelor electromagnetice către molecule, având drept rezultat creșterea reactivității chimice a acestora ori producerea unor reacții fotochimice. Dintre aceste reacții fotochimice se pot menționa:

izomerizări și

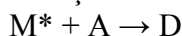
rearanjări interne ale moleculei,

polimerizări sau combinări între molecule,

fotosensibilizări.

Exemple

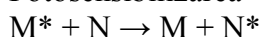
Reacția cu o altă moleculă, reacție care altfel nu s-ar fi produs (M^* - molecula fotoexcitată):



Reacția de dimerizare:



Fotosensibilizarea - energia absorbită de M este transferată speciei N care devine reactivă:



Radiațiile respective sunt absorbite de către grupări speciale ale unor molecule, grupări care se numesc cromofori.

Legile fotochimiei

1. Legea Grotthus-Draper: radiația trebuie să fie absorbită de o moleculă înainte ca reacția fotochimică să aibă loc; dacă substanța iradiată nu absoarbe radiații, nu se produce reacția fotochimică.

2. Legea Stark-Einstein: radiația absorbită nu duce în mod obligatoriu la o reacție fotochimică, dacă totuși se produce reacția, pentru fiecare moleculă transformată este necesar un singur foton. În legătură cu aceasta se definește randamentul cuantic η :

$$\eta = N_m/N_f$$

N_m – numărul de molecule (respectiv moli) care au reacționat

N_f – numărul de fotoni care au fost absorbiți

3. Legea Bunsen-Roscoe: cantitatea de substanță (Q) care intră într-o reacție fotochimică este proporțională cu fluxul de energie radiantă (Φ) și cu timpul de iradiere (t)

$$Q = k\Phi t$$

Rezultă că viteza unei reacții fotochimice este proporțională cu fluxul incident.

În sistemele biologice efectele la nivel molecular determină efectele la nivel celular sau la cel al organismului.

Efectele radiațiilor din domeniul vizibil

Fotosinteza

Constă în conversia energiei radiante în energie chimică folosită în sinteza unor molecule complexe.

Celulele plantelor verzi conțin organite celulare numite cloroplaste, în care se află pigmenți clorofilieni și carotenoizi.

Clorofilele sunt molecule complexe care conțin grupări cromofore în sisteme de duble legături conjugate.

Prin absorbția luminii de către grupările cromofore se produce excitarea electronilor pe nivele superioare de energie. Revenirea lor pe nivelul fundamental se face în trepte, de-a lungul lanțului transportor de electroni. În fiecare treaptă are loc o reacție de fosforilare a ADP cu formare de ATP. Astfel, energia luminoasă este transformată în energie chimică înmagazinată în ATP.

Fotosinteza se realizează prin două tipuri de reacții:

- reacții la lumină, direct dependente de energia luminoasă (fotoliza apei) **formare a NADPH** (nicotinamid-adenin dinucleotid-difosfat) și a **ATP**

- reacții la întuneric, în absența luminii are **loc reducerea CO₂** cu formarea de **polimeri hexozici (glucoza, manoză, galactoză, fructoză)**

Fotorecepția cu ajutorul pigmentilor rodopsinici

Rodopsinele vizuale, rodopsina și iodopsinele, fac parte din clasa proteinelor retinale, al căror cromofor este aldehida vitaminei A numită retinal.

Efectele radiațiilor ultraviolete (UV)

Radiațiile UV au lungimi de undă mici decât cele din domeniul vizibil (violet) și din punct de vedere al efectelor biologice sunt clasificate astfel:

UV-A, cu lungimea de undă cuprinsă între 315-400 nm

UV-B, cu lungimea de undă cuprinsă între 280 - 315 nm

UV-C, cu lungimea de undă mai mică de 280 nm.

Cea mai mică energie o au radiațiile UV-A și cea mai mare UV-C.

Energia radiațiilor UV se află în domeniul 3-7 eV, deci este mai mică decât energia de ionizare a principalilor atomi constituenți ai biomoleculelor.

Radiațiile UV pot produce ruperi de legături chimice și reacții fotochimice.

Dintre efectele radiațiilor UV se pot menționa următoarele:

- **Dimerizarea** unor perechi de baze azotate (ex. dimerizarea timinei - una din cele patru baze azotate care formează ADN) cu sudura lanțurilor de ADN în locul respectiv. Această sudură împiedică copierea informației de pe ADN pe ARN.

Una din consecințele dimerizării este **acțiunea bactericidă a UV îndepărtat** (lungimi de undă mai mici decât 300 nm), prin împiedicarea transcripției este oprită diviziunea celulară.

- Efecte asupra ADN: formare de dimeri, hidratarea bazelor pirimidinice, ruperea legăturilor de H, ruperea lanțului de ADN, formarea unor legături cu proteinele (ADN-protein cross-links).

- Producere de eritem (arsuri tegumentare) – UV-B (290-320 nm). Locul de acțiune se presupune a fi fosfolipidele din membranele organelor celulare care conțin hidrolaze, în special lipozomii din celulele epidermice.

Tot în această zonă se observă și efectul cancerigen al radiațiilor UV, 91% din cancerele pielii, în special melanoamele, se află în zone cu expunere solară mare. Cele mai periculoase sunt radiațiile cu 300 nm.

Pigmentarea pielii (UV-A, 320-420 nm) se datorează creșterii concentrației de melanină din piele, secretată de melanocite. Melanocitele derivă, din punct de vedere embriologic, din sistemul nervos și au prelungiri dendritice prin care injectează melanina în celelalte celule

BIOFIZICĂ ȘI BIOINGINERIE - Note de curs

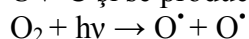
ale epidermei. Melanina provine din oxidarea tirozinei (aminoacid aromatic din diferite protide). Spectrul de acțiune se consideră a fi 300 – 420 nm, acestui domeniu corespunzându-i însă numai oxidarea unui leucoderivat al melaninei, care dă o pigmentare lejeră și precocă.

Spectrul de formare al melaninei coincide cu spectrul de acțiune al eritemului. Pigmentarea datorată melaninei este mult mai intensă și mai tardivă reprezentând o protecție eficientă împotriva eritemului. După 10-12 zile de expunere la soare 90% din radiațiile UV sunt absorbite.

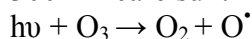
- Transformarea ergosterolului în vitamina D₂ (antirahitică). Spectrul de acțiune are un maximum la 280 nm. Iradierea în UV este folosită pentru prevenirea rahitismului

- Inflamația corneei numită keratită putându-se ajunge la cecitate tranzitorie sau chiar definitivă. Oftalmia este dată de UV reflectate de zăpadă.

Protecția cea mai importantă față de acțiunea nocivă a UV de energii mari este realizată prin stratul de ozon (O₃) din partea superioară a atmosferei. Oxigenul absoarbe radiațiile UV-C și se produc reacțiile:



$\text{O}^\bullet + \text{O}_2 \rightarrow \text{O}_3$ Ozonul rezultat absoarbe radiațiile UV-B cu lungimi de undă mai mici de 300 nm care sunt foarte dăunătoare pentru organismele vii, conform reacției



Fotoproducții rezultate reintră în reacțiile anterioare. În acest fel radiațiile UV duc la formare de ozon în straturile superioare ale atmosferei.

Cea mai bună protecție se realizează prin evitarea expunerii la UV sau ecrane din preparate opace pe bază de oxid de zinc sau de titan care asigură o protecție totală.