



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΟΠΤΙΚΗ ΚΑΙ ΟΡΑΣΗ»

μεταπτυχιακή εργασία:

«ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ
ΤΗΣ ΕΝΥΔΑΤΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΡΚΕΙΑ
ΔΙΑΘΛΑΣΤΙΚΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ»

ΜΑΡΙΑ ΜΑΚΡΙΔΑΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Δρ. ΧΑΡΙΛΑΟΣ ΓΚΙΝΗΣ

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΤΟΣ 2005-2006





ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
«ΟΠΤΙΚΗ ΚΑΙ ΟΡΑΣΗ»

**«ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΚΤΙΜΗΣΗ
ΤΗΣ ΕΝΥΔΑΤΩΣΗΣ ΤΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΡΚΕΙΑ
ΔΙΑΘΛΑΣΤΙΚΗΣ ΧΕΙΡΟΥΡΓΙΚΗΣ»**

ΜΑΡΙΑ ΜΑΚΡΙΔΑΚΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Δρ. ΧΑΡΙΛΑΟΣ ΓΚΙΝΗΣ

Η παρούσα εργασία υπεβλήθη ως μέρος των υποχρεώσεων για την απονομή του μεταπτυχιακού διπλώματος ειδίκευσης του Διατμηματικού Μεταπτυχιακού Προγράμματος Σπουδών «Οπτική και Όραση» και παρουσιάστηκε στην Τριμελή Επιτροπή αποτελούμενη από τους:

- 1.ΧΑΡΙΛΑΟ ΓΚΙΝΗ
- 2.ΔΗΜΗΤΡΙΟ ΑΓΓΛΟ
- 3.ΔΗΜΗΤΡΙΟ ΠΑΠΑΖΟΓΛΟΥ

ΑΚΑΔΗΜΑΪΚΟ ΕΤΟΣ 2005-2006





Τα πειράματα στα πλαίσια της εργασίας αυτής πραγματοποιήθηκαν στο ΒΕΜΜΟ και στο Εργαστήριο Λείζερ του ΙΗΔΛ-ΙΤΕ (Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ, Ιδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας)

Ευχαριστίες

Πρώτα και πριν από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Δρ. Μαρία Φαρσάρη που όντας καθηγήτρια μου στα πλαίσια των μεταπτυχιακών μου σπουδών, με ενέπνευσε να ασχοληθώ με τον τομέα των laser και με την παρότρυνση και την βοήθεια της, ανέλαβα την εκπόνηση της παρούσας εργασίας στο εργαστήριο Ηλεκτρονικής Δομής και Laser του ΙΤΕ. Επίσης ευχαριστώ τον κ. Κ.Φωτάκη για την ευκαιρία που μου έδωσε για να συμμετάσχω στα εργαστήρια του ΙΗΔΛ .

Ακόμη ευχαριστώ τον κ. Δ. Άγγλο που με δέχτηκε στο εργαστήριο του και με τις συμβουλές και την καθοδήγησή του με βοήθησε στην κατανόηση και ανάλυση των δεδομένων μου, ενώ μου ενέπνευσε την κριτική σκέψη σε ότι αφορά την αντιμετώπιση των πειραμάτων. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω, την Αναστασία Γιακουμάκη που με βοήθησε να εγκλιματιστώ στο χώρο του εργαστηρίου και ποτέ δεν δυσανασχέτησε όταν ζητούσα τη βοήθεια της, ενώ πάντα ήταν πρόθυμη να με βοηθήσει σε οποιοδήποτε πρόβλημα και αν αντιμετώπιζα. Επίσης, ευχαριστώ για τις πολύτιμες συμβουλές του τον Austin Nevin, ο οποίος με βοήθησε στην ανάλυση των φασμάτων.

Από το εργαστήριο του ΒΕΜΜΟ, θα ήθελα να ευχαριστήσω των κ. Χ.Γκίνη ο οποίος ως καθηγητής μου, μου ενέπνευσε το ενδιαφέρον να ασχοληθώ με τον τομέα της διαθλαστικής χειρουργικής, ενώ ως επιβλέπωντας μου μέσα από τις συζητήσεις μας μου έδωσε ιδέες για την πραγματοποίηση της εργασίας μου. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές μου στα πλαίσια των μεταπτυχιακών σπουδών μου, για τις πολύτιμες γνώσεις που μου παρείχαν. Θα ήταν παράλειψη μου να μην ευχαριστήσω την Ηρώ Πεντάρη που με τα δεδομένα που μου έδωσε σε ότι αφορά την ενυδάτωση του κερατοειδή με βοήθησε να φέρω εις πέρας το πιο ενδιαφέρον τμήμα της μελέτης μου.

Για το τέλος έχω αφήσει τους φίλους μου που πραγματικά δεν ξέρω με ποια λόγια να τους ευχαριστήσω. Για το λόγο αυτό αφιερώνω την εργασία μου στους ανθρώπους που με βοήθησαν και με στήριξαν ψυχολογικά, κατά την δύσκολη χρονική περίοδο εκπόνησης της παρούσας μελέτης. Χωρίς την βοήθεια τους δεν θα τα είχα καταφέρει. Τζίνα, Ελεάνη, Αριστέα, Βασίλη, Βαγγέλη, Φώτη, Μαρία και κυρίως Παναγιώτη σας ευχαριστώ...

Abstract

Within the last 20 years, there has been a great development concerning the area of the refractive surgery with the use of excimer lasers, due to its great predictability and the high percentage of the successful outcome. The refractive surgery is one of the most successful and safe operations performed nowadays, due to the predictability of the procedure.

Due to the fact that, the refractive surgery with excimer laser is a relatively new technique, there are still some aspects which need to be improved and many factors which influence the outcome of the procedure that need to be thoroughly investigated. One of the factors, with a major influence at the outcome of the refractive surgery, is the corneal hydration degree during the procedure. Important variations of the cornea's hydration from the mean value, result in overcorrecting or undercorrecting the refractive error. Until now, no successful and safe way to estimate the corneal hydration during the procedure has been found.

In this thesis, was investigated the possibility of using the emission spectrum produced during the laser- cornea interaction to estimate the corneal hydration. The experiments were held with the use of two excimer lasers: KrF and ArF (emission wavelengths 248nm and 193nm respectively, pulse duration 10 nsec). At the first part of the experiments, the KrF laser was used in order to investigate and understand the mechanisms that take place during the laser-cornea interactions. For the purpose of the experiments, samples from pork and rabbit corneas and also a material which simulates the cornea known as PALM, were used.

Many aspects concerning the laser-cornea interaction were investigated as part of this research. Some of them are:

- 1) The possible relation between the spectroscopic features to the corneal hydration degree.
- 2) The fluorescence spectrum of the cornea emitted due to its irradiation with excimer laser, in order to identify the elements in the cornea, which emit fluorescence.
- 3) Spectra from different layers of the cornea were recorded and compared in order to investigate any similarities or differences.
- 4) It was investigated whether the emission spectrum of the cornea was power-dependant
- 5) It was investigated the effect of spot position on the cornea to the shape and the intensity of the spectra.

During the present study, important information about the mechanisms that take place during the laser-cornea interactions, were obtained. The most important outcome of this research was the observation that the emission spectrum depends upon the hydration degree of the

cornea. Based on the outcome of this study, it is believed that more studies should be done on this area in order to investigate in a more complete way the advantages of recording on line, the emission spectrum from the cornea due to its irradiation. This method seems to have all the aspects in order to lead to the design of a complete system with appropriate software which will be capable to provide knowledge of the hydration degree of the operated cornea during the refractive surgery procedure.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα τελευταία 20 χρόνια , ο τομέας της διαθλαστικής χειρουργικής με excimer laser έχει γνωρίσει πολύ σημαντική πρόοδο και έχει κατακτήσει την εμπιστοσύνη του ευρύτερου κοινού, λόγω των εξαιρετικών της αποτελεσμάτων και της μεγάλης της προβλεψιμότητας. Πιο συγκεκριμένα, η μεγάλη προβλεψιμότητα της έκβασης, στις επεμβάσεις διαθλαστικής χειρουργικής, αποτελεί και το βασικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου, το οποίο έχει συμβάλει σε μεγάλο βαθμό στην επικράτηση και διάδοση της διαθλαστικής χειρουργικής, ως μία από τις ασφαλέστερες και αποτελεσματικότερες επεμβάσεις που πραγματοποιούνται στις μέρες μας.

Όμως, λόγω του γεγονότος ότι η διαθλαστική χειρουργική αποτελεί μια σχετικά νέα επέμβαση, υπάρχουν ακόμα πολλά περιθώρια βελτίωσης και πολλές παράμετροι που πρέπει να μελετηθούν επιπλέον σε βάθος για ακόμα καλύτερα και ασφαλέστερα αποτελέσματα. Μία από τις παραμέτρους που συμβάλλουν σε αρκετά μεγάλο βαθμό στην επιτυχή έκβαση μιας διαθλαστικής επέμβασης, είναι ο βαθμός ενυδάτωσης του κερατοειδή κατά την διάρκεια της επέμβασης. Σημαντικές διαφοροποιήσεις του βαθμού ενυδάτωσης του κερατοειδή από την μέση τιμή ενυδάτωσης, έχουν ως αποτέλεσμα την υποδιόρθωση ή υπερδιόρθωση του διαθλαστικού σφάλματος, γεγονός που είναι θεμιτό να αποφεύγεται κατά την πραγματοποίηση διαθλαστικής επέμβασης. Μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί κάποια ασφαλής και αποτελεσματική μέθοδος ελέγχου του βαθμού ενυδάτωσης του κερατοειδή.

Για το σκοπό αυτό στην παρούσα διπλωματική εργασία, μελετήθηκε η ωφελιμότητα της καταγραφής του φάσματος εκπομπής που προκύπτει κατά την αλληλεπίδραση του excimer laser με τον κερατοειδικό ιστό. Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν με την χρήση δύο excimer laser στα 248nm (KrF) και στα 193nm (ArF) κατά την διάρκεια των οποίων πραγματοποιήθηκε συσχέτιση των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών με το βαθμό ενυδάτωσης του κερατοειδούς. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν ως δείγματα κερατοειδείς από οφθαλμούς κουνελιών και χοιρινών καθώς και ένα υλικό που προσομοιώνει σε αρκετά μεγάλο βαθμό την σύσταση του κερατοειδικού ιστού, γνωστού ως PALM.

Κατά την διάρκεια των πειραμάτων μελετήθηκαν ένα πλήθος διαφορετικών παραμέτρων, όπως:

- 1) Η διαφοροποίηση του φάσματος εκπομπής σε σχέση με τον βαθμό ενυδάτωσης του κερατοειδή.
- 2) Το φάσμα εκπομπής φθορισμού για την αναγνώριση δομικών συστατικών του κερατοειδή.
- 3) Μελετήθηκαν και συγκρίθηκαν φάσματα εκπομπής που καταγράφηκαν από διαφορετικές δομικές περιοχές του κερατοειδή.
- 4) Η εξάρτηση του φάσματος εκπομπής από την ενέργεια με την οποία ακτινοβολείται ο κερατοειδικός ιστός.
- 5) Η ομοιότητα των φασμάτων εκπομπής που καταγράφονταν από διαφορετικά σημεία στον ίδιο κερατοειδή .

Κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης εξήχθησαν σημαντικά αποτελέσματα για τις διαδικασίες που λαμβάνουν μέρος κατά την αλληλεπίδραση excimer laser κερατοειδή. Το σημαντικότερο όμως αποτέλεσμα της παρούσας μελέτης είναι η διαπίστωση ότι το φάσμα εκπομπής από τον κερατοειδή κατά την ακτινοβολήση του με excimer laser εξαρτάται από τον βαθμό ενυδάτωσης του. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη, πιστεύεται ότι είναι σκόπιμη, η περαιτέρω διερεύνηση των φασμάτων που προκύπτουν κατά την αλληλεπίδραση laser- κερατοειδή, για να γίνει εφικτή η on -line καταγραφή των φασμάτων εκπομπής που προκύπτουν κατά την διάρκεια της επέμβασης, ώστε ο χειρουργός οφθαλμίατρος να είναι συνεχώς ενήμερος για την πορεία της επέμβασης, με απώτερο αποτέλεσμα την ακόμη μεγαλύτερη προβλεψιμότητα και επιτυχία των επεμβάσεων διαθλαστικής χειρουργικής.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ABSTRACT.....	5
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	7
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	9
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο	15
Ο ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΟΦΘΑΛΜΟΣ	15
1.1) Ανατομία του οφθαλμού	15
1.2) Λειτουργία του οφθαλμού.....	16
1.3.1) Εμμετρικός οφθαλμός.....	17
1.3.2) Μυωπία.....	17
1.3.3) Υπερμετροπία.....	18
1.3.4) Αστιγματισμός.....	19
1.4) Κερατοειδής.....	20
1.4.1) Ιστολογική δομή κερατοειδούς.....	21
1) Επιθήλιο.....	21
2) Μembrάνη του Bowman.....	21
3) Το στρώμα του κερατοειδή.....	21
4) Δεσκαμέτιος μεμβράνη (Descemet's membrane).....	22
5) Ενδοθήλιο.....	22
1.4.2) Διαφάνεια του κερατοειδούς.....	23
Α) Ανατομικοί παράγοντες.....	23
Β) Κατάσταση διαρκούς σχετικής αφυδάτωσης του κερατοειδή.....	23
1.5) Laser.....	25
1.5.1) Βασικές αρχές λειτουργίας laser.....	25
1.5.2) Χαρακτηριστικά δέσμης laser.....	27
1.5.3) Τύποι laser.....	28
1.6) Ακτινοβολία υλικού.....	30
1.6.1) Αλληλεπίδραση laser – βιολογικού ιστού.....	31
1.6.2) Εφαρμογές των laser στην ιατρική.....	33
1.6.3) Εφαρμογές των laser στην οφθαλμολογία.....	35
1.7) EXCIMER LASER.....	38
1.7.1) Excimer laser στην οφθαλμολογία- μηχανισμός φωτοαποδόμησης.....	41
1.7.2) Ρυθμός Φωτοαποδόμησης.....	44
1.7.3) Ενυδάτωση του κερατοειδή.....	47
1.7.4) Παράλληλες δράσεις κατά την φωτοαποδόμηση.....	47
1.8) Διαθλαστική χειρουργική.....	50
1.8.1) Ιστορική αναδρομή διαθλαστικής χειρουργικής.....	50
1.8.2) Διαθλαστικές επεμβάσεις.....	51
I) PRK (Photorefractive Keratectomy).....	54
II) LASIK (Laser In Situ Keratomileusis).....	54
III) LASEK (Laser Epithelial Keratomileusis).....	55

IV) ΡΤΚ (Φωτοθεραπευτική Κερατεκτομή)	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	57
ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΦΘΟΡΙΣΜΟΥ	57
2.1) Γενικά περί φασματοσκοπίας	57
2.2) Φωταύγεια	58
2.2.1) Φθορισμός.....	58
2.2.2) Φωσφορισμός.....	59
2.3) Μοριακός Φθορισμός	60
2.3.1) Απορρόφηση, Διέγερση και Εκπομπή	61
2.3.2) Αρχή Franck – Condon	64
2.3.3) Μετατόπιση Stokes.....	65
2.3.4) Νόμος Beer- Lambert.....	66
2.3.5) Κβαντική απόδοση φθορισμού.....	67
2.3.6) Φάσμα φθορισμού.....	68
2.3.7) Σήματα φθορισμού.....	68
2.3.8) Φθορισμός background.....	69
2.4) Laser-induced fluorescence (LIF).....	69
2.5) LIBS (Laser Induced Breakdown Spectroscopy).....	69
2.6) Βιβλιογραφική Ανασκόπηση	73
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο	80
Σχεδίαση πειράματος	80
3.1) Οργανολογία.....	80
Συλλογή και ανάλυση εκπεμπόμενου σήματος.....	80
3.2) Μεθοδολογία	83
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο	85
Πειραματικό μέρος.....	85
4.1) Μετρήσεις με excimer laser KrF στα 248nm.....	85
4.1.1) Πειραματική διάταξη	85
Αξιολόγηση συστήματος συλλογής ακτινοβολίας εκπομπής.....	87
Φάσμα εκπομπής φθορισμού	88
Εξέλιξη φάσματος εκπομπής συναρτήσει παλμών του laser	89
Ένταση φθορισμού.....	93
4.2) Μετρήσεις με excimer laser ArF στα 193nm.....	95
4.2.1) πειραματική διάταξη.....	95

Φάσμα εκπομπής quartz.....	96
Σύγκριση φασμάτων εκπομπής (KrF ,248 n, ArF, 193 nm).....	98
Εξάρτηση φάσματος εκπομπής από την πυκνότητα ενέργειας της ακτινοβολίας laser.	99
Μελέτη φάσματος εκπομπής.....	101
Ένταση κατεγγραφομένων φασμάτων.....	102
Μελέτη φάσματος εκπομπής από κερατοειδείς κουνελιών.....	103
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο	106
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΑΠΟΔΟΜΗΣΗΣ ΕΝΥΔΑΤΩΜΕΝΟΥ ΚΕΡΑΤΟΕΙΔΟΥΣ	106
Μεθοδολογία.....	106
Αποτελέσματα.....	109
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6^ο	123
6.1) Συμπεράσματα	123
6.2) Μελλοντική έρευνα	125
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	127

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία 20 χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί εκατομμύρια επεμβάσεις διαθλαστικής χειρουργικής με εξαιρετικά αποτελέσματα. Ιδιαίτερα μετά από την εφαρμογή των συστημάτων laser στον ιατρικό κλάδο και ιδίως σε ότι αφορά τον οφθαλμολογικό τομέα έχει πραγματοποιηθεί μια πραγματική επανάσταση. Εκατομμύρια άνθρωποι έχουν απαλλαγθεί από τα βοηθήματα οράσεως με αποτέλεσμα να έχουν κάνει ευκολότερη την καθημερινότητά τους, ενώ με την βοήθεια των επεμβάσεων με την χρήση συστημάτων laser έχουν αντιμετωπιστεί ακόμη και οφθαλμολογικά προβλήματα τα οποία δεν μπορούσαν να αντιμετωπιστούν επιτυχώς με τις συνήθεις οφθαλμολογικές επεμβάσεις.

Όμως λόγω του γεγονότος ότι ο τομέας της διαθλαστικής χειρουργικής είναι σχετικά νέος εξακολουθούν να υπάρχουν κάποιοι παράμετροι οι οποίοι δεν έχουν μελετηθεί επαρκώς με αποτέλεσμα την ύπαρξη μη επιθυμητών αποτελεσμάτων σε κάποιες περιπτώσεις. Μία από τις παραμέτρους που συμβάλλει σε μεγάλο βαθμό στην επιτυχή ή μη έκβαση της επέμβασης διαθλαστικής χειρουργικής, είναι ο βαθμός ενυδάτωσης του στρώματος του κερατοειδή πάνω στο οποίο πραγματοποιείται η φωτοεκτομή κατά τη διάρκεια της επέμβασης.

Η γνώση της ενυδάτωσης του κερατοειδούς κατά την διάρκεια της επέμβασης κρίνεται αναγκαία, γιατί μη φυσιολογική ενυδάτωση μπορεί να οδηγήσει σε υποδιόρθωση ή υπερδιόρθωση του διαθλαστικού σφάλματος (Dougherty, 1994, Kim, 2001, Oshika, 1998).

Βασιζόμενοι στην παρατήρηση της ύπαρξης φθορισμού κατά την διάρκεια της αλληλεπίδρασης του excimer laser ArF (193 nm) με τον κερατοειδικό ιστό (Ediger, 1991, Muller-Stolzenburg, 1990, Tuft, 1990, Uma, 1994, Phillips, 1997) , κρίθηκε σκόπιμη η χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών για την καταγραφή των φασμάτων φθορισμού και εκπομπής που προκύπτουν κατά την αλληλεπίδραση του laser με τον κερατοειδή για διαφορετικούς βαθμούς ενυδάτωσης του ιστού, καθώς και σύγκριση των φασμάτων εκπομπής που προκύπτουν από το επιθήλιο και το στρώμα του κερατοειδή. Ακόμη καταγράφηκαν για διάφορες συνθήκες, τα φάσματα εκπομπής που προκύπτουν κατά την αλληλεπίδραση του laser με τον κερατοειδικό ιστό κάτω από συνθήκες που επικρατούν κατά την πραγματοποίηση των επεμβάσεων και προφανώς εμφανίζουν και το μεγαλύτερο κλινικό ενδιαφέρον.

Απώτερος σκοπός της έρευνας αυτής ήταν η καταγραφή ενός ικανού αριθμού φασμάτων που αντιστοιχούν σε παραμέτρους οι οποίες διαφοροποιούντουσαν κάθε φορά, όπως ήταν η ενυδάτωση, η πυκνότητα ενέργειας, το δομικό στρώμα του κερατοειδή από το οποίο λαμβανόταν το φάσμα κλπ. Με την λήψη αυτών των φασμάτων ελέγχθηκε κατά πόσο η φασματοσκοπία μπορεί να αποτελέσει μία χρήσιμη μέθοδο πάνω στην οποία μπορεί να βασιστεί η ανάπτυξη ενός οργάνου καταγραφής του φάσματος εκπομπής κατά την διάρκεια της επέμβασης. Το όργανο αυτό θα είναι σε θέση να παρέχει αυτόματα στον χειρουργό οφθαλμίατρο το βαθμό ενυδάτωσης του ιστού καθώς και άλλες πληροφορίες οι οποίες κρίνονται χρήσιμες , δίνοντας του έτσι την

δυνατότητα να προχωρήσει στην όσο το δυνατό καλύτερη αντιμετώπιση της εκάστοτε περίπτωσης διαθλαστικής επέμβασης.

Επίσης, η φασματοσκοπία φθορισμού μπορεί να έχει και μία σειρά άλλων εφαρμογών σε διαφορετικές περιπτώσεις όσων αφορά τον οφθαλμό. Μία εφαρμογή του excimer laser στην οφθαλμολογία, πέρα από την διαθλαστική χειρουργική, είναι η χρήση του για την θεραπεία διάφορων διαταραχών στην επιφάνεια του κερατοειδή. Αυτή η τεχνική είναι γνωστή ως φωτοθεραπευτική κερατεκτομή (PTK, phototherapeutic keratectomy). Στην τεχνική αυτή, χρησιμοποιείται η ικανότητα ακριβούς αφαίρεσης του επιφανειακού κερατοειδικού ιστού, που εμφανίζει το excimer laser, με σκοπό την αντιμετώπιση μίας πλειάδας διαταραχών που προσβάλλουν τον κερατοειδή, όπως κερατοειδικοί εκφυλισμοί και δυστροφίες, ανωμαλίες του κερατοειδή και επιφανειακές ουλές. Κατά την διάρκεια μιας επέμβασης PTK η αφαίρεση του μη υγιούς ιστού έγκειται στην διακριτική ικανότητα του χειρουργού. Επειδή όμως το φάσμα φθορισμού του υγιούς ιστού υποστηρίζεται ότι διαφέρει σημαντικά από αυτό του μη υγιούς (Van Schaik, 1999, Chuck, 2002), ενδεχομένως η on line καταγραφή του φάσματος φθορισμού του κερατοειδικού ιστού κατά την διάρκεια μια επέμβασης PTK μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο για τον χειρουργό για την πληροφόρηση του για το αν έχει καθαριστεί πλήρως η επιθυμητή περιοχή στην επιφάνεια του κερατοειδή. Επίσης η φασματοσκοπία φθορισμού μπορεί να αποτελέσει και μια διαγνωστική μέθοδο για την διάγνωση επιφανειακών ανωμαλιών στον κερατοειδή.

Ακόμη, λόγω του διαφορετικού φάσματος φθορισμού που δίνει όπως αναφέρθηκε ο υγιής κερατοειδής σε σχέση με έναν παθογενή μπορεί να αναγνωριστούν και ουλές ή άλλες ανωμαλίες που μπορεί να υπάρχουν μέσα στο στρώμα του κερατοειδή.

Σε γενικές γραμμές, πιστεύεται και εν μέρει με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επιβεβαιώνεται, ότι η καταγραφή του φάσματος εκπομπής που προκύπτει κατά την ακτινοβόληση του κερατοειδή με το excimer laser, θα ήταν ωφέλιμη λόγω των χρήσιμων πληροφοριών που παρέχει για την ενυδάτωση του κερατοειδή καθώς και για τη γενικότερη ιστολογική κατάσταση του κερατοειδή.

Μελέτες καταγραφής του φάσματος φθορισμού ή γενικότερα των φασμάτων εκπομπής που προκύπτουν κατά την ακτινοβόληση του κερατοειδή με ακτινοβολία laser έχουν πραγματοποιηθεί και στο παρελθόν, λόγω του μεγάλου ενδιαφέροντος που εμφανίζει η καταγραφή και μελέτη των φασμάτων εκπομπής. Το καινοτόμο στην παρούσα μελέτη είναι ότι σε αντίθεση με τις έρευνες που πραγματοποιήθηκαν στο παρελθόν (Chuck, 2004, Cohen, 2001, Tuft, 1990) έγιναν προσπάθειες τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν να διεξαχθούν κάτω από συνθήκες που προσομοιώνουν στον μεγαλύτερο δυνατό βαθμό τις πραγματικές κλινικές συνθήκες, σε ότι αφορά την επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας, τον ρυθμό επανάληψης του laser, την θέση τοποθέτησης των δειγμάτων, ώστε τα αποτελέσματα που εξήχθησαν να είναι όσο το δυνατό πιο ρεαλιστικά.

Στην συνέχεια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, γίνεται εκτενής αναφορά στην ιστολογική σύσταση του κερατοειδή, στους μηχανισμούς που λαμβάνουν χώρα κατά την αλληλεπίδραση ιστού

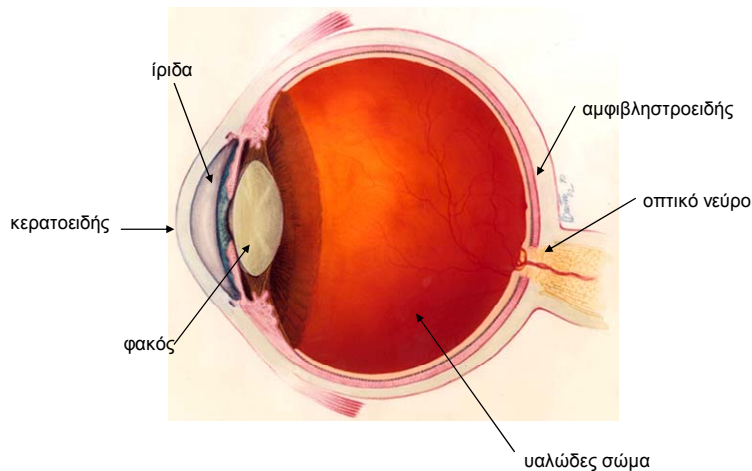
με laser, γίνεται αναλυτική αναφορά στις φασματοσκοπικές μεθόδους και τους φυσικούς νόμους που τις διέπουν. Παράλληλα, πραγματοποιείται εκτενής βιβλιογραφική ανασκόπηση του πεδίου που αφορά στην αλληλεπίδραση του κερατοειδικού ιστού με excimer laser, την σημασία της ενυδάτωσης κατά την αλληλεπίδραση αυτή και την χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών που έγινε στο παρελθόν στον τομέα αυτό. Επίσης γίνεται αναλυτική περιγραφή των πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν και εκτενής μελέτη και επεξεργασία των φασμάτων που καταγράφηκαν για διάφορες συνθήκες. Στο τέλος της εργασίας παρατίθενται αναλυτικά τα αποτελέσματα που διεξήχθησαν στα πλαίσια της παρούσας ερευνητικής μεταπτυχιακής εργασίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

Ο ΑΝΘΡΩΠΙΝΟΣ ΟΦΘΑΛΜΟΣ

1.1) Ανατομία του οφθαλμού

Ο ανθρώπινος οφθαλμός έχει σχεδόν σφαιρικό σχήμα, με τυπικό αξονικό μήκος περίπου 24mm. Η εξωτερική επιφάνεια του αποτελείται από τον κερατοειδή, ο οποίος καλύπτει περίπου το 1/6 της επιφάνειας του οφθαλμού ενώ τα υπόλοιπα 5/6 του οφθαλμού αποτελούνται από τον σκληρό χιτώνα. Το σημείο στο οποίο ενώνεται ο κερατοειδής με τον σκληρό ονομάζεται σκληροκερατοειδικό όριο (limbus). Η πρόσθια επιφάνεια του κερατοειδούς έχει σχήμα επιμήκους ελλειψοειδούς ενώ η οπίσθια επιφάνεια έχει κατά προσέγγιση σφαιρικό σχήμα, με αποτέλεσμα ο κερατοειδής να είναι παχύτερος στην περιφέρεια (650-670 μm), από ότι στο κέντρο του (500-570 μm). Πίσω από τον κερατοειδή βρίσκεται ο πρόσθιος θάλαμος με αξονικό μήκος περίπου 3 mm, στον οποίο βρίσκεται η ίριδα και ο κρυσταλλοειδής φακός .



Εικόνα 1:Ανατομία του οφθαλμού

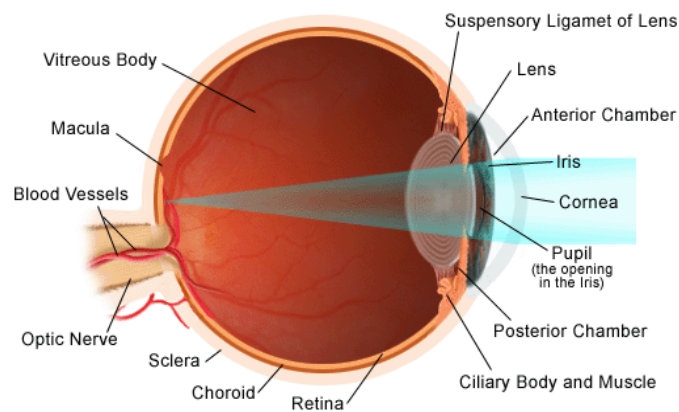
Η ίριδα είναι μία μυϊκή δομή η οποία λειτουργεί σαν διάφραγμα και ρυθμίζει το ποσό του φωτός που εισέρχεται στον οφθαλμό, ενώ πίσω ακριβώς από τον ίριδα βρίσκεται ο κρυσταλλοειδής φακός, ο οποίος μέσω της διαδικασίας της προσαρμογής ρυθμίζει την ευκρίνεια παρατήρησης τόσο των μακρινών όσο και των κοντινών αντικειμένων. Ο κρυσταλλοειδής φακός συγκρατείται από τις ίνες της ζίνειου ζώνης. Η οπή στο κέντρο της ίριδας ονομάζεται κόρη. Στον πρόσθιο θάλαμο βρίσκεται και το υδατοειδές υγρό το οποίο παρέχει θρεπτικά στοιχεία στον φακό, την ίριδα και τον κερατοειδή.

Πίσω από τον κρυσταλλοειδή φακό βρίσκεται το υαλώδες σώμα. Το υαλώδες σώμα έχει ζελατινώδη μορφή και ουσιαστικά γεμίζει το εσωτερικό τμήμα του οφθαλμού δίνοντας του το

σφαιρικό του σχήμα. Στο πίσω μέρος του οφθαλμού βρίσκεται ο αμφιβληστροειδής, στον οποίο βρίσκονται οι φωτοϋποδοχείς. Πάνω στον αμφιβληστροειδή εστιάζονται οι εισερχόμενες στον οφθαλμό ακτίνες, για τον σχηματισμό των παρατηρούμενων εικόνων.

1.2) Λειτουργία του οφθαλμού.

Πέρα από την ανατομική του οργάνωση, ο οφθαλμός αποτελεί ουσιαστικά ένα οπτικό σύστημα που αποτελείται από 4 κυρίως διαθλαστικές επιφάνειες : τον κερατοειδή (πρόσθια και οπίσθια επιφάνεια) με διοπτρική ισχύ περίπου 42 διοπτριών και τον φακό (πρόσθια και οπίσθια επιφάνεια) με διοπτρική ισχύ περίπου 18 διοπτριών που σκοπό τους έχουν να εστιάζουν τις εισερχόμενες ακτίνες στο πίσω μέρος του οφθαλμού, στον αμφιβληστροειδή χιτώνα.

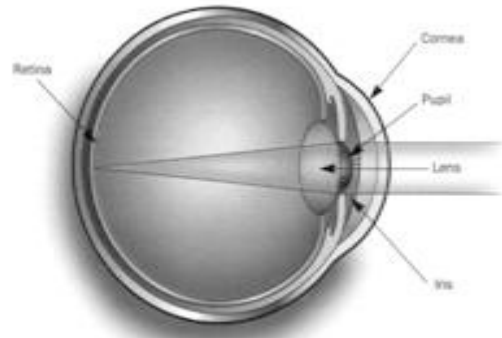


Εικόνα 2:Εστίαση των εισερχόμενων ακτινών στον αμφιβληστροειδή

Ένα φυσιολογικό μάτι έχει μήκος περίπου 24 mm και συνολική διοπτρική ισχύ περίπου 60 διοπτρίες. Κατά την διαδικασία της όρασης οι ακτίνες που αντανακλώνται από το παρατηρούμενο αντικείμενο εισέρχονται στον οφθαλμό δια μέσω του κερατοειδούς. Στη συνέχεια διέρχονται μέσω του φακού ο οποίος προσαρμόζεται κατάλληλα με τη βοήθεια του ακτινωτού σώματος, ώστε να έχει την κατάλληλη διοπτρική ισχύ για να εστιάσει τις εισερχόμενες ακτίνες στον αμφιβληστροειδή χιτώνα, όπου βρίσκονται οι φωτοϋποδοχείς. Στην συνέχεια οι φωτοϋποδοχείς μετατρέπουν τα φωτόνια σε ηλεκτρικό σήμα και το διαβιβάζουν στον εγκέφαλο για ανώτερη επεξεργασία μέσω του οπτικού νεύρου.

1.3.1) Εμμετροπικός οφθαλμός

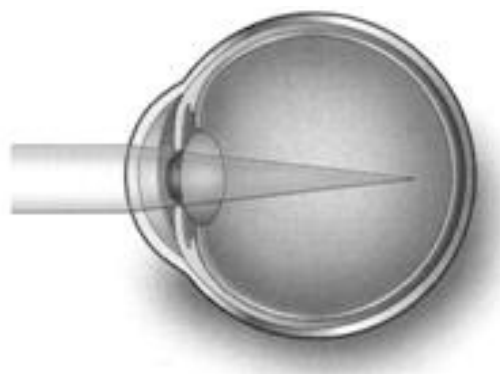
Κατά την ιδανική κατάσταση λειτουργίας του, ο οφθαλμός εστιάζει τις εισερχόμενες ακτίνες πάνω στον αμφιβληστροειδή χιτώνα, με αποτέλεσμα την ευκρινή όραση.



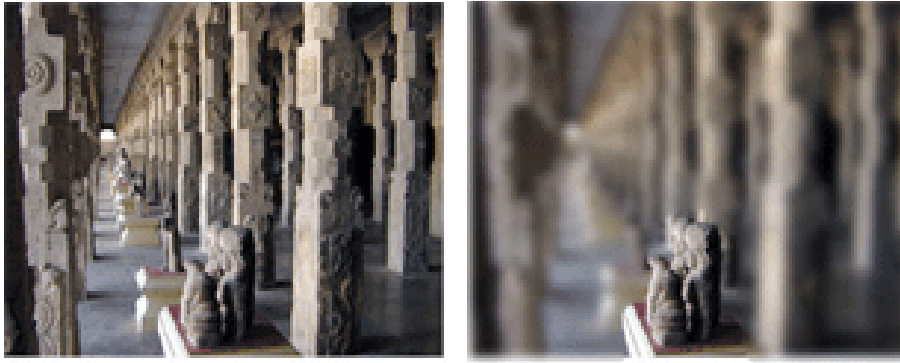
Εικόνα 3: εμμετροπικός οφθαλμός

1.3.2) Μυωπία

Υπάρχουν δύο διαφορετικές καταστάσεις οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν μυωπία. Στην πρώτη περίπτωση, το μάτι είναι μεγαλύτερο από το φυσιολογικό, οπότε εμφανίζεται η περίπτωση της αξονικής μυωπίας, ενώ στην δεύτερη περίπτωση ο κερατοειδής είναι πιο κυρτός από το φυσιολογικό οπότε εμφανίζεται κερατοειδική μυωπία. Και στις δύο περιπτώσεις το αποτέλεσμα είναι το ίδιο: οι εισερχόμενες ακτίνες εστιάζονται μπροστά από τον αμφιβληστροειδή με αποτέλεσμα την θολή όραση.



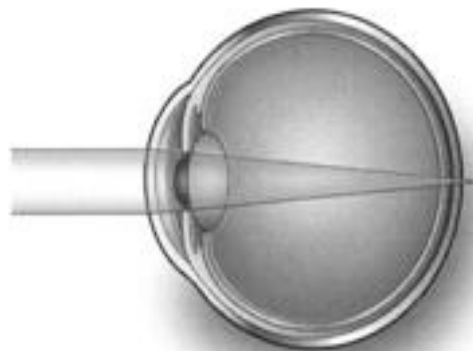
Εικόνα 4:μυωπικός οφθαλμός



Εικόνα 5: Ίδια εικόνα όπως την αντιλαμβάνεται εμμετροπικός οφθαλμός (αριστερά) και όπως την αντιλαμβάνεται μυωπικός οφθαλμός (δεξιά).

1.3.3) Υπερμετρωπία

Όμοια με την περίπτωση της μυωπίας, υπάρχουν δύο πιθανές καταστάσεις οι οποίες προκαλούν υπερμετρωπία. Είτε το μάτι είναι μικρότερο από το φυσιολογικό, είτε ο κερατοειδής είναι λιγότερο κυρτός από το φυσιολογικό με αποτέλεσμα οι εισερχόμενες ακτίνες να εστιάζονται πίσω από τον αμφιβληστροειδή με τελικό αποτέλεσμα και πάλι την θολή όραση.



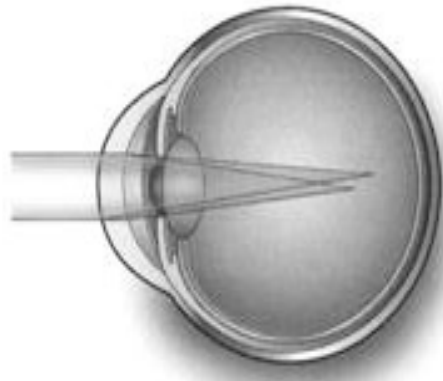
Εικόνα 6: Υπερμετρωπικός οφθαλμός



Εικόνα 7: Ίδια εικόνα όπως την αντιλαμβάνεται εμμετροπικός οφθαλμός (αριστερά) και όπως την αντιλαμβάνεται υπερμετρωπικός οφθαλμός (δεξιά).

1.3.4) Αστιγματισμός

Ένα ακόμη διαθλαστικό σφάλμα που εμφανίζεται αρκετά συχνά είναι ο αστιγματισμός. Κατά την περίπτωση του αστιγματισμού ο κερατοειδής δεν είναι σφαιρικά ομοιόμορφος, με αποτέλεσμα να μην εστιάζει τις εισερχόμενες ακτίνες σε ένα μόνο σημείο. Αντίθετα εστιάζει τις ακτίνες σε ένα εύρος διαφορετικών σημείων σχηματίζοντας θολές εικόνες των παρατηρούμενων αντικειμένων. Ο αστιγματισμός μπορεί να παρατηρηθεί και σε μάτια που έχουν είτε μυωπία είτε υπερμετρωπία.



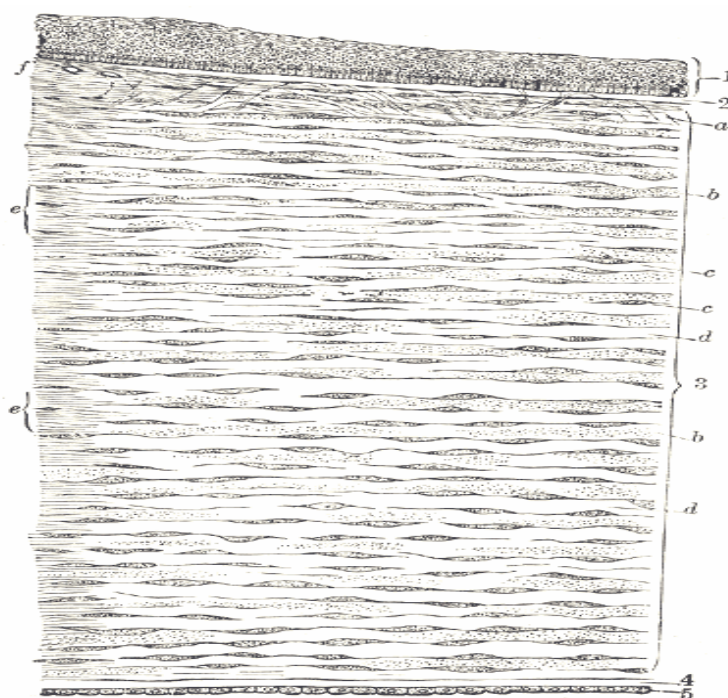
Εικόνα 8: Αστιγματικός οφθαλμός



Εικόνα 9: Ίδια εικόνα που αντιλαμβάνεται εμμετροπικός οφθαλμός (αριστερά) και όπως την αντιλαμβάνεται αστιγματικός οφθαλμός (δεξιά).

1.4) Κερατοειδής

Η πρώτη και κυριότερη διαθλαστική επιφάνεια που συναντούν οι εισερχόμενες στο μάτι ακτίνες είναι ο κερατοειδής, ο οποίος ουσιαστικά αποτελεί και το αντικείμενο της παρούσας μελέτης. Ο κερατοειδής αποτελείται από 5 στοιβάδες, οι οποίες από την εξώτερη προς την ενδότερη είναι οι παρακάτω: το επιθήλιο, η στοιβάδα του Bowman, το στρώμα του κερατοειδούς, η δεσκεμέτιος μεμβράνη και το ενδοθήλιο.



Εικόνα 10: Τομή κερατοειδούς: 1) επιθήλιο, 2) μεμβράνη του Bowman , 3) Στρώμα, 4) Δεσκεμέτιος μεμβράνη, 5) ενδοθήλιο

Η διαθλαστική ισχύ του κερατοειδικού χιτώνα κυμαίνεται από 40-45 περίπου διοπτρίες και η διαφάνεια του επιτρέπει την δίοδο εντός του οφθαλμού των ακτίνων που προέρχονται από τα διάφορα αντικείμενα του περιβάλλοντος χώρου, για να ερεθίσουν τον αμφιβληστροειδή. Ο κερατοειδής είναι ένας ανάγγειος ιστός, ο οποίος αποτελεί το πρόσθιο 1/6 τμήμα του βολβού του οφθαλμού. Στην φυσιολογική του κατάσταση είναι διαφανής και αποτελείται από πέντε στοιβάδες. Παρουσιάζει δύο επιφάνειες, την πρόσθια, η οποία είναι υπόκυρτη και την οπίσθια – υπόκοιλη με καμπυλότητες μεγαλύτερες αυτών του υπόλοιπου βολβού. Η ακτίνα καμπυλότητας της πρόσθιας επιφάνειας του κερατοειδούς είναι κατά μέσο όρο 7.8mm ενώ της οπίσθιας 6.5mm. Το πάχος του κερατοειδή *in vivo* είναι κατά μέσο όρο 0.54mm στο κέντρο, ενώ στην περιφέρεια αυξάνεται και φτάνει μέχρι 0.65-1.00mm περίπου. Κατά μέσο όρο έχει διάμετρο 11mm. Η οριζόντια διάμετρος είναι μεγαλύτερη της καθέτου, ενώ η διάμετρος του κερατοειδούς και γενικότερα οι διαστάσεις τους πλησιάζουν τις φυσιολογικές τιμές αυτών του ενήλικα σχεδόν από τον 6^ο μήνα, η ανάπτυξη του όμως περατώνεται μετά από το 6^ο έτος.

1.4.1) Ιστολογική δομή κερατοειδούς

1) Επιθήλιο

Το επιθήλιο του κερατοειδή είναι πολύστιβο αποτελούμενο από 5-6 στρώματα κυττάρων στο κέντρο του κερατοειδή, ενώ στην περιφέρεια γίνεται παχύτερο και φτάνει τις 10 στρώματα, αντίστοιχα προς το σκληροκερατοειδικό όριο, όπου μεταπίπτει το επιθήλιο του επιπεφυκότα. Το επιθήλιο αποτελεί το 10% περίπου του συνολικού πάχους του κερατοειδή και έχει πάχος 50 μm στο κέντρο και 80 μm στην περιφέρεια. Αποτελείται από 3 είδη κυττάρων: τα βασικά επιθηλιακά κύτταρα, τα πτερυγοειδή πολυγωνικά και τα επιφανειακά.

2) Μembrάνη του Bowman.

Η μεμβράνη αυτή είναι μία ξεχωριστή στιβάδα του κερατοειδή, αλλά ουσιαστικά είναι συνέχεια του στρώματος στο οποίο μεταπίπτει χωρίς να είναι δυνατόν να την αποχωρίσουμε από αυτό. Είναι ακυτταρική, πάχους 8-12 μm και αποτελείται από κολλαγόνο και θεμελιώδης ουσία. Η πρόσθια επιφάνεια της μεμβράνης του Bowman είναι λεία και ομαλή, σε αντίθεση με την οπίσθια, η οποία είναι ασαφής και συγχέεται με το δίκτυο των κολλαγόνων ινιδίων του πρόσθιου στρώματος. Η μεμβράνη του Bowman συμμετέχει ενεργά στη στερεότητα και στην αντοχή του κερατοειδή. Εάν καταστραφεί η τυπική αρχιτεκτονική της δεν αποκαθίσταται και δημιουργούνται ουλές και ανωμαλίες στο σχήμα του κερατοειδούς που έχουν σαν αποτέλεσμα ανώμαλο αστιγματισμό.

3) Το στρώμα του κερατοειδή

Στον άνθρωπο αποτελεί το 90% του πάχους του κερατοειδή. Σχηματίζεται από ελάσματα κολλαγόνων ινιδίων, κύτταρα και ιδίως ουσία. Τα ελάσματα από το κολλαγόνο, 200-250 συνολικά στον αριθμό, επικάθονται το ένα επί του άλλου και διατάσσονται παράλληλα τόσο μεταξύ τους όσο και προς την επιφάνεια του κερατοειδή. Κάθε έλασμα αποτελείται από κολλαγόνα ινίδια, που περιβάλλονται από θεμέλια ουσία. Τα κολλαγόνα ινίδια είναι παράλληλα μεταξύ τους και αρμονικά διατεταγμένα. Η διάταξη αυτή αποτελεί την κύρια αιτία της διαφάνειας του κερατοειδούς. Τα κύτταρα του στρώματος διακρίνονται σε μόνιμα (κερατοκύτταρα) και σε μεταναστευτικά (λεμφοκύτταρα). Η θεμέλια ουσία, η οποία συμπληρώνει τον χώρο μεταξύ των ινιδίων του κολλαγόνου, αποτελείται από πρωτεογλυκάνες (γλυκοπρωτεΐνες) και γλυκοζαμινογλυκάνες.

4) Δεσκεμέτειος μεμβράνη (Descemet's mebrane)

Αποτελεί τη βασική μεμβράνη του ενδοθηλίου από το οποίο και προέρχεται. Κατά τη γέννηση έχει πάχος 4 μm ενώ στον ενήλικα φτάνει στα 10 μm. Η δεσκεμέτειος είναι ομοιογενής μεμβράνη, η οποία εύκολα μπορεί να αποχωριστεί από το στρώμα και το ενδοθήλιο. Αποτελείται από πολύ λεπτά ινίδια κολλαγόνου με ομοιόμορφη κατανομή, διαφορετικά όμως από αυτά του στρώματος.

5) Ενδοθήλιο

Αποτελείται από ένα στοίχο επίπεδων κυττάρων, εξαγωνικού σχήματος, ο συνολικός αριθμός των οποίων κυμαίνεται περίπου στις 400.000.

Το ενδοθήλιο του κερατοειδούς, ιστολογικά είναι ένα τυπικό πλακώδες επιθήλιο. Η άμεση όμως γειτονία του με το υδατοειδές υγρό καθώς και η ύπαρξη στα κύτταρα του, οργανιδίων χαρακτηριστικών για κύτταρα που παίρνουν μέρος σε ενεργητική μεταφορά και πρωτεϊνική σύνθεση, το καθιστούν ως εξαιρετικής λειτουργικής σπουδαιότητας ιστό για τον μεταβολισμό του κερατοειδούς καθώς και για την διατήρηση της διαφάνειας του.

Η πυκνότητα των ενδοθηλιακών κυττάρων σε νέους ενήλικες ανέρχεται σε 3000-4000 κύτταρα/mm². Η πυκνότητα αυτή με την πάροδο της ηλικίας ελαττώνεται λόγω θανάτου και μη αντικατάστασης τους, επειδή το ενδοθήλιο δεν εμφανίζει μιτωτική δραστηριότητα. Τα εναπομένοντα ενδοθηλιακά κύτταρα καλύπτουν τις θέσεις των απολεσθέντων γειτονικών κυττάρων αποπλατυνόμενα και μετακινούμενα, ώστε να καλύψουν τα κενά, διαδικασία που είναι βραδεία. Εν τούτοις υπάρχει μια κριτική πυκνότητα (400-700 κύτταρα/ mm²) κάτω από την οποία το ενδοθήλιο αδυνατεί να επιτελέσει τη φυσιολογική του λειτουργία.

Το ύψος (πάχος) των ενδοθηλιακών κυττάρων είναι 4-6 μm. Η ένωση των ενδοθηλιακών κυττάρων μεταξύ τους γίνονται με τα δεσμοσώματα, τις χασμοσυνδέσεις (gap jimitia) και τις σφιχτές συνδέσεις (tight junctions).

Παρά την ύπαρξη των πιο πάνω συνδέσεων μεταξύ των κυττάρων, παραμένει αρνητικό μεσοκυττάριο διάστημα που δεν αποτελεί απόλυτο φραγμό, επιτρέποντας έτσι την δίοδο μικρών μορίων από τον πρόσθιο θάλαμο προς το στρώμα.

Τα εν λόγω κύτταρα παίζουν σημαντικό ρόλο στην φυσιολογική υδάτωση και θρέψη του κερατοειδούς δρώντας αφενός σαν φραγμός, εμποδίζοντας την υπερβολική είσοδο του υδατοειδούς υγρού στο στρώμα και αφετέρου σαν αντλία ύδατος με τη βοήθεια ενεργού μηχανισμού μεταφοράς ιόντων.

1.4.2) Διαφάνεια του κερατοειδούς

Για να εκπληρώσει ο κερατοειδής το φυσιολογικό ρόλο για τον οποίο έχει κατασκευαστεί πρέπει να παραμένει πάντα διαφανής στην ορατή ακτινοβολία. Η διαφάνεια του κερατοειδή οφείλεται στους παρακάτω παράγοντες:

A) Ανατομικοί παράγοντες

Ο κυριότερος ανατομικός παράγοντας που συμβάλλει στην διαφάνεια του κερατοειδή είναι η ομοιόμορφη και κανονική διάταξη των ελασμάτων του στρώματος αλλά και των κολλαγόνων ινιδίων που τα αποτελούν καθώς και η ύπαρξη μικρού αριθμού κυττάρων στο στρώμα. Λόγω της ομοιόμορφης και παράλληλης διάταξης των δομικών στοιχείων του κερατοειδούς αποφεύγονται φαινόμενα σκέδασης και καθιστούν τον κερατοειδή διαφανή στην ορατή ακτινοβολία. Επίσης η ύπαρξη στερεών συνδέσεων μεταξύ των επιθηλιακών κυττάρων του κερατοειδούς δεν επιτρέπει την είσοδο υγρού από την πρόσθια επιφάνεια του κερατοειδή .

Τέλος η κανονική διάταξη και ακεραιότητα του ενδοθηλίου του κερατοειδή εμποδίζουν την υπερβολική διέλευση υδατοειδούς υγρού εντός του στρώματος.

B) Κατάσταση διαρκούς σχετικής αφυδάτωσης του κερατοειδή

Ο κύριος παράγοντας που συμβάλλει στην σχετική αφυδάτωση του στρώματος του κερατοειδή είναι η λειτουργία των ενδοθηλιακών κυττάρων.

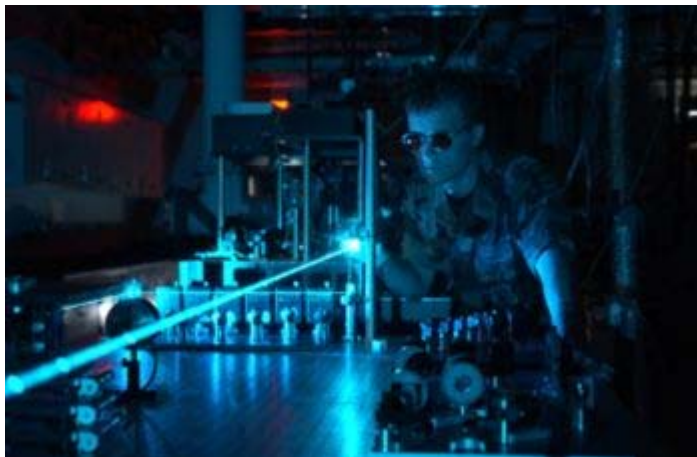
Φυσιολογικά ο κερατοειδής είναι ενυδατωμένος κατά 82%. Υγρό από τον πρόσθιο θάλαμο εισέρχεται στο στρώμα μέσω του ατελούς φραγμού του ενδοθηλίου του κερατοειδούς. Η δύναμη η οποία προκαλεί την μετακίνηση του υγρού ονομάζεται πίεση διαπότισης και είναι η συνισταμένη της ενδοφθάλμιας πίεσης και της οσμωτικής πίεσης του στρώματος του κερατοειδή.

Στο σημείο αυτό παρεμβαίνει η λειτουργία της «αντλίας» του ενδοθηλίου που προκαλεί μετακίνηση υγρού από το στρώμα προς τον πρόσθιο θάλαμο, με τελική δυναμική κατάσταση ισορροπίας την σχετική αφυδάτωση του κερατοειδή.

Ο πιο πάνω μηχανισμός «αντλίας» του ενδοθηλίου απαιτεί ενέργεια. Την ενέργεια αυτή παρέχουν τα μιτοχόνδρια του κυτταροπλάσματος των ενδοθηλιακών κυττάρων υπό μορφή ATP που προέρχεται από τον μεταβολισμό της γλυκόζης. Ο μηχανισμός αυτός συνίσταται στην ενεργητική μεταφορά ιόντων από το στρώμα προς το υδατοειδές υγρό με τη βοήθεια ένζυμων που βρίσκονται στις πλάγιες μεμβράνες των ενδοθηλιακών κυττάρων. Τα ιόντα αυτά είναι κυρίως το Na^+ που βρίσκεται σε μεγάλη πυκνότητα στο στρώμα και το HCO_3^- που παράγεται μέσα στα ενδοθηλιακά κύτταρα με την δράση ενός άλλου ένζυμου της καρβονικής ανυδράσης . Η αυξημένη λοιπών συγκέντρωση ιόντων Na^+ και HCO_3^- στο υδατοειδές υγρό λόγω της δράσης των ATPαίων , προκαλεί παθητική μεταφορά ύδατος προς τον πρόσθιο θάλαμο.

Διάφορες καταστάσεις, που ελαττώνουν την λειτουργία του ενδοθηλίου ως φραγμού και ως αντλία μεταφοράς ιόντων, έχουν σαν συνέπεια την υπερυδάτωση και δημιουργία οιδήματος του κερατοειδούς, αύξηση του πάχους του και μείωση της διαφάνειας του. Τέτοιες καταστάσεις είναι μηχανικές ή χημικές κακώσεις του ενδοθηλίου, νοσήματα του κερατοειδούς, τοξική δράση στο ενδοθήλιο ουσιών ή φαρμάκων που έχουν σαν συνέπεια τη μείωση του αριθμού των ενδοθηλιακών κυττάρων και/ή την έκπτωση της λειτουργικότητάς τους.

1.5) Laser



1.5.1) Βασικές αρχές λειτουργίας laser

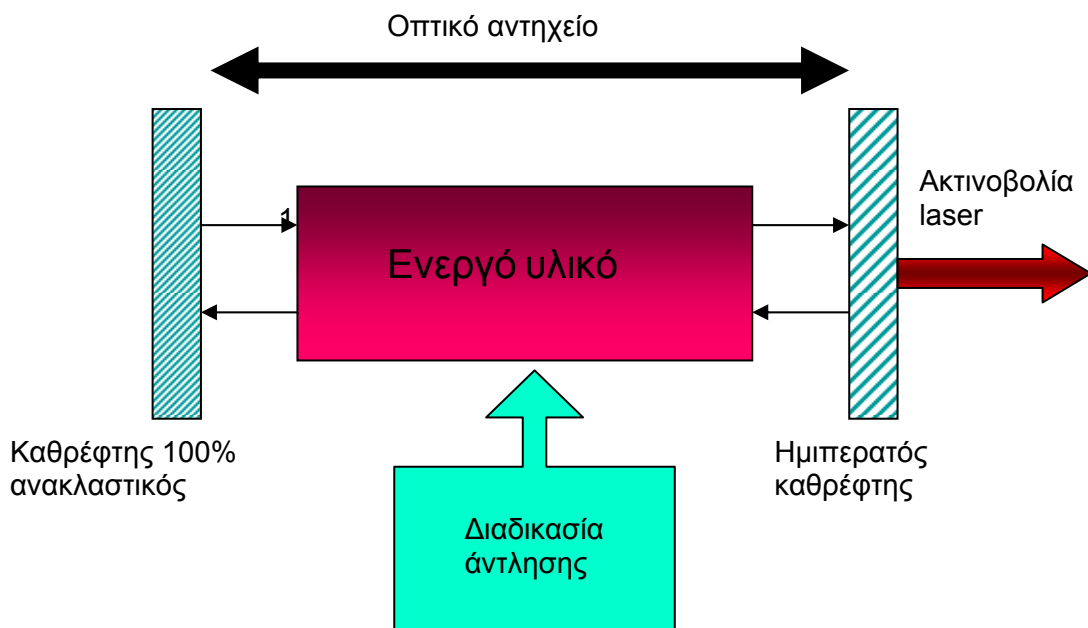
Από το 1960 και έπειτα που κατασκευάστηκαν τα πρώτα συστήματα laser, αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα εργαλεία στην επιστήμη και στην τεχνολογία. Οι εφαρμογές των laser εκτείνονται από απλές εφαρμογές στην καθημερινή ζωή μέχρι σε σημαντικές εφαρμογές στην βιομηχανία, τις επικοινωνίες και την ιατρική με αποτέλεσμα σε κάποιους τομείς τα laser να έχουν επιφέρει μια πραγματική επανάσταση. Η ονομασία λείζερ προέρχεται από τον αγγλικό όρο LASER που αποτελεί ακρωνύμιο των λέξεων Light amplification by Stimulated Emission of Radiation που σε ελεύθερη απόδοση σημαίνει ενισχυμένο φως μέσω εξαναγκασμένης εκπομπής ακτινοβολίας, για να υποδηλώσει τον τρόπο δημιουργίας της ακτινοβολίας laser. Με τον όρο laser περιγράφεται τόσο η συσκευή η οποία παράγει το φως, όσο και την ίδια την ακτινοβολία.

Το laser αποτελεί μία διάταξη η οποία μετατρέπει ενέργεια διαφόρων μορφών (ηλεκτρομαγνητική, χημική, ηλεκτρική κλπ.) σε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, η οποία παρουσιάζει κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά, τα οποία είναι και αυτά που δίνουν την ιδιαίτερη σπουδαιότητα στα συστήματα laser. Η ακτινοβολία που παράγεται από ένα τέτοιο σύστημα εκτείνεται σε όλο το μήκος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από τις ακτίνες X μέχρι το μακρινό υπέρυθρο.

Ένα σύστημα laser αποτελείται από 3 κυρίως μέρη:

- 1) **Το ενεργό υλικό** , το οποίο μπορεί να βρίσκεται σε οποιαδήποτε κατάσταση της ύλης (στερεό, υγρό, αέριο ή πλάσμα) και το οποίο είναι αυτό που κατά κύριο λόγο καθορίζει σε συνδυασμό με την οπτική κοιλότητα, το μήκος κύματος στο οποίο θα εκπέμψει το laser. Το ενεργό υλικό είναι αυτό που παρέχει τις ενεργειακές του στάθμες για μεταπτώσεις ηλεκτρονίων που οδηγούν σε δράση laser.

- 2) **Την οπτική κοιλότητα**, η οποία αποτελεί μία διάταξη από δύο ευθυγραμμισμένα μεταξύ τους κάτοπτρα, μεταξύ των οποίων βρίσκεται το ενεργό υλικό, με αποτέλεσμα η ακτινοβολία να ανακλάται από το ένα κάτοπτρο στο άλλο διασχίζοντας το ενεργό υλικό. Στις περισσότερες περιπτώσεις το ένα από τα δύο κάτοπτρα είναι 100% ανακλαστικό, ενώ το άλλο μερικώς ανακλαστικό από 10-99% ανάλογα με τον τύπο του laser. Το μέρος της ακτινοβολίας που διαφεύγει από το ημιπερατό κάτοπτρο αποτελεί και την ακτινοβολία laser.
- 3) **Τον μηχανισμό διέγερσης του ενεργού υλικού** (ή άντληση του ενεργού υλικού). Ο μηχανισμός διέγερσης αποτελεί την πηγή ενέργειας του συστήματος ώστε να επιτευχθεί η αναστροφή των πληθυσμών που αποτελεί ικανή και αναγκαία συνθήκη για να έχουμε δράση laser. Κάποιοι από τους τρόπους άντλησης είναι η οπτική άντληση, ηλεκτρική διέγερση του αερίου, η διέγερση μέσω κρούσεων, η χημική διέγερση είτε η διέγερση με ηλεκτρικό ρεύμα.



Εικόνα 11: Σχηματική αναπαράσταση συστήματος laser

Η αρχή λειτουργίας των laser βασίζεται στον εξής μηχανισμό: το ενεργό υλικό μεταβιβάζει ενέργεια στην δέσμη laser, ενισχύοντας την μέσω της κβαντομηχανικής διαδικασίας της εξαναγκασμένης εκπομπής, η οποία προτάθηκε από τον Albert Einstein κατά την ενασχόληση του με το φωτοηλεκτρικό φαινόμενο. Το ενεργό μέσο αντλείται από μία εξωτερική πηγή ενέργειας, όπως μία λυχνία έκλαμψης (flash lamp), ένα εξωτερικό laser κλπ. Η ενέργεια που αντλείται, απορροφάται

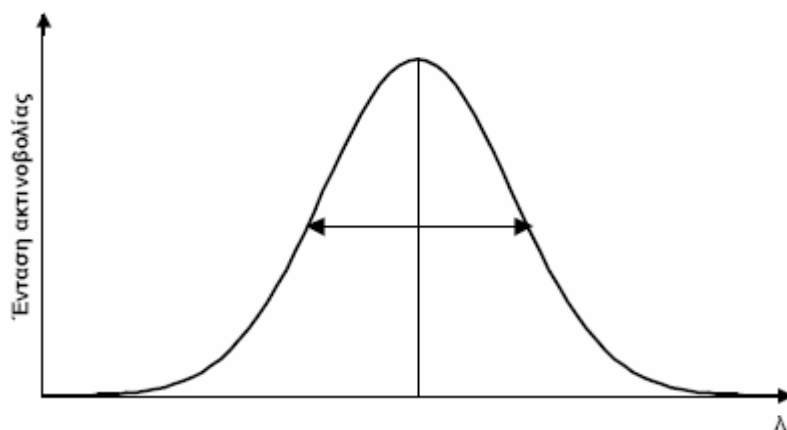
από το ενεργό υλικό, με αποτέλεσμα τα μόρια να αποκτούν ικανή ενέργεια για να προωθηθούν σε υψηλότερες ενεργειακές καταστάσεις. Όταν ο αριθμός των μορίων σε μία διεγερμένη κατάσταση υπερβαίνει τον αριθμό των μορίων σε μία χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση, παρατηρείται το φαινόμενο της αναστροφής πληθυσμών. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, μία οπτική ακτίνα που διέρχεται μέσα από το ενεργό υλικό παράγει περισσότερη εξαναγκασμένη εκπομπή από ότι εξαναγκασμένη απορρόφηση με αποτέλεσμα την ενίσχυση της δέσμης.

Το φως που δημιουργείται από την διεγερμένη εκπομπή έχει κάποια συγκεκριμένα χαρακτηριστικά όπως παρόμοιο μήκος κύματος, ίδια φάση και πόλωση. Από εδώ προκύπτουν τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά της δέσμης του laser.

1.5.2) Χαρακτηριστικά δέσμης laser

Όπως όμως αναφέρθηκε παραπάνω τα laser οφείλουν την μεγάλη τους αποδοχή σε όλους τομείς της επιστημονικής και καθημερινής ζωής σε τέσσερα εξαιρετικά σημαντικά χαρακτηριστικά που εμφανίζει η δέσμη laser και τα οποία είναι: η **μονοχρωματικότητα**, η **κατευθυντικότητα**, η **λαμπρότητα** και η **συμφωνία**.

i) **Μονοχρωματικότητα**: ουσιαστικά η κάθε δέσμη laser περιλαμβάνει ένα μόνο μήκος κύματος. Κατά την καταγραφή της κατανομής της έντασης φωτός του laser συναρτήσει του μήκους κύματος, το πλάτος στο μισό του ύψους της κατανομής (Full Width at Half Maximum, FWHM) χαρακτηρίζει την **μονοχρωματικότητα** της ακτινοβολίας ή το φασματικό εύρος του laser. Όσο πιο στενή είναι η κατανομή τόσο πιο μονοχρωματική είναι η ακτινοβολία.



Εικόνα 12: Ένταση ακτινοβολίας συναρτήσει μήκους κύματος

ii) **Κατευθυντικότητα**: Η ακτινοβολία laser παρουσιάζει ισχυρή **κατευθυντικότητα** σε αντίθεση με τις άλλες φωτεινές πηγές, δηλαδή η ακτινοβολία laser διαδίδεται προς μία συγκεκριμένη κατεύθυνση με μικρή γωνιακή διασπορά ως προς την κατεύθυνση διάδοσης. Όσο μικρότερη είναι

η γωνία απόκλισης τόσο μεγαλύτερη είναι η κατευθυντικότητα της δέσμης. Λόγω της μικρής γωνιακής απόκλισης τα δέσμης laser η μεταφερόμενη από την δέσμη ηλεκτρομαγνητική ενέργεια δεν εξαρτάται από την απόσταση.

iii) **Λαμπρότητα:** Η λαμπρότητα ή φωτεινότητα των συστημάτων laser συγκρίνεται με αυτή του ήλιου. Με τον όρο λαμπρότητα περιγράφεται η ακτινοβολούμενη ισχύ ανά μονάδα φωτιζόμενης επιφάνειας, ανά μονάδα στερεάς γωνίας και ανά μονάδα συχνότητας. Η ποσότητα ακτινοβολούμενης ενέργειας που μεταφέρεται από μια δέσμη laser μετράτε σε μονάδες Joule, ενώ η ακτινοβολούμενη ισχύς P εκφράζει την ποσότητα της ενέργειας που μεταφέρεται από τη δέσμη ανά μονάδα χρόνου και μετράτε σε Watt (Joule/s). Για τα laser που λειτουργούν με συνεχή τρόπο το μέγεθος που χρησιμοποιείται είναι η ακτινοβολούμενη ισχύ ενώ για τα παλμικά laser τα μεγέθη που είναι χρήσιμα είναι η ενέργεια ανά παλμό (Joule), η χρονική διάρκεια του παλμού και η συχνότητα λειτουργίας (Hz) .

iv) **Συμφωνία:** Το φως έχει κυματοσωματιδιακή φύση. Έτσι ως κύμα χαρακτηρίζεται από το πλάτος ταλάντωσης A , την γωνιακή συχνότητα $\omega=2\pi\nu$, την αρχική φάση ϕ και την συνολική φάση $\omega t+\phi$. Σύμφωνα, ονομάζονται τα κύματα τα οποία διατηρούν την σχετική τους φάση σταθερή. Η συμφωνία αποτελεί ένα μέτρο της έκτασης στην οποία η φάση της ακτινοβολίας διατηρείται σταθερή σε διαφορετικά σημεία στο ηλεκτρομαγνητικό πεδίο που δημιουργεί η ακτινοβολία. Οι δέσμες laser χαρακτηρίζονται τόσο από χρονική όσο και από χωρική συμφωνία. Η χρονική συμφωνία χρησιμοποιείται για την μελέτη σημείων με σταθερή διαφοράς φάσης, κατά μήκος της διεύθυνσης διάδοσης της φωτεινής δέσμης, ενώ η χωρική συμφωνία για σημεία πάνω στο μέτωπο κύματος της ακτινοβολίας και κάθετα προς την διεύθυνση διάδοσης της φωτεινής δέσμης. Η χρονική συμφωνία σχετίζεται με την μονοχρωματικότητα ενώ η χωρική με την κατευθυντικότητα και την σχετική θέση των κυμάτων στο χώρο.

1.5.3)Τύποι laser

Το ενεργό υλικό που χρησιμοποιείται για το εκάστοτε σύστημα laser είναι και αυτό που χαρακτηρίζει τον τύπο του laser. Το ενεργό υλικό αποτελείται από ένα πλήθος ατόμων ή μορίων που μπορούν να διεγερθούν σε κατάσταση αναστροφής πληθυσμού και με τη βοήθεια της εξαναγκασμένης εκπομπής ακτινοβολίας να εκπέμπουν ακτινοβολία. Ο συνδυασμός του ενεργού υλικού και της οπτικής κοιλότητας είναι αυτός που θα καθορίσει σε ποιο μήκος κύματος μπορεί να εκπέμψει το laser.

Έτσι ανάλογα με το ενεργό υλικό που χρησιμοποιούν τα laser διαχωρίζονται στις παρακάτω κατηγορίες:

I) υγρής κατάστασης

II) αέριας κατάστασης

III) στερεάς κατάστασης

IV) ημιαγωγών

I) Laser υγρής κατάστασης

Τα μόνα laser στα οποία το ενεργό υλικό είναι σε υγρή μορφή είναι τα laser οργανικών χρωστικών (dye laser). Το ενεργό υλικό αποτελείται από διάλυμα μεγάλων οργανικών μορίων χρωστικών διαλυμένα σε υγρούς διαλύτες (μεθανόλη, αιθελυνογλυκόλη, διοξάνη, κλπ) σε συγκεντρώσεις της τάξης 1:10.000. Το χαρακτηριστικό των laser αυτής της κατηγορίας είναι ότι μπορούν να εκπέμπουν σε διάφορα μήκη κύματος. Κάποιες από τις οργανικές χρωστικές που χρησιμοποιούνται στα dye laser είναι οι παρακάτω: Οξαδιαζόλη, Ολιγοφαινυλένιο, Στιλβένιο, Κουμαρίνη, Ξανθένιο, Μεροκυανίνη, Κυανίνη.

II) Laser αέριας κατάστασης

Τα περισσότερα από τα στοιχεία του περιοδικού πίνακα μπορούν να παράγουν ακτινοβολία laser όταν βρεθούν σε αέρια κατάσταση και κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις. Ένα από τα σημαντικότερα laser αερίων είναι το laser He-Ne το οποίο χρησιμοποιεί ως ενεργό υλικό άτομα He και Ne. Άλλα laser αυτής της κατηγορίας είναι το Laser ιόντων Αργού με ενεργό υλικό τα ιόντα Ar^+ που εκπέμπει σε διάφορα μήκη κύματος με σημαντικότερα εκείνα των 514.5 και 488 nm, το laser διοξειδίου του άνθρακα με ενεργό υλικό το CO_2 , το laser μονοξειδίου του άνθρακα με ενεργό υλικό το CO το οποίο εκπέμπει στα 5-6μm, το laser Αζώτου με ενεργό υλικό το αέριο Άζωτο (N_2) και άλλα.

III) Laser στερεάς κατάστασης

Στα laser αυτά, το ενεργό υλικό είναι στερεό συνήθως υπό την μορφή πρόσμιξης μέσα σε κάποιο κρύσταλλο υποδοχέα. Η λειτουργία των περισσότερων laser στερεάς κατάστασης περιγράφεται μέσω των συστημάτων 3 ή 4 επιπέδων. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει το Ruby laser (laser Ρουβιδίου) όπου ως ενεργό υλικό χρησιμοποιείται ο κρύσταλλος του ρουβιδίου (ρουμπίνι). Το laser Ρουβιδίου εκπέμπει στα 694.3 nm (ερυθρό).

Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν επίσης τα laser Νεοδυμίου (Nd-Lasers), στα οποία τρισθενή ιόντα νεοδυμίου (Nd^{+3}) χρησιμοποιούνται ως προσμίξεις μέσα σε κάποιο άλλο υλικό που είναι ο υποδοχέας. Τα κυριότερα υλικά υποδοχείς που χρησιμοποιούνται στα laser αυτής της κατηγορίας είναι τα εξής:

A) κρύσταλλος Υτρίου-Αλουμινίου ($Y_3Al_5O_{12} \rightarrow YAG$ (Yttrium Aluminum Garnet))

B) γυαλί (SiO_2 και άλλες προσμίξεις)

Γ) κρύσταλλος Υτρίου – Λιθίου – Φθορίου ($LiYF_4$)

Τα laser Nd:YAG εκπέμπουν στα 1064 nm.

Τέλος άλλα Laser αυτής της κατηγορίας είναι το laser Αλεξανδρίτη ($\text{Cr}^{+3}:\text{BeAl}_2\text{O}_4$) με ενεργό υλικό το χρώμιο υπό την μορφή τρισθενών ιόντων (Cr^{+3}) ως πρόσμιξη σε περιεκτικότητες από 0.01 ως 0.4% κατά βάρος σε κρυστάλλους BeAl_2O_4 το οποίο εκπέμπει στα 680 nm, το laser Ti:Sapphire, στο οποίο τρισθενή ιόντα τιτανίου (Ti^{+3}) αντικαθιστούν μερικά άτομα Al μέσα στο πλέγμα του κρυστάλλου Al_2O_3 σε περιεκτικότητα 0.1% κατά βάρος δημιουργώντας το ενεργό υλικό $\text{Ti}:\text{Al}_2\text{O}_3$, το laser Cr:LiCaF με ενεργό υλικό τον κρύσταλλο Cr:LiCaF, το laser Cr:LiSAF με ενεργό υλικό τον κρύσταλλο Cr:LiSrAlF καθώς και άλλα.

IV) Laser ημιαγωγών

Στην κατηγορία αυτή, ανήκουν τα laser που χρησιμοποιούν για ενεργό υλικό κάποιον ημιαγωγό. Συνηθέστερα χρησιμοποιούνται επεξεργασμένοι κρυσταλλοδίοδοι GaAs (γαλιούχο αρσενικό), GaP (γαλλιούχος φώσφορος), InSb (ινιδιούχο αντιμόνιο), InAs (ινιδιούχο αρσενικό), InP (ινιδιούχος φώσφορος).

Τέλος ανάλογα με τον τρόπο εξόδου της δέσμης τα συστήματα laser διακρίνονται σε δύο μεγάλες κατηγορίες: τα συνεχή και τα παλμικά. Τα laser συνεχούς λειτουργίας εκπέμπουν συνεχώς ακτινοβολία λόγω της συνεχούς τους άντλησης. Αντίθετα τα παλμικά laser εκπέμπουν την ακτινοβολία με την μορφή οπτικών παλμών. Ανάλογα με την διάρκεια του παλμού, την ενέργεια του παλμού, το repetition rate (ρυθμό επανάληψης) και το μήκος κύματος, υπάρχουν πολύ διαφορετικοί τρόποι για την δημιουργία των παλμών.

1.6) Ακτινοβόληση υλικού.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η μελέτη των πιθανών περιπτώσεων που παρατηρούνται κατά την ακτινοβόληση ενός υλικού. Έστω ότι ένα υλικό ακτινοβολείται με δέσμη έντασης I_0 . Ένα μέρος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, I_T , θα διέλθει από το υλικό ανεπηρέαστο, κάποιο άλλο μέρος της δέσμης, I_A , θα απορροφηθεί από το υλικό, ενώ ένα το υπόλοιπο τμήμα της δέσμης I_R θα ανακλαστεί. Σύμφωνα με τα παραπάνω ισχύει:

$$I_0 = I_T + I_A + I_R \rightarrow 1 = \frac{I_T}{I_0} + \frac{I_A}{I_0} + \frac{I_R}{I_0} \quad (1)$$

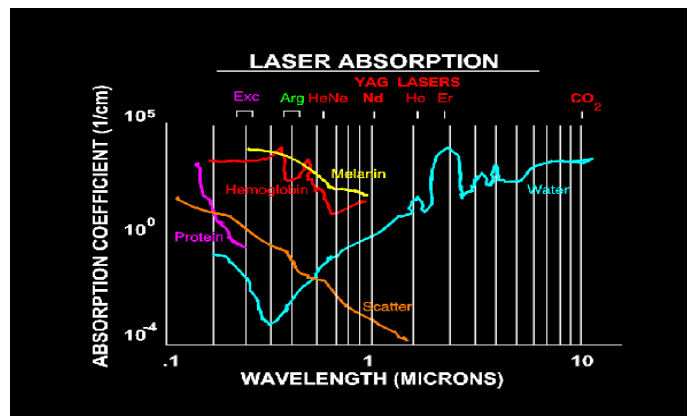
Ο λόγος $T = I_T/I_0$ ονομάζεται διαπερατότητα και εκφράζει το ποσοστό της έντασης της ακτινοβολίας που διαπερνά το υλικό. Ο λόγος $A = I_A/I_0$ ονομάζεται απορροφητικότητα και εκφράζει το ποσοστό της έντασης της ακτινοβολίας που απορροφάτε από το υλικό, ενώ ως ανακλαστικότητα εκφράζεται ο λόγος $R = I_R/I_0$ ο οποίος εκφράζει το ποσοστό της έντασης της ακτινοβολίας που ανακλάται (ή διαχέεται στο υλικό). Άρα με βάση τα παραπάνω η σχέση (1) παίρνει την μορφή:

$$T + R + A = 1$$

1.6.1) Αλληλεπίδραση laser – βιολογικού ιστού

Από τα πρώτα χρόνια ανάπτυξης των laser έγινε αντιληπτή η χρήση και η σπουδαιότητα τους στον ιατρικό τομέα, με αποτέλεσμα τα τελευταία χρόνια τα laser να αποτελούν ένα πολύτιμο εργαλείο για τους περισσότερους τομείς της ιατρικής επιστήμης. Η χρήση τους στον ιατρικό τομέα διακρίνεται σε δύο κυρίως τομείς: στην διάγνωση και στην θεραπεία όπου χρησιμοποιούνται είτε ως νυστέρι είτε ως μέσο πήξης. Κάθε μια από τις πολλές εφαρμογές που παρουσιάζουν τα laser στην ιατρική επιστήμη, βασίζεται σε ένα διαφορετικό μηχανισμό αλληλεπίδρασης του laser με τον ιστό ο οποίο μπορεί να είναι είτε η απορρόφηση, είτε η σκέδαση, είτε η διάδοση (διαπερατότητα). Το βάθος διείσδυσης στο οποίο μπορεί να φτάσει η ακτινοβολία laser εξαρτάται από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας. Για παράδειγμα δέσμη laser μήκους κύματος 632.8 nm, 660 nm (κόκκινο) έχει βάθος διείσδυσης 3-7 mm, ενώ το αντίστοιχο βάθος διείσδυσης υπέρυθρης δέσμης 820 ή 904 nm είναι 30-40 mm. Ακόμη λόγω της διαφορετικής σύστασης των ιστών, οι διαφορετικοί ιστοί παρουσιάζουν διαφορετικούς συντελεστές απορρόφησης της ακτινοβολίας laser.

Ειδικότερα, η απορρόφηση παρατηρείται σε όλους τους μοριακούς ιστούς και εξαρτάται από την συγκέντρωση και το φάσμα απορρόφησης συγκεκριμένων μορίων του ιστού. Η απορρόφηση εξαρτάται ισχυρά από το μήκος κύματος της ακτινοβολίας του εκάστοτε laser, την ισχύ του, τη διάρκεια και την συχνότητα ακτινοβολήσης καθώς επίσης και από το χρώμα του ιστού. Έτσι, για ακτινοβολία στο υπεριώδες παρατηρείται ισχυρή απορρόφηση από πρωτεΐνες, η ακτινοβολία στο ορατό μπορεί να προσδιορίσει συγκεκριμένα χαρακτηριστικά της απορρόφησης από την αιμογλοβίνη, την μελανίνη και άλλες χρωστικές, για ακτινοβολία στα 700-900 nm η απορρόφηση του ιστού είναι μικρή και παρατηρείται η μέγιστη διείσδυση του φωτός στον ιστό ενώ τέλος στο υπέρυθρο η απορρόφηση οφείλεται κατά κύριο λόγο στο νερό με μέγιστο στα 2,95 μm. Αν πρόκειται για laser στο UV και στο ορατό, παρατηρείται ηλεκτρονική διέγερση σε συγκεκριμένες χρωμοφόρες του ιστού, ενώ για μήκος κύματος στο κοντινό και μακρινό υπέρυθρο παρατηρείται κατά κανόνα απορρόφηση από το νερό του ιστού. Η σταθερά απορρόφησης μ_a που είναι χαρακτηριστική για τον κάθε βιολογικό ιστό αποτελεί ένα δείκτη της απορρόφησης του κάθε υλικού. Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι μόνο η ακτινοβολία που απορροφάται επηρεάζει τους ιστούς.



Εικόνα 13: Συντελεστής σταθερά απορρόφησης των ιστών συναρτήσει του μήκους κύματος

Η σκέδαση, παρατηρείται σε ιστούς που διακρίνονται από ανομοιογένεια, όπως είναι οι μεμβράνες, οι πυρήνες των κυττάρων κλπ. Και σε αυτή την περίπτωση ο δείκτης σκέδασης είναι χαρακτηριστικός για τον κάθε ιστό και μειώνεται με αργό ρυθμό σαν συνάρτηση του μήκους κύματος, ενώ ο δείκτης διάθλασης έχει άμεση σχέση με το νερό.

Κατά την διάδοση του φωτός στον ιστό, η ποσότητα που είναι πρωτεύουσας σημασίας είναι η επιφανειακή πυκνότητα ισχύος (fluence rate). Η μονάδα μέτρησης της στο SI σύστημα είναι το W/cm^2 και αποτελεί ένα μέτρο των πόσων φωτονίων είναι διαθέσιμα ανά μονάδα όγκου στον ιστό. Ο ρυθμός διάδοσης στο υλικό εξαρτάται ισχυρά από τις σταθερές απορρόφησης και σκέδασης του ιστού.

Ανάλογα με τις παραπάνω ιδιότητες που παρουσιάζουν οι βιολογικοί ιστοί, διαφέρει σε κάθε περίπτωση ο τρόπος αλληλεπίδραση του laser με τον ιστό. Η απορρόφηση καθορίζει το ποσό της ενέργειας που απορροφήθηκε από τον ιστό, η σκέδαση του φωτός ορίζει την ισχύ της αντίδρασης, ενώ οι αντιδράσεις μπορεί να είναι μη θερμικές, θερμικές με την εξάτμιση του ιστού, αποδομητικές ή οπτομηχανικές.

Ο μηχανισμός αντίδρασης κατά κανόνα καθορίζεται από τον χρόνο έκθεσης και την ισχύ του laser. Έτσι αν ο χρόνος έκθεσης είναι πάνω από 25 s παρατηρείται το φαινόμενο της πήξης. Για χρόνους περίπου 10^{-3} s δεν παρατηρείται διάχυση αλλά τοπική υπερθέρμανση και διατάραξη της θερμικής ισορροπίας του ιστού. Για ακόμη μικρότερους χρόνους έκθεσης (περίπου 200 μs) παρατηρείται εκτομή του ιστού ενώ για χρόνους της τάξης των ns παρατηρείται οπτική αποσύνθεση και σχηματισμός πλάσματος.

Κατά τις μη θερμικές αλληλεπιδράσεις, η ενέργεια του laser χρησιμοποιείται για την διέγερση συγκεκριμένων μορίων με την ύπαρξη χαμηλής θέρμανσης. Στην αλληλεπίδραση αυτή στηρίζεται η φωτοδυναμική θεραπεία με laser (PDT \rightarrow Photodynamic Laser Therapy) και ο φθορισμός επαγόμενος από laser (LIF).

Οι θερμικές αλληλεπιδράσεις χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για την κοπή και την πήξη, κατά την οποία παρατηρούνται διαφορετικά στάδια θερμικής βλάβης μέχρι την εξάτμιση του ιστού σε θερμοκρασία εκατοντάδων βαθμών κελσίου. Οι θερμικές αλληλεπιδράσεις βασίζονται σε πολλούς παράγοντες όπως το βάθος διείσδυσης, τη θερμική διάχυση, το χρόνο έκθεσης, την διάρκεια του παλμού και την πυκνότητα ενέργειας.

Μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές των laser στον ιατρικό τομέα είναι η αποδόμηση του ιστού κατά την οποία ουσιαστικά αντικαθίσταται το νυστέρι κατά τις χειρουργικές επεμβάσεις. Κατά τις αντιδράσεις αποδόμησης παρατηρείται σπάσιμο των μηχανικών δεσμών για την απομάκρυνση μορίων ή για την δημιουργία κενών. Για την εκτομή του ιστού απαιτείται μεγάλος συντελεστής απορρόφησης από τον ιστό, ενώ όσο συντομότερος είναι ο παλμός τόσο μικρότερο το κατώφλι εκτομής. Η εκτομή πραγματοποιείται μεταξύ 2-500 μs , μέχρι η ενέργεια του παλμού να πέσει κάτω από το κατώφλι ενέργειας, ενώ η εναπομένουσα ενέργεια θερμαίνει τον ιστό στην περιοχή διείσδυσης. Κατά την κάθετη ακτινοβολή του ιστού με το laser, τα θραύσματα εκτινάσσονται

προς την κατεύθυνση της ακτίνας του laser με αποτέλεσμα σημαντικό τμήμα της ακτινοβολίας να απορροφάτε από τα προϊόντα της αποδόμησης.

Τέλος οι οπτομηχανικές αντιδράσεις χρησιμοποιούνται κυρίως για την λιθοθρυψία (για παράδειγμα σε περιπτώσεις λίθων στη χολή). Οι αντιδράσεις του ιστού κυμαίνονται στην περιοχή των nanosecond ή και ακόμα βραχύτερα διαστήματα, ενώ κατά τις αντιδράσεις αυτές χρησιμοποιούνται κυρίως Nd:YAG Q- Switched laser. Στην περίπτωση αυτή κατά την αλληλεπίδραση laser-ιστού δημιουργούνται ισχυρές ηλεκτρικές δυνάμεις οι οποίες αποσπών τα ηλεκτρόνια από τα άτομα δημιουργώντας έτσι μια ηλεκτρονική χιονοστιβάδα με αποτέλεσμα την δημιουργία πλάσματος, την επιπλέον θέρμανση της περιοχής, θερμική διαστολή και shock wave.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, τα laser βρίσκουν ποικίλες εφαρμογές σε πολλούς τομείς της ιατρικής επιστήμης, είτε θεραπευτικούς είτε διαγνωστικούς. Έτσι τα laser κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται θεραπευτικά για κοπή, πήξη, αφαίρεση ιστού είτε επιφανειακά όπως στο δέρμα ή στον οφθαλμό είτε για εγχείρηση όγκων ή εσωτερικών κακώσεων καθώς και στην πλαστική χειρουργική για την αντιμετώπιση ουλών ή την επανόρθωση της επιδερμίδας. Όσο αφορά τον διαγνωστικό τομέα τα laser χρησιμοποιούνται για την αναγνώριση καρκινικών όγκων με την φασματοσκοπική τεχνική LIF είτε για την διάκριση ιστών.

1.6.2) Εφαρμογές των laser στην ιατρική

Αν και τα πρώτα συστήματα laser αναπτύχθηκαν στις αρχές τις δεκαετίας του 1960 και από την αρχή ακόμη έγινε κατανοητή η σπουδαιότητα τους στους περισσότερους επιστημονικούς τομείς, στον ιατρικό κλάδο η εισαγωγή των laser πραγματοποιήθηκε πριν από 20 περίπου χρόνια και μάλιστα σε περιορισμένο βαθμό. Τα τελευταία χρόνια και με την επισταμένη μελέτη της αλληλεπίδρασης των laser με τους βιολογικούς ιστούς έχει αποδειχθεί ότι τα laser αποτελούν ένα πολύτιμο εργαλείο για τους περισσότερους τομείς της ιατρικής με εξαιρετικά αποτελέσματα. Υπάρχουν ακόμα πολλές παράμετροι να μελετηθούν και μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για πολλές άλλες πιθανές εφαρμογές που θα μπορούσαν να έχουν τα laser στον ιατρικό κλάδο. Στη συνέχεια περιγράφονται κάποιες από τις εφαρμογές των laser σε διάφορους τομείς της ιατρικής και τα αποτελέσματα τους.

Αναλυτικότερα για το κάθε ένα από τα laser που χρησιμοποιούνται στην ιατρική προκύπτουν τα παρακάτω στοιχεία:

Πίνακας 1: Εφαρμογές συγκεκριμένων τύπων laser στην ιατρική

Τύπος laser	Τρόπος Λειτουργίας	Μήκος Κύματος (nm)	Ενέργεια (J) / Ισχύς (W)	Ιατρικές εφαρμογές
Excimer	Συνεχής/ Παλμική	193-248nm	1	Διαθλαστική χειρουργική
Ar⁺	Συνεχής	488/ 514	2-10	Χειρουργική, ουρολογία, δερματολογία, οφθαλμολογία
Argon –Dye	Συνεχής	488-788	0.5-3	Πλαστική χειρουργική, δερματολογία, ογκολογία, οφθαλμολογία
Nd:YAG	Συνεχής	1064	10-120	Χειρουργική, ουρολογία, δερματολογία, νευροχειρουργική, γαστροεντερολογία
Nd:YAG	Παλμική	1064	1 MW/παλμό	Οφθαλμολογία

Laser Nd:YAG

Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των Nd:YAG laser όσο αναφορά την αλληλεπίδραση τους με βιολογικούς ιστούς είναι η μη απορρόφηση τους από το νερό, η διείσδυση στους ιστούς μέχρι βάθους 5-6 mm, η ανάκλαση του 50% της ισχύος της δέσμης τους και απορρόφηση του υπόλοιπου 50%. Ακόμη προκαλούν πήξιμο των πρωτεϊνών (φωτοπηξία),νεξάτμιση και συρρίκνωση των κυττάρων με αποτέλεσμα την σχάση των ιστών, μια διαδικασία πιο αργή που προκαλεί περισσότερη νέκρωση στους ιστούς από ότι με τα laser CO₂ όπως επίσης και η αιμόσταση που προκαλούν είναι καλύτερη από αυτήν που προκαλείται με τα laser CO₂.

Λόγω της μεγάλης αιμοστατικής τους δράσης στους ιστούς συνίσταται η χρήση τους σε αιμορραγικές καταστάσεις, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ασθενείς που φορούν βηματοδότη στην καρδιά επειδή δεν προκαλούν ηλεκτρομαγνητικές παρεμβολές, ενώ λόγω της ικανότητας διάδοσης της ακτινοβολίας μέσω των οπτικών ινών είναι δυνατή η μεταφορά τους σε δυσπρόσιτες περιοχές του οργανισμού είτε για θεραπεία (πχ. σταμάτημα αιμορραγίας) είτε για διάγνωση (πχ. ενδοσκοπία). Προκαλούν όμως μεγαλύτερη βλάβη στους υγιείς ιστούς από ότι τα laser CO₂ επειδή δεν είναι δυνατό να προσδιοριστεί το βάθος διείσδυσης της διαχεόμενης ακτινοβολίας.

Laser CO₂

Η ακτινοβολία των laser αυτών απορροφάτε πλήρως από το νερό όπως επίσης και από τους ιστούς που έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε νερό με αποτέλεσμα να προκαλούν εξάτμιση (φωτοεξάτμιση) και για αυτό το λόγο το βάθος διείσδυσης αυτών των laser στους ιστούς κυμαίνεται από 0.1-0.2mm. Ακόμη το 95% της ενέργειας τους απορροφάται στο σημείο επαφής με τον ιστό με αποτέλεσμα την έντονη θερμότητα και εξαέρωση του ιστού, ενώ η βλάβη που προκαλείται στους γύρω ιστούς είναι περιορισμένη. Χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο για την διατομή του ιστού ενώ η αιμόσταση που προκαλούν στους ιστούς με πλούσια τριχοειδή αιμάτωση είναι καλή (πχ. στο δέρμα, στις φωνητικές χορδές και στον τράχηλο της μήτρας).

Τα laser CO₂ είναι κατάλληλα για τα περισσότερα είδη εγχειρήσεων λόγω της μεγάλης τους δυνατότητας για την αφαίρεση ιστών, προστατεύουν τους υγιείς ιστούς και περιορίζουν το οίδημα με αποτέλεσμα και την πολλή καλή εφαρμογή τους και στην μικροχειρουργική, ενώ επίσης εμφανίζουν αιμοστατικές και αντισηπτικές ιδιότητες.

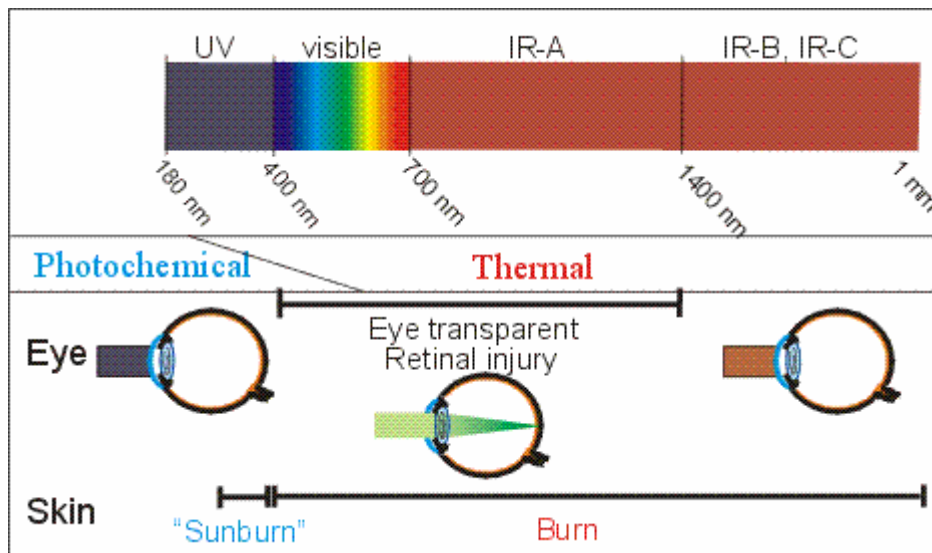
Laser Ar

Σε αντίθεση με τα προηγούμενα τα laser αυτά διαπερνούν το νερό και τους διαφανείς ιστούς ενώ απορροφώνται από την μελανίνη και την αιμοσφαιρίνη με αποτέλεσμα να διαπερνούν την επιδερμίδα μέχρι να απορροφηθούν από την μελανίνη και την αιμοσφαιρίνη με βάθος διείσδυσης 1-2 mm. Το 55% της ισχύς τους ανακλάται από τους ιστούς ενώ το υπόλοιπο απορροφάται. Μία πολύ σημαντική εφαρμογή τους είναι ότι διέρχονται μέσα από το μάτι και συμβάλουν στην συγκόλληση του αμφιβληστροειδή, με αποτέλεσμα να αποτελούν ένα από τα laser που χρησιμοποιούνται σε πολύ μεγάλο βαθμό στην οφθαλμολογία.

Επίσης αυτά τα laser έχουν αιμοστατικές ιδιότητες, προκαλούν μικρότερη βλάβη στους ιστούς από το laser Nd:YAG και CO₂, χρησιμοποιούνται στην μικροχειρουργική (πχ. νευροχειρουργική) χρησιμοποιούνται για ενδοσκοπία ενώ δεν προκαλούν ηλεκτρομαγνητικές παρεμβολές.

1.6.3) Εφαρμογές των laser στην οφθαλμολογία

Όπως γίνεται αντιληπτό, λόγω των διαφορετικών χαρακτηριστικών που εμφανίζουν τα διάφορα συστήματα laser βρίσκουν ποικίλες εφαρμογές σε ένα πλήθος διαφορετικών ιατρικών. Ιδιαίτερες εφαρμογές βρίσκουν τα laser στην οφθαλμολογία όπου αρκετές παθήσεις των οφθαλμών αντιμετωπίζονται επιτυχώς με τη χρήση των laser. Η ακτινοβολία των laser επιδρά με διάφορους τρόπους πάνω στους ιστούς ανάλογα με το μήκος κύματος της. Οι κυριότερες επιδράσεις είναι η θερμική, η ιονίζουσα και η φωτοχημική. Η θερμική επίδραση μπορεί να προκαλέσει είτε πήξη του ιστού (φωτοπηξία), κατά την οποία δημιουργείται έγκαιμα του ιστού που ακτινοβολείται και στη συνέχεια ουλοποιείται, είτε εξάτμιση του ιστού (φωτοεξάτμιση), κατά την οποία δημιουργούνται αναίμακτες τομές ακριβείας στους ιστούς. Στην παρακάτω εικόνα αναπαρίσταται σχηματικά, η επίπτωση των διαφόρων μηκών κύματος στον οφθαλμό:



Εικόνα 14: Σχηματική αναπαράσταση της επίδρασης του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος στον οφθαλμό.

Ειδικότερα στην οφθαλμολογία χρησιμοποιούνται ευρέως 2 τύποι laser: το Argon laser και το laser Nd:YAG, ενώ για τις επεμβάσεις διαθλαστικής χειρουργικής χρησιμοποιούνται τα excimer laser.

Η δράση του Argon laser είναι θερμική και απορροφάται κυρίως από την μελανίνη των ιστών (μελάγχρουν επιθήλιο), την ξανθοφύλλη (χρωστική εντός του αμφιβληστροειδή, κυρίως στην περιοχή της ωχράς κηλίδας) και την αιμοσφαιρίνη. Λόγω της θερμικής του δράσης το Argon laser χρησιμοποιείται ευρέως για την αντιμετώπιση παθήσεων του βυθού (περιφερικές αλλοιώσεις του αμφιβληστροειδή, αγγειακές παθήσεις του αμφιβληστροειδή, παθήσεις της ωχράς).

Η θεραπεία των περιφερικών αλλοιώσεων του αμφιβληστροειδή γίνεται μέσω της φωτοπηξίας με τη χρήση του Argon laser η οποία δημιουργεί χοριοαμφιβληστροειδική ουλή στον αμφιβληστροειδή αντιμετωπίζοντας έτσι προβλήματα της συνέχειας του αμφιβληστροειδή (ρωγμές, οπές) οι οποίες εξελίσσονται σε αποκόλληση του αμφιβληστροειδή.

Η συχνότερη αγγειακή πάθηση του αμφιβληστροειδή για την οποία χρησιμοποιείται η φωτοπηξία με τη χρήση του Argon laser είναι η διαβητική αμφιβληστροειδοπάθεια. Με την φωτοπηξία επιτυγχάνεται η επιβράδυνση της εξέλιξης της νόσου ή ακόμα και η βελτίωση της όρασης του ασθενούς με την απορρόφηση του οιδήματος της ωχράς και την υποστροφή της νεοαγγείωσης.

Το Argon laser χρησιμοποιείται ευρύτατα και για την θεραπεία του γλαυκώματος ανοιχτής γωνίας. Γλαύκωμα ονομάζεται η ασθένεια κατά την οποία συσσωρεύετε υδατοειδές υγρό στον πρόσθιο θάλαμο του οφθαλμού λόγω της απόφραξης της αποχετευτικής οδού με αποτέλεσμα την αύξηση της ενδοφθάλμιας πίεσης. Για την θεραπεία του γλαυκώματος εφαρμόζονται σε ολόκληρη την περιφέρεια της γωνίας 60-100 βολές διαμέτρου 50 μ και ανάλογης έντασης, στην εσωτερική επιφάνεια του σκληροκερατοειδικού ηθμού. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται τραμπεκκυλοπλαστική. Με την θερμική δράση του Argon laser προκαλούνται μετρίου βαθμού εγκαύματα και μικροουλές του trabeculum με αποτέλεσμα την συνολική ελάττωση της διαμέτρου του ηθμού και την διάνοιξη των μεσοδιαστημάτων του υπόλοιπου δικτυωτού με αποτέλεσμα την ευκολότερη αποχέτευση του υδατοειδούς υγρού από τον πρόσθιο θάλαμο.

Το laser Nd-YAG λειτουργεί ως νυστέρι αφού προκαλεί λεπτή ψαλίδιση των ιστών με την δημιουργία κυμάτων μικρής διάρκειας με κάθε εκπεμπόμενο παλμό.

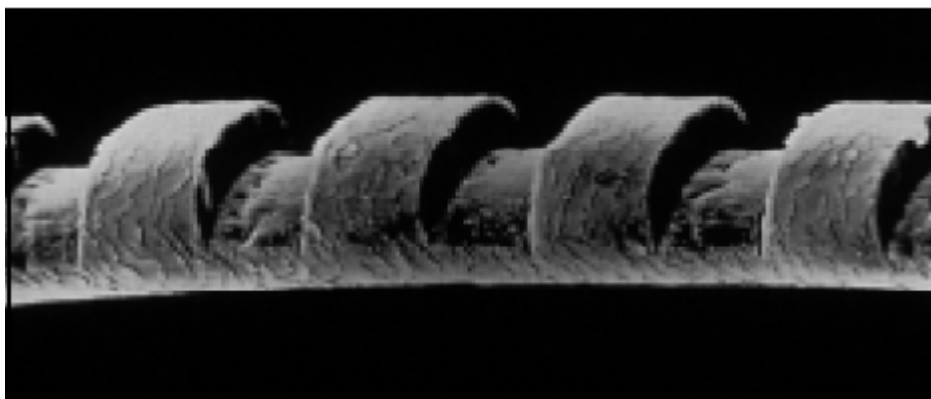
Η παραπάνω μέθοδος της τραμπεκουλοεκτομής γίνεται και με το laser Nd-YAG με εξίσου καλά αποτελέσματα.

Ιδιαίτερη είναι η εφαρμογή του Nd-YAG για την αντιμετώπιση του δευτερογενή καταρράκτη. Κατά την εξωπεριφακική αφαίρεση του καταρράκτη και την τοποθέτηση ενδοφακού οπίσθιου θαλάμου το οπίσθιο περιφάκιο θολώνει (δευτερογενής καταρράκτης) στο 5-50% των περιπτώσεων και προκαλεί σημαντική ελάττωση της όρασης .Με τη βοήθεια του Nd-YAG προκαλείται σχάση του δευτερογενή καταρράκτη με τη φωτοδιασπαστική δράση του.

Γενικότερα το Nd-YAG παρουσιάζει δραστικά αποτελέσματα στην απομάκρυνση τραυματικών υπολοίπων του ματιού και του φακού του ματιού .

Εξαιρετικής σημασίας για την οφθαλμολογία αποτελούν τα excimer laser , τα οποία αποτελούν και σημαντικό τμήμα της παρούσας μελέτης, και για τα οποία θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στην συνέχεια.

1.7) EXCIMER LASER



Εικόνα 15: Φωτογραφία ανθρώπινης τρίχας που έχει υποστεί τομές από excimer laser (IBM).

Στην κατηγορία των excimer laser γίνεται εκτενής αναφορά, επειδή είναι τα laser που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο στην διαθλαστική χειρουργική αφενός, και αφετέρου αποτέλεσαν τα laser που χρησιμοποιήθηκαν για την εκπόνηση της παρούσας μελέτης.

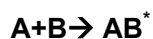
Με τον όρο excimer laser δεν περιγράφεται απλά μία συσκευή laser, αλλά μια ολόκληρη κατηγορία laser με παρόμοια χαρακτηριστικά της ακτινοβολίας που εκπέμπουν. Όλα τα laser αυτής της κατηγορίας εκπέμπουν παλμούς μεγάλης ισχύος που η διάρκεια τους είναι της τάξης των nanoseconds σε μήκη κύματος στις περιοχές του ορατού και του υπεριώδους.

Η λέξη excimer προέρχεται από την συντόμευση των λέξεων excited dimer, δηλαδή διεγερμένα διμερή και περιγράφει μία κατηγορία μορίων που αποτελούνται από ένα άτομο ευγενούς αερίου (Ar, Xe ή Kr) και από ένα άτομο αλογόνου (F, Cl, Br, I). Το χαρακτηριστικό αυτών των μορίων είναι ότι όταν ενωθούν τα 2 άτομα που τα απαρτίζουν στις θεμελιώδεις ηλεκτρονικές τους καταστάσεις σχηματίζουν το αντίστοιχο διμερές μόριο στην θεμελιώδη του κατάσταση το οποίο όμως είναι εξαιρετικά ασταθές έχοντας πρακτικά μηδενικό χρόνο ζωής (10^{-13} s). Όταν όμως τα δύο άτομα ενωθούν κάτω από ειδικές συνθήκες και σχηματίσουν το διεγερμένο διμερές μόριο, αυτό είναι σταθερό με ικανοποιητικό χρόνο ζωής. Κατά αυτό τον τρόπο είναι εύκολο να δημιουργηθούν αναστροφές πληθυσμών μεταξύ της διεγερμένης και της βασικής κατάστασης αυτών των μορίων, στον βαθμό που τα αποδιεγειρόμενα στην βασική κατάσταση μόρια να διασπώνται αυτόματα, δημιουργώντας μόνιμα έλλειμμα πληθυσμού σε αυτή και επομένως κατάλληλες συνθήκες πληθυσμιακής αναστροφής ώστε να εκπέμψουν ακτινοβολία laser. Τα πιο σημαντικά μόρια διεγερμένων διμερών και τα αντίστοιχα μήκη κύματος στα οποία εκπέμπουν φαίνονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2: μήκος κύματος εκπομπής διεγερμένων διμερών

Διεγερμένα διμερή	Μήκος κύματος εκπομπής (nm)
KrF	248
KrCl	222
XeCl	308
XeF	351, 353
XeBr	282
XeI	253
ArF	193
ArCl	175
F ₂	157

Τα μόρια αυτά δεν υπάρχουν ελεύθερα στην φύση, αλλά μπορεί να σχηματιστούν όταν παραχθεί ηλεκτρική εκκένωση μέσα σε ένα σωλήνα, στον οποίο υπάρχουν τα αέρια αυτά με κατάλληλη αναλογία:



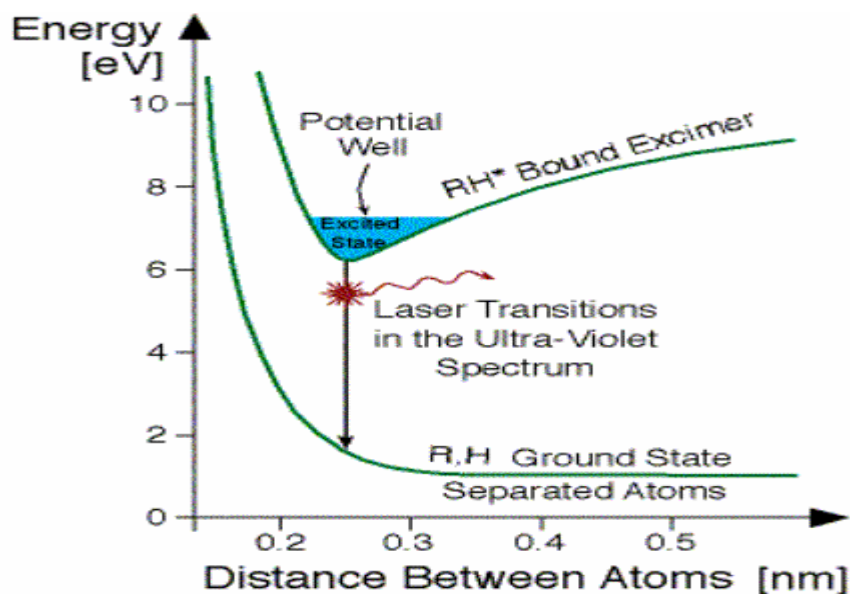
Τα μόρια των excimer που σχηματίζονται κατά αυτό τον τρόπο βρίσκονται στην διεγερμένη κατάσταση AB^* . Το μόριο AB^* αποτελεί το ενεργό υλικό του laser. Η αποδιέγερση του μορίου των δύο ατόμων οδηγεί στην αποσύνδεση των 2 ατόμων που βρίσκονται πλέον στην θεμελιώδη κατάσταση και δρουν απωθητικά μεταξύ τους σε οποιαδήποτε απόσταση τους. Κατά την αποδιέγερση τους παράγεται ακτινοβολία laser σύμφωνα με την εξίσωση:



Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εξίσωση:



Ο μηχανισμός εκπομπής ακτινοβολίας laser γίνεται περισσότερο κατανοητός με βάση το παρακάτω σχήμα. Στο σχήμα φαίνεται η δυναμική ενέργεια του κάθε ανεξάρτητου ατόμου (θεμελιώδης κατάσταση), η δυναμική ενέργεια του διεγερμένου μορίου και οι στάθμες ταλάντωσης του μορίου AB^* .



Εικόνα 16: Ενεργειακό διάγραμμα της λειτουργίας των excimer laser (http://www.lasalle.edu/academ/chem/laser_web/excimer.htm)

Κατά την αποδιέγερση παράγεται ακτινοβολία laser η οποία έχει συνεχές και σχετικά διευρυμένο φάσμα εκπομπής, ιδιότητα που είναι χαρακτηριστική των excimer laser. Επίσης στα excimer laser η πρόσθετη κινητική ενέργεια οδηγεί σε απόληψη ακτινοβολίας με μεγάλη οπτική απολαβή. Ο χρόνος παραμονής στη διεγερμένη κατάσταση στα excimer ποικίλει μεταξύ 5-20 ns και αποτελεί την χρονική κλίμακα παλμών των του Laser.

Τα excimer laser λειτουργούν μόνο παλμικά με τυπικούς χρόνους παλμού 10-50 ns , ενέργειες ανά παλμό μέχρι περίπου 1 J και συχνότητα αρκετών εκατοντάδων παλμών ανά δευτερόλεπτο. Τα φασματικό εύρος της μετάβασης laser καθορίζεται από το εύρος της καμπύλης δυναμικού της άνω στάθμης και μπορεί να είναι μεγαλύτερο του 1 nm.

Το ενεργό υλικό των excimer laser αποτελείται από μείγμα αερίων σε συνολική πίεση συνήθως μέχρι 5 atm. Ο κύριος όγκος του μείγματος είναι (κατά 88% έως 99%) ένα αέριο που εξουδετερώνει τις συγκρούσεις μεταξύ των μορίων και μεσολαβεί με αυτό τον τρόπο στην μεταφορά της ενέργειας (Buffer).

Σαν αέριο χρησιμοποιούνται συνήθως He, Ne σε διεγερμένη κατάσταση καθώς και Ar, Kr, Xe.

Από τα αλογόνα χρησιμοποιούνται συνήθως HCl, F₂, HF, HBr, Br, ενώ σαν αέριο (buffer) χρησιμοποιούνται συνήθως He, Ne και Ar.

Ένα μεγάλο πρόβλημα που εμφανίζουν τα excimer laser είναι η επικινδυνότητα των αλογόνων που χρειάζονται για την λειτουργία τους και η ισχυρή οξειδωτική τους δράση τους στα υλικά με τα οποία έρχονται σε επαφή.

Μερικές από τις εφαρμογές των excimer laser είναι:

- 1) laser άντλησης σε Dye Laser
- 2) Μη γραμμική φασματοσκοπία
- 3) Φασματοσκοπία υπεριώδους
- 4) Φωτοδιέγερση και φωτοχημεία

- 5) Διαχωρισμός ισοτόπων
- 6) Επεξεργασία υλικών
- 7) Σχεδιασμός ημιαγωγών
- 8) Ολοκληρωμένα κυκλώματα
- 9) Σκλήρυνση διατάξεων ημιαγωγών
- 10) Επεξεργασία επιφάνειας μετάλλων , κεραμικών, πλαστικών
- 11) Καθαρισμός ζωγραφικών πινάκων
- 12) Φωτοχημεία
- 13) Παρακολούθηση ατμοσφαιρικής ρύπανσης
- 14) Ιατρικές εφαρμογές.

1.7.1) EXCIMER laser στην οφθαλμολογία- μηχανισμός φωτοαποδόμησης

Στις αρχές του 1980 άρχισαν να πραγματοποιούνται έρευνες για την μελέτη χάραξης οργανικών πολυμερών με παλμούς laser μεγάλης έντασης, με θεαματικά αποτελέσματα. Παρατηρήθηκε ότι μπορούσε να απομακρυνθεί υλικό με μεγάλη ακρίβεια χωρίς την καταστροφή της γύρω περιοχής. Λόγω της απουσίας ή σημαντικού περιορισμού των θερμικών φαινομένων η διαδικασία αυτή ονομάστηκε “cold laser ablation” ή “ablative photodecomposition” (εκρηκτική φωτοαποδόμηση) ή για συντομία “photoablation” (φωτοεκτομή). Εν συντομία, ο μηχανισμός που λαμβάνει χώρα κατά την ακτινοβολία του κερατοειδή με excimer laser ArF στα 193 nm είναι ο παρακάτω: ο κερατοειδής έχει εξαιρετικά υψηλό συντελεστή απορρόφησης στα 193nm, ενώ τα φωτόνια στα 193nm είναι πολύ ενεργητικά ($E_{193nm}=6.4 \text{ eV}$) με αποτέλεσμα να εναποθέτουν περισσότερη ενέργεια από την μέση ενέργεια των πρωτεϊνικών δεσμών που απαντώνται στον κερατοειδή. Όταν η συγκέντρωση των φωτονίων ή η πυκνότητα ενέργειας υπερβεί μία συγκεκριμένη τιμή (ablation threshold), οι δεσμοί διασπώνται χωρίς να ανασυντίθενται και το υλικό αποσυντίθεται. Η πλεονάζουσα ενέργεια των φωτονίων προσδίδει την απαραίτητη κινητική ενέργεια στα θραύσματα για την απομάκρυνση τους από την επιφάνεια (Albagli, 1994, Pettit, 1993, Vogel, 2003, Ren et al.1995).

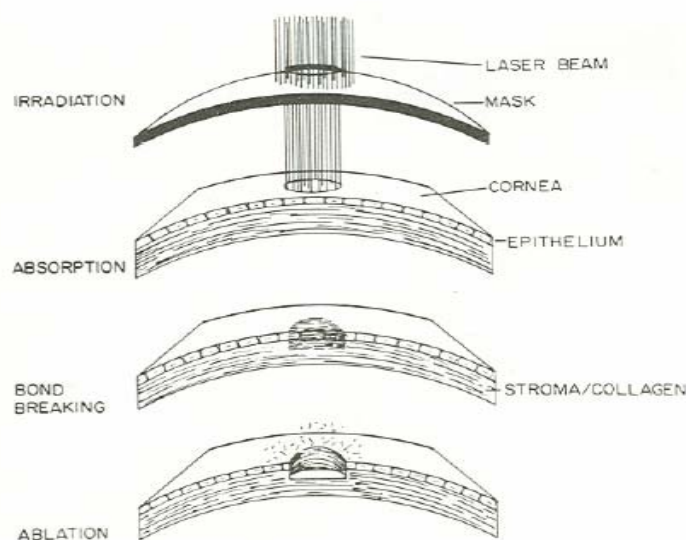
Για πολλά χρόνια πριν από αυτές τις μελέτες οι οφθαλμίατροι είχαν παρατηρήσει ότι λόγω της μεγάλης διοπτρικής ισχύος του κερατοειδή, θα μπορούσαν να επέμβουν πάνω του για να αλλάξουν την καμπυλότητα και κατ' επέκταση την διοπτρική του δύναμη με απώτερο στόχο την διόρθωση των διαθλαστικών σφαλμάτων. Περιοριστικός παράγοντας ήταν η μη ύπαρξη κάποιου εργαλείου για την πραγματοποίηση μιας τέτοιας επέμβασης η οποία απαιτούσε εξαιρετική ακρίβεια και ευαισθησία.

Σχεδόν αμέσως μετά τις αρχικές έρευνες για την επίδραση των laser σε συνθετικά πολυμερή πραγματοποιήθηκαν έρευνες για την εκτομή του κερατοειδή με παλμικό laser στο υπεριώδες, οι

οποίες επικεντρώθηκαν κατά κύριο λόγο στο excimer laser ArF στα 193 nm, το οποίο παράγει παλμούς χρονοδιάρκειας 15 ns. Το ArF μπορούσε να αποδομεί και αφαιρεί τον κερατοειδή με μεγάλη ακρίβεια και λιγότερη ζημιά στις γειτονικές περιοχές. Αυτό οφειλόταν εν μέρει στον μεγάλο συντελεστή απορρόφησης των μικρών μηκών κύματος από τον κερατοειδή (2700 cm^{-1}).

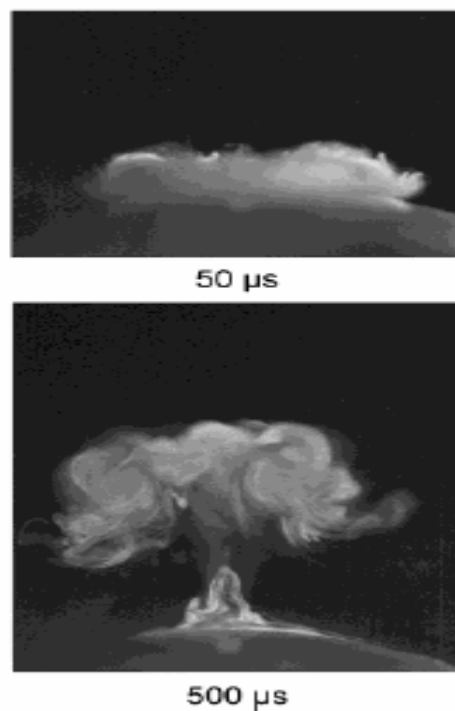
Κατά την μελέτη της σχέσης μεταξύ του βάθους εκτομής του κερατοειδή και την ένταση της ενέργειας ανά παλμό, παρατηρήθηκε ότι η ελάχιστη ένταση για την έναρξη της εκτομής (ablation threshold) ήταν τα 40 mJ/cm^2 . Για τιμές πυκνότητας ενέργειας πάνω από 1 J/cm^2 , το βάθος εκτομής διατηρείται περίπου σταθερό στο $1 \mu\text{m}$ περίπου. Η πιο αποτελεσματική εκτομή (μάζα ανά παλμό) πραγματοποιείται μεταξύ $100\text{-}300 \text{ mJ/cm}^2$ (Pettit, 1995).

Ο μηχανισμός αλληλεπίδρασης του laser με τον κερατοειδή βασίζεται στις αρχές που περιγράφονται αναλυτικότερα στην συνέχεια. Η ενέργεια της δέσμης του ArF που εναποτίθεται στον κερατοειδή αρχικά απορροφάται από τα οργανικά συστατικά. Το νερό που καταλαμβάνει το 75% της συνολικής μάζας του ιστού έχει μέτρια απορροφητικότητα στα 193nm ($\sim 10 \text{ cm}^{-1}$) ενώ το υπόλοιπο 25% της μάζας καταλαμβάνει κυρίως το κολλαγόνο που αποτελεί την πρωταρχική δομική πρωτεΐνη του ιστού. Όπως και οι υπόλοιπες πρωτεΐνες, το κολλαγόνο περιέχει αμινοξέα τα οποία συνδέονται σε μια μακριά μοριακή αλυσίδα με πεπτιδικούς δεσμούς. Η πεπτιδική αλυσίδα είναι μια ισχυρή χρωμοφόρα στο μακρινό υπεριώδες με γραμμομοριακό συντελεστή απορρόφησης (molar extinction coefficient) $5.5 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \text{ M}^{-1}$ στα 193 nm. Λόγω της μεγάλης περιεκτικότητας του δεσμού στον ιστό ($\sim 10^{21} \text{ cm}^{-3}$) θεωρείται ο πιο σημαντικός απορροφητής κατά την αλληλεπίδραση του ιστού με το laser (Vogel et al., 2003). Έτσι κατά την ακτινοβολία του ιστού απορροφάται η ενέργεια της ακτινοβολίας από τα δομικά στοιχεία του ιστού με αποτέλεσμα τη διάσπαση των μοριακών τους δεσμών μέσω φωτοχημικής διαδικασίας.



Εικόνα 17: (Trokel,Srinivisan,Braren).Σχηματική αναπαράσταση ελεγχόμενης εκτομής.

Κατά την διαδικασία εκτομής παρατηρείται ορατή έκρηξη θραυσμάτων από την επιφάνεια του κερατοειδή που συνοδεύεται από οξύ ήχο. Η εκτίναξη του υλικού προκαλεί την δημιουργία ωστικού κύματος που διαδίδεται στο στόχο ,καθώς και shock wave στον περιβάλλοντα αέρα το οποίο απομακρύνεται από τον κερατοειδή μαζί με τα θραύσματα της εκτομής. Το νέφος των εκπεμπόμενων σωματιδίων (plume) αρχικά εκτοξεύεται κάθετα στην επιφάνεια του ιστού και κινείται με υπερηχητικές ταχύτητες, αν και γρήγορα η ταχύτητα του ελαττώνεται κατά την αλληλεπίδραση του με τον αέρα. Με βάση φωτογραφίες που έχουν ληφθεί κατά την διάρκεια της αλληλεπίδρασης του laser με τον ιστό, υπολογίστηκε ότι περίπου 5 μs μετά τον παλμό του laser εκτοξεύονται τα θραύσματα, ενώ το νέφος των εκπεμπόμενων σωματιδίων εξαφανίζεται πολύ αργότερα, περίπου 500 μs αργότερα (Vogel et al, 2003).



Εικόνα 18: Φωτογραφία εκτίναξης υλικού αμέσως μετά την ακτινοβολία κερατοειδούς με laser ArF (193 nm), επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας 120 mJ/cm^2 . copyright 1997 American Academy of Ophthalmology, Inc.

Φωτοακουστικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί, προτείνουν ότι η εκτίναξη των σωματιδίων ξεκινάει πολύ νωρίς στην μικροσκοπική κλίμακα, ακόμα και πριν από το τέλος της ακτινοβολίας (Srinivasan et al. 1985).

Τα προϊόντα της αποδόμησης περιλαμβάνουν αέρια χαμηλού μοριακού βάρους, όπως ελαφρούς υδρογονάνθρακες , νερό , μόρια υδρογόνου , αμμωνία , CO και CO₂. Επίσης έχουν παρατηρηθεί και υδρογονάνθρακες μεγαλύτερου μοριακού βάρους. Υπάρχουν υποψίες ότι ίσως υπάρχει και πλάσμα μέσα στο αρχικό νέφος μορίων, το οποίο επιβεβαιώθηκε και με φασματοσκοπικές μελέτες αλλά με πυκνότητες ενέργειας 10 J/cm^2 , που είναι τουλάχιστον 50 φορές μεγαλύτερη από τις

πραγματικές τιμές των πυκνοτήτων ενέργειας που χρησιμοποιούνται κατά τις επεμβάσεις (Pettit et al., 1995) .

Αν και τα θερμικά αποτελέσματα θεωρούνται αμελητέα κατά την αποδόμηση με laser, πραγματοποιείται θέρμανση του ιστού. Από έρευνες παρατηρήθηκε μία αύξηση της τάξεως των 20°C κατά την ακτινοβολήση του κερατοειδή με ένταση ακτινοβολίας 360 mJ /cm² και repetition rate 30 Hz. Η θέρμανση αυξανόταν με την αύξηση είτε της συχνότητας των παλμών είτε με την αύξηση της έντασης της ενέργειας. Το τελικό συμπέρασμα είναι ότι ο ρυθμός επανάληψης των παλμών πρέπει να διατηρείται κάτω από 63 Hz για την αναμόρφωση του κερατοειδή για εντάσεις ενέργειας κάτω από 200 mJ/cm² ανά παλμό. Με αυτές τις συνθήκες παρατηρούνται οι ελάχιστες δυνατές παράπλευρες επιπτώσεις (side-effects) (Pettit et al., 1995) .

Με την ακτινοβολήση ιστού με laser στα 193nm έχουν παρατηρηθεί βλάβες στο DNA , οι οποίες προτείνουν τον πιθανό κίνδυνο της υγείας λόγω της φωτοεκτομής. Όμως, όπως προκύπτει από διάφορες έρευνες ο κίνδυνος μετάλλαξης στον κερατοειδή και στους παρακείμενους ιστούς λόγω της ακτινοβολήσης με laser στα 193nm είναι ελάχιστος. Ανάμεσα στους πολλούς προστατευτικούς παράγοντες που προστατεύουν τους ιστούς από πιθανές μεταλλάξεις λόγω της ακτινοβολήσης είναι η προστατευτική δράση της κυτταρικής μεμβράνης . Η υψηλή απορρόφηση της υπεριώδους ακτινοβολίας από τις εξωτερικές στοιβάδες του κυττάρου αποτρέπουν την εισχώρηση ενός πολύ μεγάλου ποσοστού της ακτινοβολίας laser στον πυρήνα του κυττάρου , όπου βρίσκεται το DNA και η πιθανή ακτινοβολήση του θα προκαλούσε μεταλλάξεις (Muller-Stolzenburg, 1990, Seiler et al, 1988).

1.7.2) Ρυθμός Φωτοαποδόμησης

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες κατά την διαδικασία φωτοαποδόμησης είναι ο ρυθμός φωτοαποδόμησης του ιστού (ablation rate), ο οποίος ορίζεται ως το πάχος του ιστού που εκτέμνεται από ένα παλμό του laser με μονάδα μέτρησης μm/παλμό. Η ακριβής γνώση του ρυθμού φωτοαποδόμησης είναι απαραίτητος ώστε να είναι γνωστό το πάχος του ιστού που εκτέμνεται από συγκεκριμένο αριθμό παλμών laser. Αν και από θεωρητικής άποψης , η μέτρηση του ρυθμού φωτοαποδόμησης κάποιου υλικού αποτελεί μία απλή διαδικασία όπου το υλικό εκτίθεται σε παλμούς laser και εν συνεχεία μετράτε το βάθος εκτομής του υλικού και διαιρείται με τον αριθμό των παλμών, η δυσκολία έγκειται στην ακριβής μέτρηση του βάθους εκτομής. Στο τέλος του δευτέρου κεφαλαίου περιγράφονται μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί για την εύρεση του βάθους εκτομής και κατ' επέκταση του ρυθμού φωτοαποδόμησης.

Το μαθηματικό μοντέλο για την εύρεση του ρυθμού φωτοαποδόμησης βασίζεται στο νόμο απορρόφησης Beer-Lambert (βλέπε κεφάλαιο 2, παράγραφος 2.4.5). Υποστηρίζεται (Paltauf&Dyer ,2003, Pettit et al. 1993; Vogel et al. 2003) ότι ο κερατοειδικός ιστός απορροφά ακτινοβολία στα

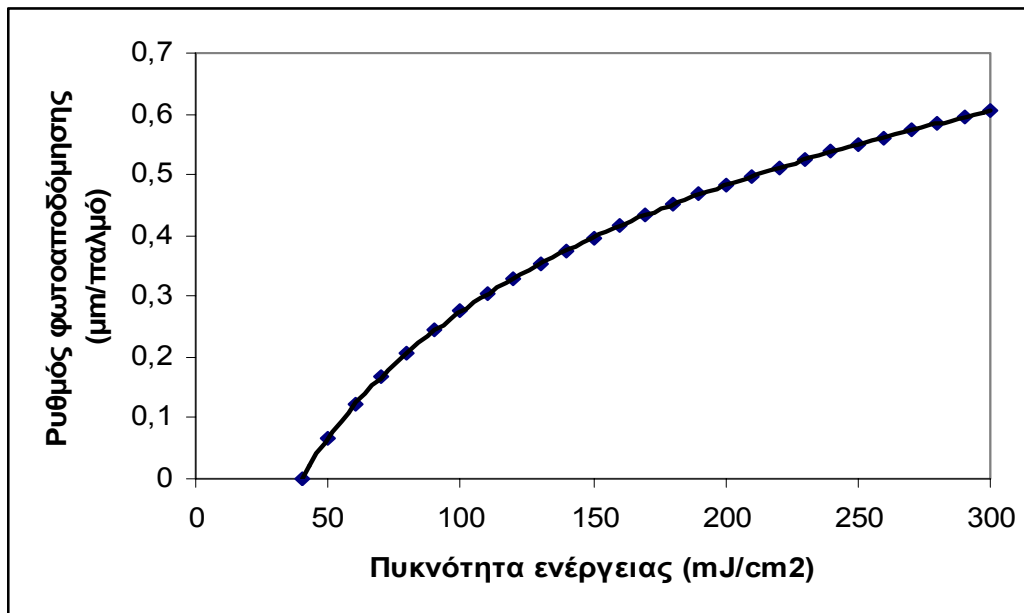
193nm βάση του νόμου Beer-Lambert, σύμφωνα με τον οποίο η ένταση του φωτός μειώνεται εκθετικά με το βάθος μέσα στον ιστό:

$$I(x) = I_0 e^{-ax} \quad : \text{ νόμος Beer- Lambert}$$

Όπου I_0 η ένταση του laser που προσπίπτει στην επιφάνεια του ιστού, $I(x)$ η ένταση της ακτινοβολίας laser μετά της διείσδυση σε βάθος x μέσα στον ιστό και a η σταθερά απορρόφησης του ιστού (σε cm^{-1}) για το συγκεκριμένο μήκος κύματος της ακτινοβολίας laser. Βέβαια ο παραπάνω νόμος αποτελεί μια προσέγγιση της συμπεριφοράς του ιστού για ακτινοβολία χαμηλής ισχύος, όπου η πυκνότητα ενέργειας είναι αρκετά χαμηλότερη από το κατώφλι φωτοαποδόμησης. Κάτω από συνθήκες φωτοαποδόμησης, μη γραμμικά οπτικά φαινόμενα αυξάνουν την τιμή της σταθεράς απορρόφησης, με αποτέλεσμα κάτω από αυτές τις συνθήκες να χρησιμοποιείται ο νόμος Beer- Lambert για μία προσέγγιση πρώτης τάξης του βάθους εκτομής. Θεωρείται ότι το βάθος εκτομής του ιστού από ένα παλμό ισούται με το βάθος του ιστού στο οποίο η ένταση της ακτινοβολίας έχει μειωθεί στην ένταση κατωφλίου που απαιτείται για την φωτοεκτομή. Συμβολίζοντας με I_{th} την ένταση κατωφλίου της φωτοεκτομής και με I_0 την ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, το θεωρητικό μοντέλο που προβλέπει το βάθος εκτομής ανά παλμό έχει την μορφή:

$$d_{\text{ablation}} = \frac{1}{a} \ln\left(\frac{I_0}{I_{th}}\right)$$

Συνηθίζεται στις περιπτώσεις φωτοεκτομής, αντί για την ένταση ακτινοβολίας να αναφέρεται ο όρος επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας (fluence) η οποία ισούται με την συνολική ενέργεια που εναποτίθεται κατά τη διάρκεια ενός παλμού στη μονάδα της επιφάνειας του ακτινοβολούμενου μέσου και εκφράζεται σε mJ/cm^2 . Στις εφαρμογές φωτοεκτομής του κερατοειδή οι πυκνότητες ενέργειας που χρησιμοποιούνται κυμαίνονται από 120 ως 250 mJ/cm^2 .



Εικόνα 19: Εξάρτηση του ρυθμού φωτοαποδόμησης από την επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας, σύμφωνα με την

σχέση : $d_{\text{ablation}} = \frac{1}{a} \ln\left(\frac{I_o}{I_{th}}\right)$

Οι τιμές του ρυθμού αποδόμησης που υπολογίζονται από την παραπάνω σχέση, επηρεάζονται από άλλες παραμέτρους που λαμβάνουν μέρος κατά την διαδικασία φωτοαποδόμησης όπως είναι η διάρκεια του παλμού, η κατανομή της έντασης κατά την εγκάρσια διατομή της κηλίδας, η παρουσία ροής αερίου η οποία απομακρύνει το νέφος των εκτινασόμενων σωματιδίων και ο ρυθμός επαναληπτικότητας (repetition rate) του laser. Η εύρεση της ακριβούς τιμής του βάθους φωτοεκτομής αποτελεί αντικείμενο αρκετών μελετών αν και ακόμη δεν έχουν βρεθεί ικανοποιητικά αποτελέσματα. Για τον λόγο αυτό οι επεμβάσεις διαθλαστικής χειρουργικής βασίζονται σε εμπειρικά δεδομένα όσο αφορά τον ρυθμό αποδόμησης. Οι κατανομές ακτινοβολίας που παράγονται από τα συστήματα laser κατά την διάρκεια μιας διαθλαστικής επέμβασης, βαθμονομούνται από σειρά προ-κλινικών δοκιμών, ενώ για την προεγχειρητική ρύθμιση της ενέργειας του παλμού προκειμένου να επιτευχθεί το επιθυμητό αποτέλεσμα πραγματοποιούνται κάθε φορά δοκιμαστικές φωτοεκτομές σε ειδικά δοκίμια. Ακόμη και με αυτή τη διαδικασία, προκειμένου να επιτευχθεί υψηλή ακρίβεια στις επεμβάσεις, χρησιμοποιούνται εξατομικευμένα νομογράμματα όπου λαμβάνονται υπόψη και άλλες παράμετροι όπως η ηλικία του ασθενή, η επιδιωκόμενη διόρθωση, η διάμετρος της ζώνης ακτινοβολίας, η ακτίνα καμπυλότητας του κερατοειδή, το πάχος του, ο χρόνος χρήσης των οπτικών στοιχείων του συστήματος μετάδοσης της δέσμης κ.α.

Ο βασικότερος παράγοντας που μπορεί να διαφοροποιήσει το ρυθμό φωτοαποδόμησης του κερατοειδή και δεν σχετίζεται με τις παραμέτρους του laser είναι η ενυδάτωση του κερατοειδή (Dougherty et al. 1994).

1.7.3) Ενυδάτωση του κερατοειδή

Όπως αναφέρθηκε η ενυδάτωση του κερατοειδή σχετίζεται με το βαθμό αποδόμησης του , με αποτέλεσμα να αποτελεί ένα παράγοντα πολύ σημαντικό κατά την διάρκεια της διαθλαστικής επέμβασης γιατί μπορεί να επιφέρει μη επιθυμητά αποτελέσματα κατά την διόρθωση των διαθλαστικών σφαλμάτων. Οι Lin et al. (1995) αναφέρουν ότι υγροί κερατοειδικοί ιστοί αποδομούνται λιγότερο από ότι οι στεγνοί. Μια παρατήρηση λογική , αν ληφθεί υπ' όψη ότι το νερό απορροφά πολύ λιγότερο υπεριώδη ακτινοβολία από ότι το κολλαγόνο με αποτέλεσμα , ιστός πλούσιος σε νερό να αποδομήται σε πολύ μικρότερο βαθμό από έναν ιστό σχετικά αφυδατωμένο. Έχει αναφερθεί (Dougherty et al. 1994, McDonald & Chitkara,1998) ότι αλλαγές στην ενυδάτωση του κερατοειδή μπορεί να επιφέρουν ένα σφάλμα της τάξης του 10-15% κατά την διόρθωση του διαθλαστικού σφάλματος. Πιο συγκεκριμένα αφυδατωμένος ιστός ο οποίος αποδομείται περισσότερο από το προβλεπόμενο, υπερδιορθώνεται, ενώ υπερενυδατωμένος ιστός λόγω της λιγότερης αποδόμησης από το επιθυμητό υποδιορθώνεται, με αποτέλεσμα και στις 2 περιπτώσεις ο ασθενής να μην έχει την καλύτερη δυνατή διόρθωση.

Κατά την διάρκεια της επέμβασης το πάχος του κερατοειδή μπορεί να αυξηθεί ακόμα και 50% λόγω διαφοροποιήσεων στο βαθμό ενυδάτωσης του. Αυτή η αύξηση του πάχους του κερατοειδούς κατά την διάρκεια της επέμβασης μπορεί να προκαλέσει προβλήματα, καθώς μετά το πέρας της επέμβασης και της αλλαγής της καμπυλότητας του κερατοειδούς , ο κερατοειδής επανέρχεται στο φυσιολογικό του πάχος λόγω της φυσιολογικής πλέον ενυδάτωσης αλλά το αποτέλεσμα από την αλλαγή της καμπυλότητας του, είναι αρκετά διαφορετικό από το προβλεπόμενο. Κατά την διάρκεια και προετοιμασία του κερατοειδούς για την επέμβαση, τοποθετούνται στον οφθαλμό θεραπευτικά παρασκευάσματα, πραγματοποιείται τομή στο στρώμα του κερατοειδούς και σε συνδυασμό με άλλες διαδικασίες προετοιμασίας του οφθαλμού για την ακτινοβολήση του , οδηγούν στην μεγάλη απορρόφηση ύδατος από τον κερατοειδικό ιστό, με αποτέλεσμα σημαντικές διαφοροποιήσεις στον βαθμό ενυδάτωσης και στο πάχος του κερατοειδούς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ανάγκη για διαφορετική αντιμετώπιση και ακτινοβολήση του κερατοειδή από αυτή που είχε αρχικά σχεδιαστεί, για την σωστή διόρθωση του διαθλαστικού σφάλματος. Για το λόγο αυτό κρίνεται αναγκαία η γνώση της ενυδάτωσης του κερατοειδούς κατά την διάρκεια της επέμβασης διαθλαστικής χειρουργικής.

1.7.4) Παράλληλες δράσεις κατά την φωτοαποδόμηση.

Η εκρηκτική φωτοαποδόμηση του κερατοειδή μπορεί να θεωρηθεί κατά βάση μία φωτοχημική διάσπαση των δομικών στοιχείων του κερατοειδή κατά την οποία αναπτύσσονται υψηλές πιέσεις οι οποίες απομακρύνουν τα προϊόντα της διάσπασης με υπερηχητικές ταχύτητες από την ακτινοβολούμενη επιφάνεια. Παράλληλα όμως, συνυπάρχουν φαινόμενα των οποίων ο ρόλος και οι πιθανοί κίνδυνοι που αντιπροσωπεύουν δεν ήταν από την αρχή κατανοητοί. Σήμερα,

αναγνωρίζεται ότι η φωτοεκτομή του κερατοειδή με excimer laser είναι μία ασφαλής μέθοδος για την αφαίρεση επιφανειακών στοιβάδων του κερατοειδή σε περίπτωση που αυτό είναι επιθυμητό. Παρακάτω αναπτύσσονται κάποια από τα side-effects που παρατηρούνται κατά την διάρκεια της εκρηκτικής φωτοαποδόμησης.

I) Θερμική δράση.

Όπως προαναφέρθηκε η φωτοαποδόμηση του κερατοειδή οφείλεται στην μεγάλη ενέργεια των φωτονίων στα 193 nm (6.4 eV), η οποία είναι αρκετή για την διάσπαση των μοριακών δεσμών (τυπική ενέργεια 3.4 eV) με αποτέλεσμα να προκαλείται φωτοχημική διάσπαση των ινών του κολλαγόνου. Υπάρχει όμως και περίσσεια ενέργειας η οποία μετατρέπεται σε κινητική ενέργεια των εκπεμπόμενων σωματιδίων για την απομάκρυνση τους από την επιφάνεια του ιστού, καθώς και σε θερμότητα .

Ακόμη μέρος της ενέργειας του παλμού απορροφάται από στοιβάδες παρακείμενες σε αυτές που εκτέμνονται. Η πυκνότητα ενέργειας στην οποία εκτίθενται οι στιβάδες αυτές είναι χαμηλότερη από το κατώφλι φωτοεκτομής με αποτέλεσμα να θερμαίνονται άμεσα μέσω της απορρόφησης ενέργειας κάτω από το κατώφλι φωτοεκτομής και έμμεσα μέσω εναπόθεσης ενέργειας από τα θραύσματα.

Στο φαινόμενο αυτό αποδίδεται η αύξηση της θερμοκρασίας της ελεύθερης επιφάνειας του κερατοειδή κατά περίπου 8°C . Η τιμή της αύξησης της θερμοκρασίας της επιφάνειας του κερατοειδή κυμαίνεται ,και η τιμή αυτή φαίνεται να εξαρτάται από το ρυθμό επαναληπτικότητας και από την πυκνότητα ενέργειας του laser, ενώ είναι σημαντικό κατά την φωτοεκτομή του κερατοειδή να καθορίζονται οι παράμετροι αυτοί έτσι ώστε η αύξηση της θερμοκρασίας να μην ξεπερνά τους 11°C .

Για την αντιμετώπιση αυτού του φαινομένου στα σύγχρονα συστήματα laser, η σάρωση της δέσμης του laser στην επιφάνεια του κερατοειδή πραγματοποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε πρακτικά κανένα σημείο του κερατοειδή να μην εκτίθεται σε πολλούς διαδοχικούς παλμούς. Με αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται ουσιαστικά κάθε σημείο της επιφάνειας να προλαβαίνει να ψύχεται μεταξύ των παλμών που είναι προγραμματισμένο να δεχθεί, και η αύξηση της θερμοκρασίας να είναι πολύ μικρή - πρακτικά μη μετρήσιμη. Σε κάποιες περιπτώσεις μάλιστα όπου η σάρωση πραγματοποιήθηκε μέσω ψευδο-τυχαιοποιημένης σειράς εναπόθεσης των παλμών, η αύξηση της θερμοκρασίας ήταν τόσο μικρή που αντισταθμιζόταν πλήρως από την ψύξη του κερατοειδή λόγω της εξάτμισης της επιφανειακής υγρασίας με αποτέλεσμα να αναφερθεί μείωση της επιφανειακής θερμοκρασίας του κερατοειδή κατά τη διάρκεια της φωτοεκτομής.

II) Φθορισμός

Κατά την ακτινοβόληση του κερατοειδή με ακτινοβολία στα 193nm, στην οποία ο κερατοειδής εμφανίζει πολύ υψηλή απορροφητικότητα, έχει παρατηρηθεί η παραγωγή ακτινοβολίας φθορισμού σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Αυτή η δευτερογενής ακτινοβολία εισχωρεί σε κύτταρα και ιστό, σε πολύ μεγαλύτερο βαθμό από την απευθείας ακτινοβολία του ArF. Έχουν πραγματοποιηθεί πολλές έρευνες για να μελετηθεί η πιθανότητα η δευτερογενής αυτή ακτινοβολία να προκαλεί αλλαγές στο DNA, όπου παρατηρήθηκαν βλάβες σε πολύ μικρό βαθμό με αποτέλεσμα, η φωτοεκτομή με ArF να θεωρείται ασφαλής επέμβαση όσο αφορά την δημιουργία μεταλλάξεων.

Από πειράματα που πραγματοποιήθηκαν σε καλλιέργειες ζυμομυκήτων οι οποίες ακτινοβολήθηκαν με excimer laser με δόσεις αντίστοιχες με αυτές που χρησιμοποιούνται σε μία τυπική επέμβαση διόρθωσης μυωπίας, παρατηρήθηκε ενζυματική δραστηριότητα επιδιόρθωσης του DNA σε αποστάσεις ακόμη και 2cm από το σημείο ακτινοβόλησης. Με βάση αυτή την παρατήρηση το σκληροκερατοειδικό όριο στο οποίο πραγματοποιείται ο πολλαπλασιασμός των επιθηλιακών κυττάρων και είναι πιθανό σημείο εμφάνισης επιθηλιακής νεοπλασίας, βρίσκεται εντός της ζώνης επίδρασης του κάθε παλμού του laser που χρησιμοποιείται για την ακτινοβόληση του κερατοειδή. Παράλληλα, δευτερογενής ακτινοβολία στην περιοχή μεταξύ 295 και 320nm η οποία έχει συνδεθεί με καταρρακτογένεση, έχει μετρηθεί να διαδίδεται μέσω του κερατοειδή και του υδατοειδούς υγρού μέχρι τον κρυσταλλοειδή φακό σε οφθαλμούς πειραματόζωων. Ο ρόλος της δευτερογενούς ακτινοβολίας στη διαδικασία επούλωσης και οι πιθανοί κίνδυνοι από αυτήν, δεν έχουν μέχρι σήμερα καθοριστεί επακριβώς.

III) Ακουστικά κύματα.

Κατά την διαδικασία εκρηκτικής φωτοαποδόμησης, έχει παρατηρηθεί η παραγωγή ακουστικών κυμάτων που διαδίδονται στο στρώμα του κερατοειδή, τα οποία διαδίδονται με ταχύτητα περίπου 1630 m/sec, ενώ το πλάτος των ακουστικών κυμάτων βρέθηκε να κυμαίνεται από 80 έως 150 bar όταν η επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας μεταβλήθηκε από 200 ως 500 mJ/cm². Τα ακουστικά κύματα που συνοδεύουν τη φωτοεκτομή υποβάλουν τον κερατοειδή σε μηχανική καταπόνηση, η οποία μπορεί να οδηγήσει σε κυτταρικές αλλοιώσεις και σε δομικές βλάβες του κολλαγόνου με αποτέλεσμα τη μετεγχειρητική επουλωτική δραστηριότητα των κερατοκυττάρων και συνεπώς σχηματισμό ουλώδους ιστού, με επακόλουθη απώλεια της διαύγειας του κερατοειδή.

1.8) Διαθλαστική χειρουργική

Η διαθλαστική χειρουργική, αποτελεί ένα τύπο επέμβασης πάνω στον οφθαλμό που στόχος της είναι να διορθώσει την διοπτρική ισχύ του οφθαλμού ώστε να μην κρίνεται πλέον απαραίτητη η χρήση γυαλιών ή φακών επαφής. Τα τελευταία χρόνια ο τομέας αυτός εξαπλώθηκε στην διόρθωση ποικίλων διαθλαστικών σφαλμάτων , όπως τη μυωπία, την υπερμετρωπία, τον αστιγματισμό και την πρεσβυωπία. Η πρόσφατη αύξηση του αριθμού επεμβάσεων διαθλαστικής χειρουργικής σχετίζεται άμεσα με την επιτυχία τους στην αποτελεσματική και προβλέψιμη βελτιστοποίηση της όρασης χωρίς σοβαρών side effects.

1.8.1) Ιστορική αναδρομή διαθλαστικής χειρουργικής

Η ιδέα ότι είναι δυνατή η αλλαγή της διοπτρικής ισχύς του οφθαλμού για την διόρθωση των διαθλαστικών σφαλμάτων βρίσκει τις ρίζες στα τέλη του 19^{ου} αιώνα. Ο δρ. Lans , Ολλανδός καθηγητής οφθαλμολογίας ανέπτυξε τις βασικές αρχές της οφθαλμολογίας περίπου στο 1898. λίγο αργότερα, στην Ιαπωνία στην δεκαετία του 1930, ο Sato πραγματοποίησε πρωτοποριακή έρευνα πάνω στις κερατοειδικές τομές. Πραγματοποίησε τομές στο ενδοθήλιο του κερατοειδή καθώς και στο επιθήλιο αλλά αυτή η τεχνική δεν είχε τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Ο Ρώσος Fyodorov παρατήρησε σε μία περίπτωση οφθαλμικού τραύματος το 1970 ότι η διαθλαστική χειρουργική μπορούσε να έχει πρακτικές εφαρμογές μέσω της ακτινικής κερατεκτομής. Ο Fyodorov παρακολουθούσε ένα αγόρι του οποίου τα γυαλιά είχαν σπάσει δημιουργώντας του κερατοειδικές τομές. Μετά από την αποκατάσταση του τραύματος , το διαθλαστικό σφάλμα του ασθενή ήταν σημαντικά μικρότερο από ότι πριν από την εγχείρηση. Αυτή η παρατήρηση ώθησε τον Fyodorov να ερευνήσει τον τομέα της διαθλαστικής χειρουργικής και τις προσπάθειες που είχαν πραγματοποιηθεί μέχρι τότε. Αυτός δούλεψε πάνω σε μία φόρμουλα η οποία έκανε την διαδικασία πιο προβλέψιμη από ότι ήταν ποτέ. Στο 1978 Αμερικάνοι οφθαλμίατροι έδειξαν ενδιαφέρον για αυτά τα ευρήματα.

Ο δρ. Leo Bores ήταν ο πρώτος που έφερε αυτή την τεχνολογία στις Ηνωμένες Πολιτείες μετά από την επίσκεψη του στον Fyodorov στην Σοβιετική Ένωση. Μετά από την εισαγωγή της, η ακτινική κερατεκτομή εφαρμόστηκε σε πάνω από 2 εκατομμύρια ασθενής μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες. Ορισμένοι περιορισμοί στην ακτινική κερατεκτομή ώθησαν στην έρευνα για εναλλακτικές μορφές διαθλαστικής χειρουργικής.

Δουλεύοντας στα ερευνητικά εργαστήρια της IBM , ο Srinivasan διέκρινε τις δυνατότητες του excimer laser κατά την αλληλεπίδραση του με βιολογικούς ιστούς. Ο Steven Trokel ,οφθαλμίατρος , έκανε τον συσχετισμό του excimer laser με τον κερατοειδή. Αυτό το μηχάνημα

laser εκπέμπει δέσμη laser η οποία κατά την αλληλεπίδραση της με τον κερατοειδικό ιστό, σπάει τους δεσμούς άνθρακα μεταξύ των μορίων προκαλώντας εκτομή του ιστού.

Το excimer laser έχει διεθνή αναγνωσιμότητα για ασφάλεια και αποτελεσματικότητα από το 1987. Ο πρώτος ασθενής που υποστεί φωτοδιαθλαστική κερατεκτομή ήταν στην Γερμανία το 1988. Από τον Νοέμβριο του 1994 υπολογίζεται ότι πάνω από 1 εκατομμύριο εγχειρήσεις PRK πραγματοποιήθηκαν σε 40 χώρες στον κόσμο, με τον αριθμό των περιπτώσεων να αυξάνει εκθετικά στην Ευρώπη και την ανατολική Ασία. Έπειτα από μια σειρά κλινικών ερευνών η FDA ενέκρινε την χρήση του laser για την διόρθωση της μυωπίας με PRK το 1995.

Η τεχνική LASIK αρχικά εισάχθηκε το 1989 από τον Ι. Παλλήκαρη, ο οποίος χρησιμοποίησε το excimer laser για να επέμβει στο υποκείμενο στρώμα κάτω από ένα κερατοειδικό κρημνό τον οποίο είχε δημιουργήσει με ένα μικροκεράτομο, ενώ ένα χρόνο αργότερα ο Buratto στην Ιταλία χρησιμοποίησε την ίδια τεχνική με επιτυχία επεμβαίνοντας στην κατώτερη πλευρά του κερατοειδικού κρημνού. Η επέμβαση με LASIK έγινε ιδιαίτερα διάσημη διεθνώς λόγω της μεγάλης της προβλεψιμότητας και την έλλειψη πόνου. Το 1999 η τεχνική LASIK εγκρίθηκε από την FDA, και από τότε εκτιμάται ότι με αυτή την τεχνική πραγματοποιείται το 98% περίπου των επεμβάσεων διαθλαστικής σε παγκόσμιο επίπεδο.

Σήμερα, οι επεμβάσεις διαθλαστικής χειρουργικής εγγυώνται πλήρη διόρθωση των διαθλαστικών σφαλμάτων και κερδίζουν μέρα με την μέρα όλο και περισσότερο την εκτίμηση του ευρύ κοινού.

1.8.2) Διαθλαστικές επεμβάσεις

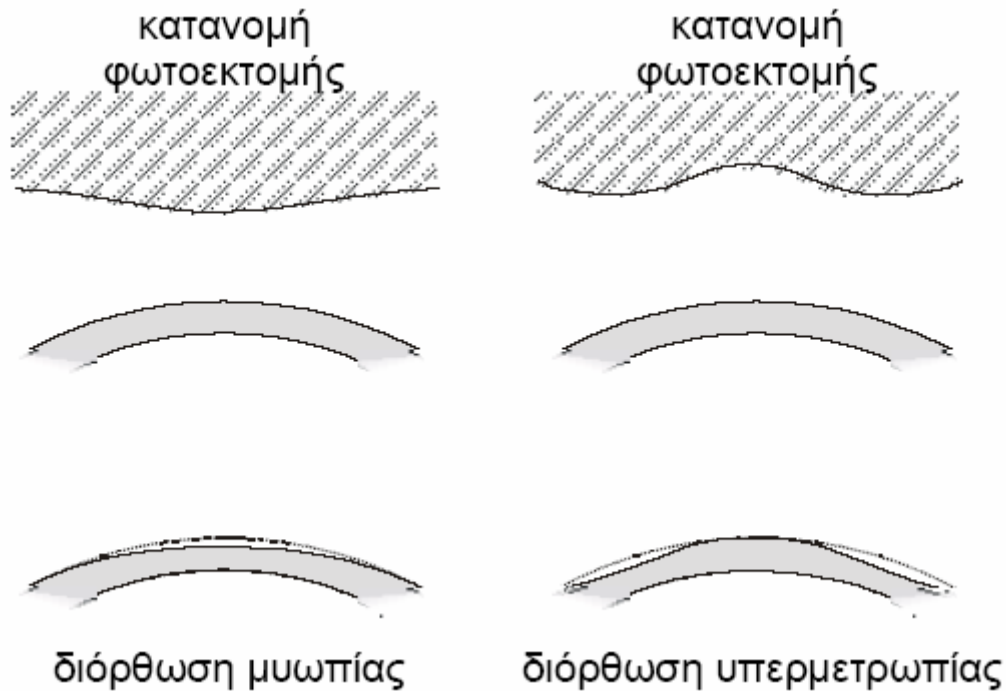
Το 80% της διοπτρικής ισχύος του οφθαλμού προέρχεται από τον κερατοειδή, ο οποίος μαζί με την δακρυϊκή στοιβάδα αποτελεί την κύριο διαθλαστικό μέσο του οφθαλμού. Μια μικρή αλλαγή στην καμπυλότητα του κερατοειδή μπορεί να προκαλέσει τεράστια αλλαγή στην συνολική διοπτρική ισχύ του οφθαλμού. Αυτή είναι και η βασική ισχύ στη οποία στηρίζεται η διαθλαστική χειρουργική. Η σχέση που συνδέει την διαθλαστική διόρθωση (σε διοπτρίες) του οφθαλμού με την αλλαγή στην καμπυλότητα του κερατοειδή, δίνεται από τον παρακάτω τύπο:

$$\Delta D = -D \left(\frac{\Delta r}{r} \right)$$

Όπου r , η ακτίνα καμπυλότητας του κερατοειδή πριν τη διόρθωση, Δr , η συνολική αλλαγή της ακτίνας καμπυλότητας μετά από την διαθλαστική χειρουργική, D η διοπτρική ισχύς του κερατοειδή πριν την διόρθωση και ΔD η συνολική διαθλαστική διόρθωση του οφθαλμού σε διοπτρίες (Ren et al. 1995).

Όπως έχει βρεθεί από μελέτες το βάθος εκτομής που προκαλεί ο κάθε παλμός του ArF excimer laser επιφέρει τη δημιουργία ενός κρατήρα στην επιφάνεια του κερατοειδή με βάθος της τάξης των 0.3 μm και διατομή αντίστοιχη της διατομής της δέσμης που τον προκάλεσε. Με την κατάλληλη υπέρθεση ενός αριθμού τέτοιων κρατήρων μπορεί να οδηγήσει σε μία κατανομή

φωτοεκτομής η οποία να εκτείνεται σε μεγάλο τμήμα της πρόσθιας επιφάνειας του κερατοειδή και να οδηγήσει σε αλλαγή της καμπυλότητας του, η οποία είναι επιθυμητή για την διάθλαση του διαθλαστικού σφάλματος. Ειδικότερα, για την διόρθωση μυωπίας απαιτείται αύξηση της ακτίνας καμπυλότητας του κερατοειδή, η οποία επιτυγχάνεται με επιπέδωση της πρόσθιας επιφάνειας του κερατοειδή, ενώ για την διόρθωση της υπερμετρωπίας απαιτείται μείωση της ακτίνας καμπυλότητας του κερατοειδή η οποία επιτυγχάνεται με επέμβαση στην περιφέρεια του κερατοειδή. Παρακάτω, φαίνονται οι κατανομές φωτοεκτομής που χρησιμοποιούνται για την διόρθωση των δύο συνηθέστερων διαθλαστικών σφαλμάτων.



Εικόνα 20: Κατανομές φωτοεκτομής που οδηγούν σε αλλαγή της καμπυλότητας του κερατοειδή.

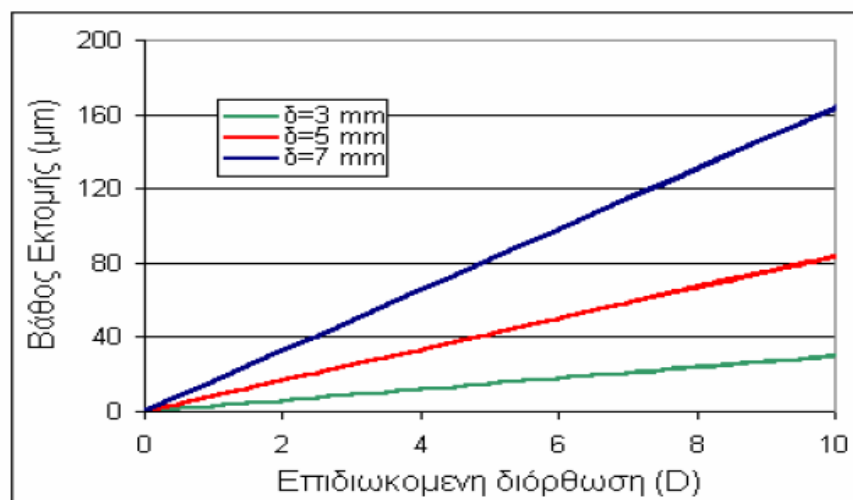
Το απαιτούμενο βάθος εκτομής στο κέντρο του κερατοειδή είναι ανάλογο της διαμέτρου της ζώνης επέμβασης καθώς και του διαθλαστικού σφάλματος. Επομένως η συνολική έκθεση του κερατοειδή στην ακτινοβολία laser μπορεί να μειωθεί με την ελαχιστοποίηση της ζώνης επέμβασης. Όμως η ζώνη πάνω στην οποία πραγματοποιείται η επέμβαση πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη, ώστε σε συνθήκες χαμηλού φωτισμού, η διορθωμένη περιοχή να καλύπτει την διάμετρο της κόρης που μεγαλώνει, ώστε να μην εμφανίζονται προβλήματα και ενοχλήσεις κατά την νυχτερινή όραση (Gatinel et. al. 2002).

Το κεντρικό βάθος εκτομής για την διόρθωση διαθλαστικού σφάλματος προσεγγίζεται από την παρακάτω σχέση:

$$KB = \frac{\Delta\Phi}{3} \delta^2 \quad : \text{ τύπος Munnerlyn}$$

όπου KB το κεντρικό βάθος σε μm , $\Delta\Phi$ η επιθυμητή αλλαγή της διαθλαστικής ισχύος του κερατοειδή σε διοπτρίες, και δ η διάμετρος της ζώνης φωτοεκτομής σε mm .

Για την επιλογή της διαμέτρου της ζώνης φωτοεκτομής στην οποία θα πραγματοποιηθεί η διόρθωση πρέπει να συναξιολογηθούν η μέγιστη διάμετρος της κόρης του οφθαλμού που διορθώνεται, η επιδιωκόμενη διόρθωση και το διαθέσιμο πάχος του κερατοειδή. Καθώς είναι επιθυμητό να μην προκληθεί άσκοπη εκτομή κερατοειδικού ιστού, οι παράμετροι αυτοί σταθμίζονται κατά τη φάση του σχεδιασμού της επέμβασης. Στην επόμενη γραφική παράσταση καθίσταται φανερό ότι για τη διόρθωση υψηλής μυωπίας το απαιτούμενο πάχος του κερατοειδή που πρέπει να αφαιρεθεί από το κέντρο της οπτικής ζώνης είναι πολύ υψηλό στην περίπτωση που η διόρθωση επιχειρηθεί σε μεγάλη διάμετρο. Αυτό είναι επιθυμητό να αποφευχθεί εκτός και εάν η διάμετρος της κόρης του ασθενή είναι αντίστοιχα μεγάλη σε σκοτοπικές συνθήκες.



Εικόνα 21: Γραφική παράσταση της εξίσωσης του Munnerlyn, για τρεις διαφορετικές διαμέτρους της ζώνης φωτοεκτομής.

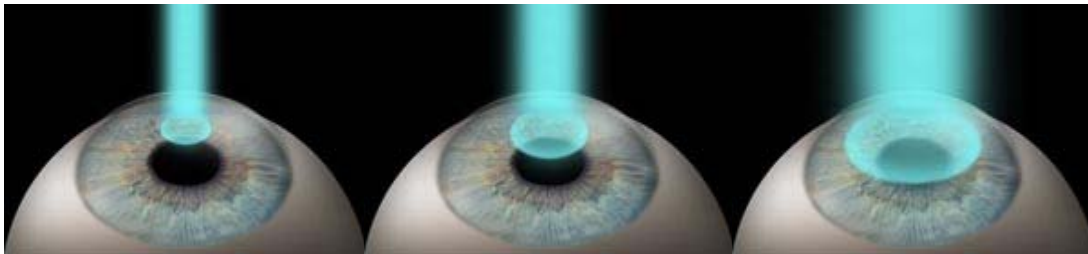
Τα συστήματα laser διαθλαστικής χειρουργικής πέραν της κοιλότητας ArF, περιλαμβάνουν κατάλληλο οπτικό σύστημα το οποίο κατευθύνει τη δέσμη στον κερατοειδή προκειμένου να παραχθεί η επιθυμητή κατανομή φωτοεκτομής. Επίσης, περιλαμβάνουν ένα σύνολο από υποσυστήματα, ελέγχου της ευθυγράμμισης (eye tracking), ελέγχου εστίασης, μέτρησης της αποδιδόμενης ενέργειας / παλμό, και αυτοελέγχου της λειτουργίας τους. Τη λειτουργία του όλου συστήματος διαχειρίζεται ένας ηλεκτρονικός υπολογιστής στον οποίο γίνεται και προεγχειρητικά ο υπολογισμός της κατανομής των παλμών που θα επιφέρουν την επιθυμητή διόρθωση. Οι κατανομές αυτές μπορούν να είναι εκ περιστροφής συμμετρικές (τμήματα σφαίρας ή επιμήκους ελλειψοειδούς) για τη διόρθωση μυωπίας και υπερμετρωπίας, τορικού σχήματος για την ταυτόχρονη διόρθωση αστιγματισμού και αυθαίρετες για τη διόρθωση γεωμετρικών ανωμαλιών της επιφάνειας του κερατοειδή .

Η αλλαγή της καμπυλότητας του κερατοειδή προκειμένου να είναι μόνιμη, πρέπει να πραγματοποιηθεί στο στρώμα του κερατοειδή. Παρακάτω περιγράφονται 3 από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές διόρθωσης του διαθλαστικού σφάλματος.

I) PRK (Photorefractive Keratectomy)

Επιφανειακή Φωτοδιαθλαστική Κερατεκτομή

Μία από τις πιο διαδεδομένες διαθλαστικές επεμβάσεις είναι η PRK, κατά την οποία το επιθήλιο αφαιρείται μηχανικά με απόξεση και στη συνέχεια υπόκειται σε φωτοεκτομή η στοιβάδα του Bowman και το στρώμα του κερατοειδή με την βοήθεια του excimer laser με απώτερο στόχο την διόρθωση του διαθλαστικού σφάλματος. Μετά το πέρας της επέμβασης τοποθετείται στον οφθαλμό μαλακός φακός επαφής για κάποιες εβδομάδες μέχρι την πλήρη επαναεπιθηλιοποίηση του κερατοειδούς. Η τεχνική PRK χρησιμοποιείται για την διόρθωση της μυωπίας, της υπερμετρωπίας και του αστιγματισμού και είναι η τεχνική που προτιμάται για την διόρθωση χαμηλών διαθλαστικών σφαλμάτων.

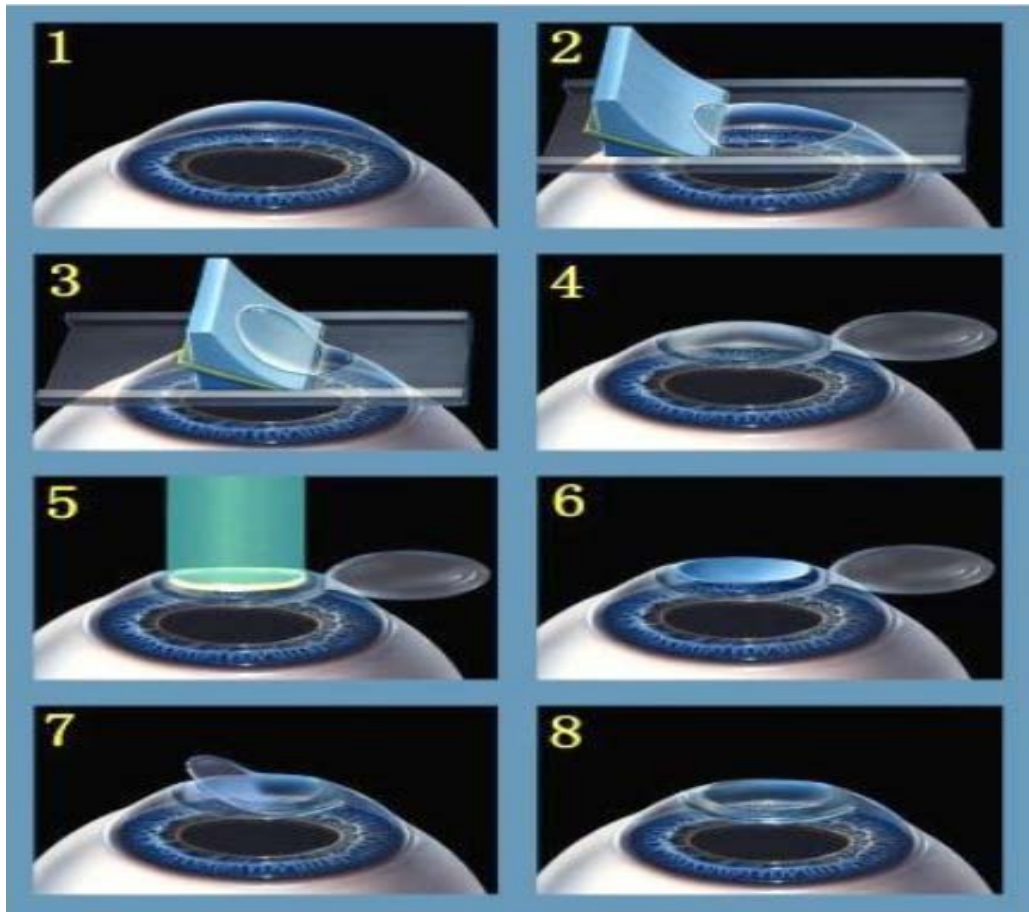


Εικόνα 22: Τεχνική PRK
<http://www.eyemdlink.com/EyeProcedure.asp?EyeProcedureID=7>

Πιθανές επιπλοκές περιλαμβάνουν μετεγχειρητικό θάμπωμα, δημιουργία φωτοστέφανων γύρω από φωτεινά αντικείμενα και μόλυνση του κερατοειδούς με το χάσιμο της best corrected οπτικής οξύτητας. Παρόλα αυτά το ποσοστό των επιπλοκών είναι εξαιρετικά μικρό.

II) LASIK (Laser In Situ Keratomileusis)

Η διαφορά της τεχνικής LASIK από την PRK έγκειται στον τρόπο απομάκρυνσης του επιθηλίου. Ενώ στην PRK πραγματοποιείται απόξεση του επιθηλίου με αποτέλεσμα τον μετεγχειρητικό πόνο, στην τεχνική LASIK πραγματοποιείται τομή στο επιθήλιο με ένα εργαλείο που ονομάζεται μικροκερατόμος, και δημιουργείται κερατοειδικός κρημνός πάχους περίπου 140 μm. Σκοπός της δημιουργίας του κερατοειδικού κρημνού είναι η διατήρηση των επιφανειακών επιθηλιακών κυττάρων με αποτέλεσμα την γρηγορότερη επούλωση του τραύματος και αποκατάσταση της όρασης. Ο κερατοειδικός κρημνός ανασηκώνεται ώστε να αφήνεται εκτεθειμένο το στρώμα στην κατανομή φωτοεκτομής και στην συνέχεια επανατοποθετείται πάνω στο στρώμα του κερατοειδή



Εικόνα 23: Τεχνική LASIK

Δύο είναι η πιθανές επιπλοκές που μπορεί να προκύψουν από την τεχνική LASIK. Λόγω της διαφορετικής ανταπόκρισης και επούλωσης του τραύματος στους ασθενείς μπορεί να παρατηρηθεί κάποιο μικρό ποσοστό υπερδιόρθωσης ή υποδιόρθωσης. Επίσης μπορεί να παρατηρηθούν κάποιες επιπλοκές λόγω δυσλειτουργίας του μικροκερατόμου.

III) LASEK (Laser Epithelial Keratomileusis)

Επιθηλιακή κερατεκτομή

Η τεχνική LASEK αποτελεί μια εναλλακτική εκδοχή της LASIK. Στην LASEK τοποθετείται στην εξωτερική επιφάνεια του κερατοειδή ένα διάλυμα ιωδίου ώστε να χαλαρώσει τις άκρες του επιθηλίου, επιτρέποντας έτσι στον χειρουργό να δημιουργήσει ένα επιθηλιακό κρημό και την εκτομή στην συνέχεια του παρακείμενου ιστού. Το πλεονέκτημα της LASEK είναι η έλλειψη επιπλοκών που προκύπτουν από την χρήση του μικροκερατόμου και η ικανότητα πραγματοποίησης διαθλαστικής χειρουργικής σε ασθενείς με σχετικά λεπτούς κερατοειδείς οι οποίοι υπό φυσιολογικές συνθήκες δε θα μπορούσαν να υποστούν σε διαθλαστική χειρουργική.

IV) ΡΤΚ (Φωτοθεραπευτική Κερατεκτομή)

Το excimer laser, εκτός από τις επεμβάσεις διαθλαστικής χειρουργικής χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση ενός πλήθους επιφανειακών κερατοειδικών ανωμαλιών. Η επέμβαση αυτή ονομάζεται θεραπευτική κερατεκτομή ή εν συντομία ΡΤΚ. Η τεχνική ΡΤΚ μπορεί να χρησιμοποιηθεί είτε μόνη της, είτε συμπληρωματικά σε παραδοσιακές κερατοειδικές χειρουργικές τεχνικές, για την επιτυχή αντιμετώπιση ενός πλήθους διαταραχών που επηρεάζουν την επιφάνεια του κερατοειδή, λόγω της ικανότητας ακριβούς αφαίρεσης επιφανειακού κερατοειδικού ιστού από το excimer laser. Τα προβλήματα που μπορούν να αντιμετωπιστούν με την τεχνική ΡΤΚ περιλαμβάνουν ένα πλήθος κερατοειδικών εκφυλισμών και δυστροφιών, κερατοειδικές ανωμαλίες και επιφανειακές ουλές. Αν και κάποια από τα παραπάνω προβλήματα, μπορούν να αντιμετωπιστούν με τεχνικές μηχανικών επιφανειακών κερατεκτομών, η τεχνική ΡΤΚ υπερτερεί γιατί ελαχιστοποιεί το ποσό του αφαιρούμενου ιστού και το χειρουργικό τραύμα. Η ομαλοποιημένη επιφάνεια του κερατοειδή, που επιτυγχάνεται με την χρήση του excimer laser, βελτιώνει την μετεγχειρητική κερατοειδική διαύγεια, μειώνει τον χρόνο επούλωσης και διευκολύνει την επούλωση του επιθηλίου. Ακόμη με την τεχνική ΡΤΚ μπορούν να αντιμετωπιστούν επιτυχώς περιπτώσεις που διαφορετικά θα απαιτούσαν μεταμόσχευση του κερατοειδούς.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

Βασικές αρχές φασματοσκοπίας φθορισμού

2.1) Γενικά περί φασματοσκοπίας

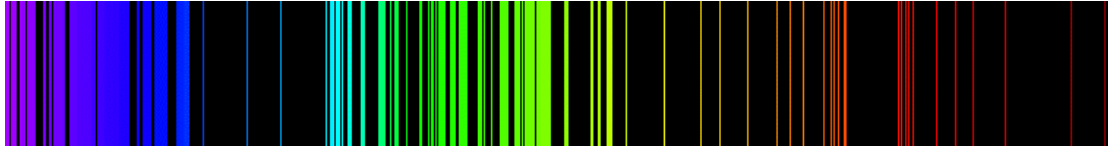
Η επιστήμη της φασματοσκοπίας χρησιμοποιεί τις ιδιότητες της απορρόφησης, εκπομπής ή σκέδασης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας από τα άτομα ή τα μόρια (ή αντίστοιχα τα ατομικά ή μοριακά ιόντα) για την ποιοτική ή ποσοτική μελέτη των ατόμων ή των μορίων. Η αλληλεπίδραση της ακτινοβολίας με την ύλη προκαλεί ανακατεύθυνση της ακτινοβολίας και/ή μεταβάσεις ανάμεσα στα ενεργειακά επίπεδα των ατόμων ή των μορίων. Η μετάβαση από ένα χαμηλότερο σε ένα υψηλότερο ενεργειακό επίπεδο με την μεταφορά ενέργειας από την προσπίπτουσα ακτινοβολία στο άτομο ή το μόριο ονομάζεται απορρόφηση. Η μετάβαση από ένα υψηλότερο ενεργειακό επίπεδο σε ένα χαμηλότερο ονομάζεται εκπομπή, αν παρατηρείται εκπομπή ακτινοβολίας ή μη ακτινοβολίζουσα απόπτωση αν δεν εκπέμπεται ακτινοβολία. Η ανακατεύθυνση του φωτός λόγω της αλληλεπίδρασης του με την ύλη ονομάζεται σκέδαση, και συνοδεύεται με ή χωρίς την μεταφορά ενέργειας. Για παράδειγμα η σκεδαζόμενη ακτινοβολία είναι του ίδιου ή ελαφρά διαφορετικού μήκους κύματος από την προσπίπτουσα.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η φασματοσκοπία βασίζεται σε 3 κυρίως φυσικούς μηχανισμούς: την απορρόφηση, την εκπομπή και την σκέδαση. Οι μηχανισμοί αυτοί αναλύονται παρακάτω:

Απορρόφηση: όταν τα άτομα ή τα μόρια απορροφούν φως, η εισερχόμενη ενέργεια διεγείρει μία κβαντική δομή σε ένα υψηλότερο ενεργειακό επίπεδο. Το είδος της διέγερσης βασίζεται στο μήκος κύματος του φωτός. Τα ηλεκτρόνια προωθούνται σε υψηλότερες τροχιές με υπεριώδες ή ορατό φως, οι δονήσεις διεγείρονται από το υπέρυθρο φως, ενώ οι περιστροφές διεγείρονται από τα μικροκύματα. Το φάσμα απορρόφησης αναπαριστά την απορρόφηση του φωτός συναρτήσει του μήκους κύματος. Το φάσμα ενός ατόμου ή μορίου εξαρτάται από την δομή των ενεργειακών του επιπέδων και για το λόγο αυτό τα φάσματα απορρόφησης είναι χρήσιμα στην αναγνώριση των στοιχείων από τα οποία αποτελούνται διάφορα μείγματα. Με την χρήση του νόμου Beer Lambert είναι δυνατός ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης των στοιχείων που απορροφούν σε ένα δείγμα.

Εκπομπή: τα άτομα ή τα μόρια που διεγείρονται σε υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα, στην συνέχεια αποδιαγείρονται με την ταυτόχρονη εκπομπή ακτινοβολίας (εκπομπή ή φωταύγεια). Για τα άτομα που διεγείρονται από μια πηγή ενέργειας υψηλής θερμοκρασίας, η εκπομπή φωτός ονομάζεται ατομική ή οπτική εκπομπή, ενώ στην περίπτωση που τα άτομα διεγείρονται με φως ονομάζεται ατομικός φθορισμός. Για τα μόρια ονομάζεται φθορισμός, αν η μετάβαση

πραγματοποιείται ανάμεσα στις καταστάσεις ίδιου spin και φωσφορισμός αν η μετάβαση πραγματοποιείται μεταξύ καταστάσεων διαφορετικού spin. Η ένταση εκπομπής είναι γραμμικά ανάλογη της συγκέντρωσης της ουσίας που εκπέμπει και είναι χρήσιμη για την ποσοτικοποίηση των στοιχείων που εκπέμπουν ακτινοβολία.



Εικόνα 24: Φάσμα εκπομπής του σιδήρου

Σκέδαση: όταν η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διέρχεται μέσω της ύλης, το μεγαλύτερο μέρος της ακτινοβολίας συνεχίζει στην αρχική του κατεύθυνση αλλά ένα μικρό κλάσμα σκεδάζεται προς άλλες κατευθύνσεις. Η φασματοσκοπία σκέδασης διαφέρει από την φασματοσκοπία εκπομπής λόγω του ότι η διαδικασία σκέδασης είναι πολύ πιο γρήγορη διαδικασία από ότι η εκπομπή ή η απορρόφηση. Μία από τις χρησιμότερες εφαρμογές της φασματοσκοπία σκέδασης είναι η φασματοσκοπία Raman.

2.2) Φωταύγεια

Με τον γενικότερο όρο φωταύγεια περιγράφεται το φαινόμενο κατά το οποίο ένα σώμα εκπέμπει ακτινοβολία χωρίς να θερμαίνεται ισχυρά. Κατά το φαινόμενο της φωταύγειας ένα μόριο ανεβαίνει σε μία ηλεκτρονικά διεγερμένη στάθμη με την απορρόφηση υπεριώδους, ορατής ή κοντινής υπέρυθρης ακτινοβολίας. Το διεγερμένο μόριο στην συνέχεια αποδιαγείρεται στην θεμελιώδη του κατάσταση ή σε μία χαμηλότερη ηλεκτρονικά διεγερμένη στάθμη, με την εκπομπή φωτός. Υπάρχουν διάφορα είδη φωταύγειας όπως ο φθορισμός, ο φωσφορισμός, χημιφωταύγεια, βιοφωταύγεια, ηλεκτροφωταύγεια κλπ.

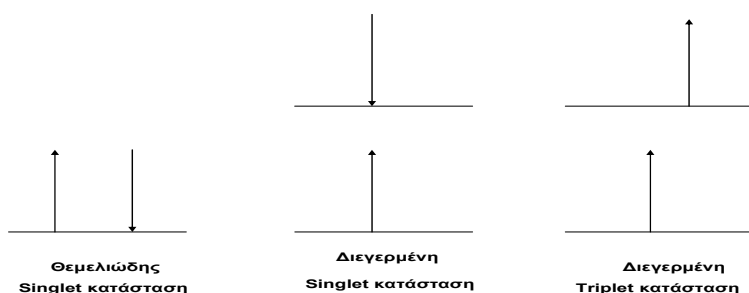
2.2.1) Φθορισμός

Ειδικότερα ως φθορισμός, ορίζεται η εκπομπή φωτός, η οποία προκαλείται από την ακτινοβόληση ενός δείγματος με φως. Το φως που προσπίπτει στο δείγμα προωθεί τα άτομα, τα ιόντα ή τα μόρια του δείγματος σε διεγερμένες στάθμες (λόγω της απορρόφησης των φωτονίων), από τις οποίες επανέρχονται στις θεμελιώδεις τους καταστάσεις με την αυθόρμητη εκπομπή φωτονίων φθορισμού. Επομένως κατά το φαινόμενο του φθορισμού, ένα μόριο απορροφά ένα φωτόνιο υψηλής ενέργειας και το επανεκπέμπει ως ένα φωτόνιο χαμηλότερης ενέργειας αλλά μεγαλύτερου μήκους κύματος. Η ενεργειακή διαφορά μεταξύ των απορροφόμενων και των εκπεμπόμενων φωτονίων αποδίδεται ως μοριακή διέγερση ή θέρμανση. Συνήθως το απορροφόμενο φωτόνιο είναι στο υπεριώδες και το εκπεμπόμενο φωτόνιο είναι στο ορατό, αλλά το μήκος κύματος εκπομπής εξαρτάται από την καμπύλη απορρόφησης και την μετατόπιση

Stokes της κάθε χρωμοφόρας. Ο φθορισμός πήρε την ονομασία του από το ορυκτό fluorite το οποίο παρουσιάζει το φαινόμενο του φθορισμού.

2.2.2) Φωσφορισμός

Οι ηλεκτρονικές καταστάσεις των περισσότερων οργανικών μορίων διαχωρίζονται σε singlet και σε triplet καταστάσεις. Στις singlet καταστάσεις όλα τα ηλεκτρόνια του μορίου βρίσκονται ως ζεύγη με συζευγμένο spin, ενώ σε μία triplet κατάσταση ένα ζεύγος ηλεκτρονίων έχει ασύζευκτο spin.



Κατά την παραγωγή διεγερμένων καταστάσεων με τον προβιβασμό ενός ηλεκτρονίου σε μια υψηλότερη τροχιά, η κατεύθυνση του spin του ηλεκτρονίου διατηρείται. Από την στιγμή που τα περισσότερα μόρια έχουν άρτιο αριθμό ηλεκτρονίων και είναι διατεταγμένα σε ζεύγη με αντίθετο spin η προβίβαση ενός ηλεκτρονίου δεν διαταράζει αυτή την ισότητα.

Όμως είναι δυνατό να αντιστραφεί το spin του διεγερμένου ηλεκτρονίου έτσι ώστε να μην είναι πλέον ζευγαρωμένο, με αποτέλεσμα το μόριο να έχει 2 ανεξάρτητα ηλεκτρόνια του ίδιου spin σε διαφορετικές τροχιές. Η κβαντική θεωρία προβλέπει ότι ένα τέτοιο μόριο μπορεί να υπάρξει σε 3 ελαφρώς διαφορετικές καταστάσεις. Έτσι το μόριο μπορεί να υπάρξει σε μία triplet κατάσταση, ενώ το φαινόμενο αυτό εμφανίζεται κυρίως σε πολλές ουσίες όπου το χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της διεγερμένης singlet κατάστασης S_1 έχει την ίδια ενέργεια με μια ανώτερη δονητική στάθμη της triplet κατάστασης.

Διαφορετικές μεταβάσεις από την θεμελιώδη κατάσταση, συνήθως από μια singlet κατάσταση για ένα μόριο με άρτιο αριθμό ηλεκτρονίων, σε μία διεγερμένη triplet κατάσταση είναι θεωρητικά απαγορευμένη, το οποίο σημαίνει ότι η ανάστροφη μετάβαση από την triplet κατάσταση στην θεμελιώδη είναι δύσκολη. Έτσι, ενώ η μετάβαση από μία διεγερμένη singlet κατάσταση, πχ την S_1 , στην θεμελιώδη με την εκπομπή φωτισμού επιτυγχάνεται εύκολα μέσα σε 10^{-9} - 10^{-6} seconds, η μετάβαση από μία διεγερμένη triplet κατάσταση στην θεμελιώδη με την εκπομπή φωσφορισμού απαιτεί το λιγότερο 10^{-4} seconds και μπορεί να χρειαστεί μέχρι και 10^2 seconds. Αυτή η καθυστέρηση αρχικά χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό του φωσφορισμού αλλά με μία πιο ακριβή περιγραφή έχουμε ότι ο φωσφορισμός απορρέει από την απευθείας μετάβαση από την triplet κατάσταση στην θεμελιώδη.

Η triplet κατάσταση ενός μορίου έχει χαμηλότερη ενέργεια από τη συσχετιζόμενη singlet κατάσταση, με αποτέλεσμα μεταβάσεις στην θεμελιώδη κατάσταση να συνοδεύονται με την εκπομπή ακτινοβολίας χαμηλότερης ενέργειας από αυτής της singlet κατάστασης. Για αυτό περιμένουμε ότι ο φωσφορισμός επιτελείται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος από τον φθορισμό.

Από τη στιγμή που τα μόρια καταλαμβάνουν triplet καταστάσεις για σχετικά μεγαλύτερους χρόνους, μπορούν εύκολα να χάσουν την ενέργειά τους με διαφορετικούς τρόπους παρά τον φωσφορισμό.

2.3) Μοριακός Φθορισμός

Η διαδικασία εκπομπής φθορισμού εξαρτάται από 3 σημαντικά γεγονότα, όπου όλα πραγματοποιούνται σε χρονικές κλίμακες, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους πολλές τάξεις μεγέθους. Η διέγερση ενός ευαίσθητου μορίου από ένα εισερχόμενο φωτόνιο πραγματοποιείται σε χρόνο της τάξης των femtoseconds (10^{-15} seconds), ενώ η αποδιέγερση μορίων από μία διεγερμένη κατάσταση σε μία χαμηλότερη ενεργειακή κατάσταση, είναι πολύ πιο αργή διαδικασία και μετρείται σε picoseconds (10^{-12} seconds). Η τελική διαδικασία, δηλαδή η εκπομπή ενός φωτονίου μεγαλύτερου μήκους κύματος και η επιστροφή του μορίου στην θεμελιώδη κατάσταση, πραγματοποιείται σε σχετικά μεγαλύτερο χρονικό διάστημα της τάξης των nanosecond (10^{-9}).

Πίνακας 3 : χρονική διάρκεια διαδικασιών φθορισμού.

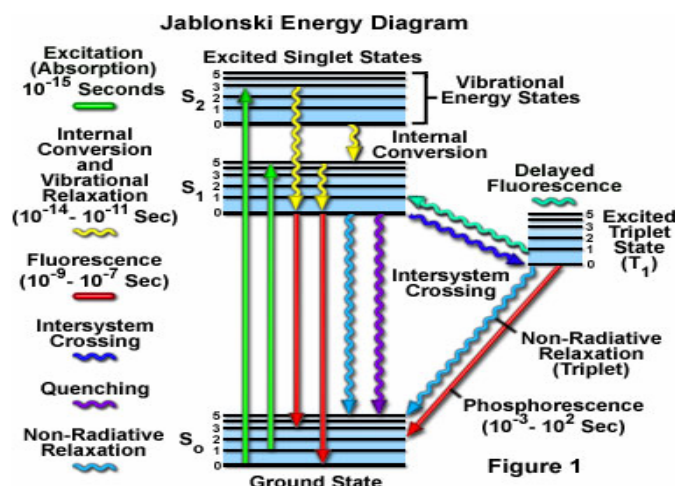
ΜΕΤΑΒΑΣΗ	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ	ΧΡΟΝΙΚΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ (SEC)
S(0) => S(1) ή S(n)	Απορρόφηση (διέγερση)	10^{-15}
S(n) => S(1)	Εσωτερική μετατροπή (Internal Conversion)	10^{-14} to 10^{-10}
S(1)* => S(1)	Δονητική αποδιέγερση (Vibrational Relaxation)	10^{-12} to 10^{-10}
S(1) => S(0)	Φθορισμός	10^{-9} to 10^{-7}
S(1) => T(1)	Intersystem Crossing	10^{-10} to 10^{-8}
S(1) => S(0)	Εσωτερική μετατροπή (Internal Conversion)	10^{-7} to 10^{-5}
S(1) + M => S(0)	Quenching	-----
T(1) => S(0)	Φωσφορισμός	10^{-4} to 100
T(1) + M => S(0)	Quenching	-----

Ο φθορισμός γενικά μελετάται με ισχυρά συζευγμένα πολυκυκλικά αρωματικά μόρια τα οποία υπάρχουν σε μία από τα πολλά ενεργειακά επίπεδα της θεμελιώδους κατάστασης, κάθε ένα από τα οποία σχετίζεται με μία καθορισμένη διάταξη των μοριακών ηλεκτρονικών τροχιών. Η ηλεκτρονική κατάσταση ενός μορίου καθορίζει την κατανομή του αρνητικού φορτίου και την συνολική του μοριακή γεωμετρία. Για οποιοδήποτε συγκεκριμένο μόριο, υπάρχουν πολλές διαφορετικές ηλεκτρονικές καταστάσεις $S(0)$, $S(1)$, $S(2)$ κλπ., ανάλογα με την συνολική ηλεκτρονική ενέργεια και την συμμετρία των διαφόρων καταστάσεων ηλεκτρονικού spin. Κάθε ηλεκτρονική κατάσταση διαχωρίζεται περαιτέρω σε δονητικά και περιστροφικά ενεργειακά επίπεδα. Η θεμελιώδης κατάσταση για τα περισσότερα οργανικά μόρια είναι η singlet κατάσταση, στην οποία όλα τα ηλεκτρόνια βρίσκονται σε ζεύγη (με αντίθετα spin). Σε θερμοκρασία δωματίου, πολύ λίγα μόρια έχουν αρκετή εσωτερική ενέργεια για να υπάρξουν σε οποιαδήποτε άλλη κατάσταση από το χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της θεμελιώδους κατάστασης και επομένως οι διαδικασίες διέγερσης συνήθως προκαλούνται από αυτό το ενεργειακό επίπεδο.

Η κατηγορία των μορίων που είναι ικανά να υφίστανται ηλεκτρονικές μεταβάσεις που οδηγούν σε φθορισμό είναι γνωστή ως φθορίζουσες χρωμοφóρες.

2.3.1) Απορρόφηση, Διέγερση και Εκπομπή

Η απορρόφηση ενέργειας από τις φθορίζουσες χρωμοφóρες πραγματοποιείται μεταξύ των κοντινών δονητικών και περιστροφικών ενεργειακών επιπέδων των διεγερμένων καταστάσεων σε διαφορετικές μοριακές τροχιές. Τα διαφορετικά ενεργειακά επίπεδα που συμμετέχουν στην απορρόφηση και εκπομπή φωτός από τις φθορίζουσες χρωμοφóρες παριστάνονται από τα ενεργειακά διαγράμματα Jablonski:



Εικόνα 25: Ενεργειακό διάγραμμα Jablonski

Τα διαγράμματα αυτά, πήραν το όνομα τους από τον Πολωνό φυσικό Alexander Jablonski. Ένα τυπικό διάγραμμα Jablonski παρουσιάζει την singlet **S(0)** θεμελιώδη κατάσταση, όπως επίσης και την πρώτη (**S(1)**) και την δεύτερη (**S(2)**) διεγερμένες singlet καταστάσεις, ως μία δέσμη οριζόντιων γραμμών. Όπως φαίνεται και από την εικόνα 2, οι παχύτερες γραμμές αναπαριστούν τα ηλεκτρονικά ενεργειακά επίπεδα, ενώ οι λεπτότερες γραμμές δηλώνουν τις διαφορετικές δονητικές ενεργειακές καταστάσεις (οι περιστροφικές ενεργειακές καταστάσεις αγνοούνται). Μεταβάσεις μεταξύ των καταστάσεων αναπαρίστανται με ευθύγραμμο ή κυματιστά βέλη, ανάλογα με το αν οι μεταβάσεις σχετίζονται με την απορρόφηση ή την εκπομπή ενός φωτονίου (ευθύγραμμο βέλος) ή με το αποτέλεσμα από την μοριακή εσωτερική εκτόνωση ή μη-ακτινοβολίζουσες διαδικασίες εκτόνωσης (παχύτερα βέλη). Τα κατακόρυφα προς τα πάνω βέλη χρησιμοποιούνται για να δηλώσουν την στιγμιαία φύση της διαδικασίας διέγερσης, ενώ τα κυματιστά βέλη υποδεικνύουν για φαινόμενα που πραγματοποιούνται σε πολύ μεγαλύτερα χρονικά διαστήματα.

Η απορρόφηση του φωτός πραγματοποιείται πολύ γρήγορα (χρόνοι απορρόφηση της τάξης των femtoseconds) σε διακριτά ποσά που αποκαλούνται κβάντα, η ενέργεια των οποίων ανταποκρίνεται στην ενεργειακή διαφορά για την διέγερση της φθορίζουσας χρωμοφόρας από την θεμελιώδη σε μία διεγερμένη κατάσταση. Επίσης η εκπομπή ενός φωτονίου κατά τον φθορισμό ή τον φωσφορισμό μετριέται σε κβάντα. Η ενέργεια ενός κβάντου, σύμφωνα με το νόμο του Planck είναι:

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

Όπου **E** είναι η ενέργεια του κβάντου (στην περίπτωση αυτή του φωτονίου), **h** είναι η σταθερά του Planck, **v** και **λ** είναι η συχνότητα και το μήκος κύματος του εισερχόμενου φωτονίου, και **c** είναι η ταχύτητα του φωτός. Ο νόμος του Planck δηλώνει ότι η ενέργεια ενός απορροφημένου φωτονίου είναι ευθέως ανάλογη με την συχνότητα και αντιστρόφως ανάλογη με το μήκος κύματος του, με αποτέλεσμα τα μικρότερα μήκη κύματος να έχουν μεγαλύτερο κβάντο ενέργειας. Εάν το απορροφόμενο φωτόνιο περιέχει ενέργεια περισσότερη από την απαιτούμενη για μια απλή ηλεκτρονική μετάβαση, το πλεόνασμα της ενέργειας συνήθως μετατρέπεται σε δονητική και περιστροφική ενέργεια. Παρόλα αυτά, εάν συγκρουστεί ένα μόριο με ένα φωτόνιο με λιγότερη ενέργεια από την απαιτούμενη για την πραγματοποίηση μετάβασης, δεν υπάρχει απορρόφηση. Οι ευρείς μπάντες απορρόφησης του φάσματος προκύπτουν από τα κοντινά δονητικά ενεργειακά επίπεδα και την θερμική κίνηση η οποία δίνει την δυνατότητα σε ένα εύρος φωτονικών ενεργειών να ταιριάζουν με μία συγκεκριμένη μετάβαση. Επειδή η διέγερση ενός μορίου από απορρόφηση συνήθως πραγματοποιείται χωρίς εναλλαγή των ζευγών του ηλεκτρονικού σπιν, η διεγερμένη κατάσταση είναι επίσης μία singlet κατάσταση.

Με το υπεριώδες ή ορατό φως, οι συνηθισμένες φθορίζουσες χρωμοφόρες συνήθως διεγείρονται σε υψηλότερα δονητικά επίπεδα της πρώτης **S(1)** ή της δεύτερης **S(2)** singlet ενεργειακής κατάστασης. Μία από τις μεταβάσεις απορρόφησης ή διέγερσης που παρουσιάζεται στο διάγραμμα Jablonski (αριστερό πράσινο βέλος) πραγματοποιείται από το χαμηλότερο δονητικό ενεργειακό επίπεδο της θεμελιώδους κατάστασης στη δεύτερη διεγερμένη κατάσταση (η μεταβολή δηλώνεται από την **S(0) = 0** στην **S(2) = 3**). Μία δεύτερη μετάβαση διέγερσης αναπαρίσταται από το δεύτερο δονητικό επίπεδο της θεμελιώδους κατάστασης στο ανώτερο δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης κατάστασης (δηλώνεται από την **S(0) = 1** to **S(1) = 5**). Σε μία συνηθισμένη φθορίζουσα χρωμοφόρα, η ακτινοβολή με ένα ευρύ φάσμα μηκών κύματος θα παράγει ένα ολόκληρο εύρος από επιτρεπόμενες μεταβάσεις που απαρτίζουν τα διάφορα δονητικά ενεργειακά επίπεδα των διεγερμένων καταστάσεων. Κάποιες από αυτές τις συνθήκες, κάποιες μεταβάσεις έχουν πολύ μεγαλύτερες πιθανότητες να πραγματοποιηθούν από κάποιες άλλες, ενώ όταν συνδυάζονται απαρτίζουν το φάσμα απορρόφησης του μορίου. Για τις περισσότερες από τις φθορίζουσες χρωμοφόρες τα φάσματα απορρόφησης και διέγερσης είναι ευδιάκριτα, αλλά συχνά υπερκαλύπτονται και μπορεί κάποιες φορές να είναι δυσδιάκριτα. Σε άλλες περιπτώσεις τα φάσματα απορρόφησης και εκπομπής είναι ξεκάθαρα διαχωρισμένα.

Αμέσως μετά από την απορρόφηση του φωτονίου, πολλές διεργασίες πραγματοποιούνται με διαφορετικές πιθανότητες, αλλά η πιθανότερη είναι η εκτόνωση στο χαμηλότερο ενεργειακό δονητικό επίπεδο της πρώτης διεγερμένης (**S(1) = 0**). Αυτή η διαδικασία είναι γνωστή ως εσωτερική μετατροπή ή δονητική εκτόνωση (απώλεια ενέργειας χωρίς την εκπομπή φωτός) και γενικότερα πραγματοποιείται σε 1 picosecond ή λιγότερο.

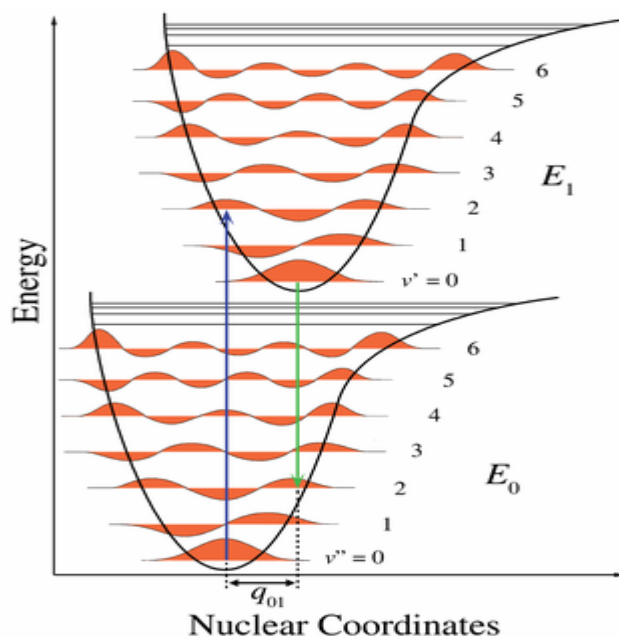
Ένα διεγερμένο μόριο παραμένει στην χαμηλότερη διεγερμένη singlet κατάσταση S(1) για χρονικό διάστημα της τάξης των nanoseconds πριν να εκτονωθεί στην θεμελιώδη. Εάν η εκτόνωση συνοδεύεται με την εκπομπή φωτονίου, η διαδικασία είναι γνωστή ως φθορισμός. Λόγω των κοντινών δονητικών επιπέδων της θεμελιώδους κατάστασης, παράγεται ένα μεγάλο εύρος φωτονικών ενεργειών κατά την διαδικασία εκπομπής. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, ο φθορισμός να παρατηρείται συνήθως με ένα φάσμα που εκτείνεται σε ένα μεγάλο εύρος μηκών κύματος και όχι σαν μία στενή γραμμή.

Εκτός από τον μηχανισμό αποδιέγερσης που αναπτύχθηκε παραπάνω (φθορισμός), υπάρχουν και πολλοί άλλοι μηχανισμοί αποδιέγερσης με διαφορετικούς βαθμούς πιθανότητας. Η ενέργεια διέγερσης μπορεί να εκλυθεί ως θερμότητα (κυανό βέλος στο σχήμα), μία διαδικασία που δεν εκπέμπει φωτόνια. Επίσης το διεγερμένο μόριο μπορεί να συγκρουστεί με κάποιο άλλο μόριο με αποτέλεσμα να του μεταδώσει ενέργεια (quenching, μωβ γραμμή στο διάγραμμα). Επίσης μπορεί να πραγματοποιηθεί και ένα φαινόμενο το οποίο είναι σχετικά σπάνιο και είναι γνωστό ως intersystem crossing, το οποίο πραγματοποιείται μεταξύ της διεγερμένης singlet κατάστασης και της χαμηλότερης διεγερμένης triplet κατάστασης (μπλε κυματιστό βέλο στο διάγραμμα). Κατά την

διαδικασία αυτή αντιστρέφεται η κατεύθυνση του σπιν ενός διεγερμένου ηλεκτρονίου, και το μόριο αποδιαγείρεται με την εκπομπή ακτινοβολίας, από το χαμηλότερο ταλαντωτικό επίπεδο μιας διεγερμένης triplet κατάστασης σε ένα της θεμελιώδους singlet κατάστασης. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται φωσφορισμός. Οι μεταβάσεις από την triplet διεγερμένη κατάσταση στην θεμελιώδη singlet κατάσταση, είναι κβαντικά πολύ μικρής πιθανότητας, με αποτέλεσμα ο χρόνος εκπομπής να είναι πολύ μεγαλύτερος από αυτόν του φθορισμού, της τάξης από 10^{-4} sec έως και μερικά sec. Το φάσμα φωσφορισμού βρίσκεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος από αυτόν του φθορισμού γιατί η διεγερμένη triplet κατάσταση έχει χαμηλότερη ενέργεια σχετικά με την αντίστοιχη singlet κατάσταση.

2.3.2) Αρχή Franck – Condon

Η αρχή Franck - Condon αποτελεί ένα κανόνα στην φασματοσκοπία και στην κβαντική χημεία, ο οποίος επεξηγεί την ένταση των δονητικών μεταβάσεων. Οι δονητικές μεταβάσεις αποτελούν τις ταυτόχρονες αλλαγές στα ηλεκτρονικά και δονητικά ενεργειακά επίπεδα ενός μορίου λόγω της απορρόφησης ή της εκπομπής φωτονίου κατάλληλης ενέργειας. Η αρχή Franck-Condon δηλώνει ότι κατά την διάρκεια μιας ηλεκτρονικής μετάβασης, η εναλλαγή από το ένα δονητικό επίπεδο στο άλλο είναι πιθανότερο να συμβεί εάν οι δονητικές κυματοσυναρτήσεις επικαλύπτονται σημαντικά.



Εικόνα 26: Το ενεργειακό διάγραμμα της αρχής Franck- Condon. Λόγω του ότι οι ηλεκτρονικές μεταβάσεις είναι πολύ γρηγορότερες σε σύγκριση με τις πυρηνικές κινήσεις, τα δονητικά επίπεδα ευνοούνται όταν ανταποκρίνονται σε ελάχιστες αλλαγές στις πυρηνικές συντεταγμένες. Οι πιθανές μεταβάσεις αναπαρίστανται ευνοώντας μεταβάσεις μεταξύ της $v=0$ και $v=2$.

Σύμφωνα με την αρχή Franck- Condon οι ηλεκτρονικές μεταβάσεις είναι ουσιαστικά ακαριαίες συγκρινόμενες με την χρονική σκάλα των πυρηνικών κινήσεων παρόλα αυτά εάν το μόριο πρόκειται να κινηθεί σε ένα νέο δονητικό επίπεδο κατά την ηλεκτρονική μετάβαση, αυτό το νέο

δονητικό επίπεδο πρέπει να είναι ακαριαία συμβατό με την πυρηνική θέση και το στιγμιαίο δονητικό επίπεδο του μορίου στην θεμελιώδη ηλεκτρονική κατάσταση.

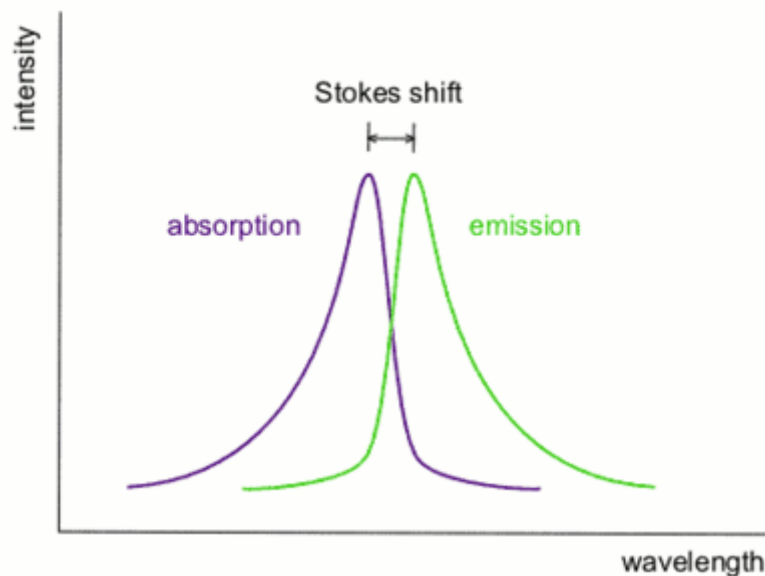
Κλασικά η αρχή Frank-Condon αποτελεί την εκτίμηση ότι μία ηλεκτρονική μετάβαση είναι πιο πιθανό να πραγματοποιηθεί χωρίς αλλαγές στις θέσεις των πυρήνων των μορίων. Το αποτέλεσμα ονομάζεται αρχή Franck – Condon, και η αντίστοιχη μετάβαση, κατακόρυφη μετάβαση. Η κβαντομηχανική προσέγγιση αυτής της αρχής υποστηρίζει ότι η ένταση μιας δονητικής μετάβασης είναι ανάλογη με το τετράγωνο του ολοκληρώματος υπέρθεσης των δονητικών κυματοσυναρτήσεων των δύο καταστάσεων που εμπλέκονται στην μετάβαση.

Όπως φαίνεται και στη εικόνα 26, τα δονητικά επίπεδα και οι δονητικές κυματοσυναρτήσεις είναι αυτές των κβαντομηχανικών ταλαντωτών, ή πιο περίπλοκες προσεγγίσεις στις πιθανές μοριακές ενέργειες. Σε χαμηλές θερμοκρασίες, το μόριο βρίσκεται στο $v=0$ δονητικό επίπεδο της θεμελιώδους κατάστασης και με την απορρόφηση φωτονίου κατάλληλης ενέργειας, πραγματοποιεί μετάβαση σε διεγερμένη κατάσταση. Η διαμόρφωση των ηλεκτρονίων της νέας κατάστασης μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα στην αλλαγή των θέσεων ισορροπίας των πυρήνων που βρίσκονται στο μόριο. Στο διάγραμμα αυτή η εναλλαγή στις πυρηνικές συντεταγμένες ανάμεσα στην θεμελιώδη και στην πρώτη διεγερμένη ονομάζεται q_{10} . Στην απλούστερη περίπτωση ενός διατομικού μορίου ο άξονας πυρηνικού συντονισμού αναφέρεται ως ενδομοριακός διαχωρισμός.

Οι δονητικές μεταβάσεις αναπαρίστανται από κάθετο βέλος λόγω της υπόθεσης σταθερών πυρηνικών συντεταγμένων κατά την διάρκεια της μετάβασης. Η πιθανότητα το μόριο να μεταβεί σε οποιοδήποτε δονητικό επίπεδο είναι ανάλογη του τετραγώνου της κάθετης υπέρθεσης των δονητικών κυματοσυναρτήσεων της αρχικής και τελικής κατάστασης. Στις ηλεκτρονικά διεγερμένες καταστάσεις τα μόρια γρήγορα εκτονώνονται στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο και από εκεί εκπίπτουν στη χαμηλότερη ηλεκτρονική κατάσταση με την εκπομπή φωτονίου.

2.3.3) Μετατόπιση Stokes.

Ως μετατόπιση Stoke αναφέρεται η διαφορά στο μήκος κύματος ανάμεσα στο μέγιστο της θέσης του φάσματος απορρόφησης και του φάσματος φθορισμού της ίδιας ηλεκτρονικής μετάβασης. Κατά την απορρόφηση φωτός από ένα άτομο ή μόριο παρατηρείται μετάβαση σε μια διεγερμένη ηλεκτρονική κατάσταση. Η μετατόπιση Stoke πραγματοποιείται λόγω της απώλειας μέρους της ενέργειας που απορροφήθηκε από το μόριο, πριν από την επανεκπομπή της ως φθορισμό ή φωσφορισμό, ανάλογα με τον χρόνο που έχει μεσολαβήσει ανάμεσα στην απορρόφηση και την επανεκπομπή. Η ενέργεια που χάνεται είναι συνήθως υπό την μορφή θερμικής ενέργειας.



Εικόνα 27: Μετατόπιση Stokes

2.3.4) Νόμος Beer- Lambert

Ο νόμος Beer- Lambert αποτελεί την γραμμική σχέση μεταξύ της απορροφητικότητας και της συγκέντρωσης ενός υλικού που απορροφά ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία. Η σχέση που αποδίδει το νόμο Beer- Lambert είναι η εξής:

$$A = a_{\lambda} \times b \times c$$

Όπου A είναι η μετρούμενη απορρόφηση, a_{λ} η σταθερά απορρόφησης που εξαρτάται από το εκάστοτε μήκος κύματος, b το μήκος διείσδυσης και c η συγκέντρωση του δείγματος.

Όταν η συγκέντρωση μετριέται σε molarity, ο νόμος Beer- Lambert γράφεται:

$$A = \epsilon_{\lambda} \times b \times c$$

Όπου ϵ_{λ} είναι η σταθερά μοριακής απορροφητικότητας με μονάδες $M^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Στην περίπτωση που σε ένα δείγμα περιέχονται διάφορες ουσίες που απορροφούν φως σε συγκεκριμένο μήκος κύματος, η ολική απορρόφηση του δείγματος αποτελεί το άθροισμα όλων των επιμέρους απορροφητών:

$$A = (\epsilon_1 \times b \times c_1) + (\epsilon_2 \times b \times c_2) + \dots$$

Οι πειραματικές μετρήσεις συνήθως πραγματοποιούνται σε όρους διάδοσης

$$T \rightarrow T = I/I_0,$$

όπου I είναι η ένταση του φωτός μετά που έχει περάσει από το δείγμα και I_0 η αρχική ένταση του φωτός. Η σχέση μεταξύ της απορροφητικότητας A και της διάδοσης T είναι :

$$A = -\log(T) = -\log(I/I_0)$$

Η γραμμικότητα του νόμου Beer – Lambert περιορίζεται από τους παρακάτω παράγοντες :

- 1) Αποκλίσεις στις σταθερές απορρόφησης σε υψηλές συγκεντρώσεις (>0.01 M) λόγω των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των κοντινών μορίων.
- 2) Σκέδαση του φωτός από τα σωματίδια του δείγματος.
- 3) Φθορισμό ή φωσφορισμό του δείγματος.
- 4) Αλλαγή του δείκτη διάθλασης σε υψηλές συγκεντρώσεις.
- 5) Αλλαγή της χημικής ισορροπίας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης.

2.3.5) Κβαντική απόδοση φθορισμού.

Η κβαντική απόδοση του φθορισμού δείχνει την αποδοτικότητα της διαδικασίας φθορισμού. Ορίζεται ως το κλάσμα του εκπεμπόμενου αριθμού φωτονίων προς τον αριθμό των απορροφόμενων φωτονίων.

$$\Phi = \frac{\# \text{ photonsemitted}}{\# \text{ photonsabsorbed}}$$

Η μέγιστη τιμή της κβαντικής απόδοσης είναι 1 κατά την οποία το κάθε απορροφόμενο φωτόνιο εκπέμπει ένα φωτόνιο. Ακόμη και στοιχεία με κβαντική απόδοση 0.1 θεωρούνται φθορίζοντα. Τα περισσότερα υλικά έχουν μηδενικό φθορισμό. ($\Phi=0$)

Ο χρόνος φθορισμού αναφέρεται στον χρόνο που ένα μόριο παραμένει στην διεγερμένη κατάσταση πριν να εκπέμπει ένα φωτόνιο:

$$[S_1] = [S_1]_0 e^{-kt}$$

Όπου $[S_1]$ είναι η εναπομένουσα συγκέντρωση των διεγερμένων μορίων στην χρονική στιγμή t και $[S_1]_0$ είναι η αρχική συγκέντρωση μετά από την διέγερση και k είναι μία σταθερά πρώτης τάξης. Ο χρόνος ζωής ορίζεται ως:

$$\tau = \frac{1}{k}$$

Ο χρόνος ζωής αναφέρεται στην ευκολία του τρόπου εκτόνωσης. Αν ο τρόπος εκτόνωσης είναι πολύ αποδοτικός, η εκτόνωση είναι πολύ γρήγορη και ο χρόνος ζωής πολύ σύντομος (της τάξης των picoseconds). Αν ο τρόπος εκτόνωσης είναι απαγορευμένος (από τους κβαντικούς νόμους) τότε ο χρόνος ζωής είναι μεγαλύτερος (της τάξης των microseconds). Όσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος ζωής τόσο μεγαλύτερη είναι η πιθανότητα η εκτόνωση να πραγματοποιηθεί με ένα

διαφορετικό μη φθορίζοντα τρόπο, για αυτό μεγάλοι χρόνοι ζωής φθορισμού αναφέρονται σε μικρή κβαντική απόδοση. Ο χρόνος ζωής φθορισμού αποτελεί μία σημαντική παράμετρο για πρακτικές εφαρμογές του φθορισμού.

Υπάρχουν πολλοί κανόνες που διέπουν τον φθορισμό. Ο νόμος Kasha-Vavilon ορίζει ότι η κβαντική απόδοση του φθορισμού είναι ανεξάρτητη του μήκους κύματος της ακτινοβολίας διέγερσης. Αυτό δεν ισχύει πάντα και ο νόμος παραβιάζεται σε πολλά απλά μόρια.

2.3.6) Φάσμα φθορισμού

Όλη η διαδικασία φθορισμού είναι κυκλική. Εκτός και αν η φθορίζουσα χρωμοφόρα έχει καταστραφεί ανεπανόρθωτα στην διεγερμένη κατάσταση (photo bleaching) η ίδια φθορίζουσα χρωμοφόρα μπορεί να διεγερθεί συνεχόμενα και να ανιχνευθεί. Το γεγονός ότι μία μόνο φθορίζουσα χρωμοφόρα μπορεί να παράγει πολλές εκατοντάδες ανιχνεύσιμων φωτονίων είναι θεμελιώδης στη υψηλή ευαισθησία της ανίχνευσης των τεχνικών ανίχνευσης φθορισμού. Για πολυατομικά μόρια σε διαλύματα οι ξεχωριστές ηλεκτρονικές μεταβάσεις που αναπαριστούνται από το $h\nu_{ex}$ και $h\nu_{em}$ αντικαθίστανται από ένα μεγάλο ενεργειακό φάσμα το οποίο ονομάζεται φάσμα διέγερσης φθορισμού και φάσμα εκπομπής φθορισμού. Το εύρος του φάσματος αυτών των φασμάτων είναι παράμετροι ιδιαίτερης σημασίας για εφαρμογές κατά τις οποίες 2 ή περισσότερες φθορίζουσες χρωμοφόρες ανιχνεύονται ταυτόχρονα. Εκτός από μερικές εξαιρέσεις, το φάσμα διέγερσης φθορισμού μιας φθορίζουσας χρωμοφόρας σε αραιό διάλυμα είναι όμοιο με το φάσμα απορρόφησης. Κάτω από τις ίδιες συνθήκες, το φάσμα εκπομπής φθορισμού είναι ανεξάρτητο από το μήκος κύματος διέγερσης λόγω της μερικής απώλειας της ενέργειας διέγερσης κατά τον χρόνο παραμονής στην διεγερμένη κατάσταση. Η ένταση της εκπομπής είναι ανάλογη του πλάτους του φάσματος διέγερσης στο μήκος κύματος διέγερσης.

2.3.7) Σήματα φθορισμού

Η ένταση φθορισμού εξαρτάται ποσοτικά από τις ίδιες παραμέτρους, από τις οποίες εξαρτάται η απορρόφηση, και οι οποίες καθορίζονται από τον νόμο του Beer- Lambert ως το γινόμενο της μοριακής extinction coefficient, οπτικού μήκους διείσδυσης και της συγκέντρωσης του διαλύματος, όπως επίσης και από την κβαντική απόδοση του φθορισμού της χρωστικής, την ένταση της πηγής διέγερσης και την αποδοτικότητα συλλογής φθορισμού του μηχανήματος. Σε αραιά διαλύματα ή αιωρήματα, η ένταση φθορισμού είναι γραμμικά ανάλογη με αυτές τις παραμέτρους. Όταν η απορρόφηση του δείγματος υπερβαίνει το 0,05 για μήκος διείσδυσης 1 cm, η σχέση γίνεται μη γραμμική και οι μετρήσεις μπορεί να επηρεαστούν από φαινόμενα όπως η αυτό-απορρόφηση. Επειδή η μέτρηση του φθορισμού εξαρτάται από το μηχανήμα ανίχνευσης,

standar αναφορές φθορισμού είναι απαραίτητες για την πραγματοποίηση βαθμονομημένων μετρήσεων σε διαφορετικούς χρόνους.

2.3.8) Φθορισμός background

Η ευαισθησία της ανίχνευσης φθορισμού είναι πολλαπλά εκτεθειμένη από τα σήματα του background τα οποία μπορεί να προέχονται από ενδογενείς συνιστώσες του δείγματος (αυτοφθορισμός). Η ανίχνευση του αυτοφθορισμού μπορεί να μειωθεί είτε με την χρήση φίλτρων που μειώνουν την σχετική μετάβαση από την E_2 στην E_1 ή με την επιλογή δειγμάτων που απορροφούν και εκπέμπουν σε διαφορετικά μήκη κύματος.

2.4) Laser-induced fluorescence (LIF)

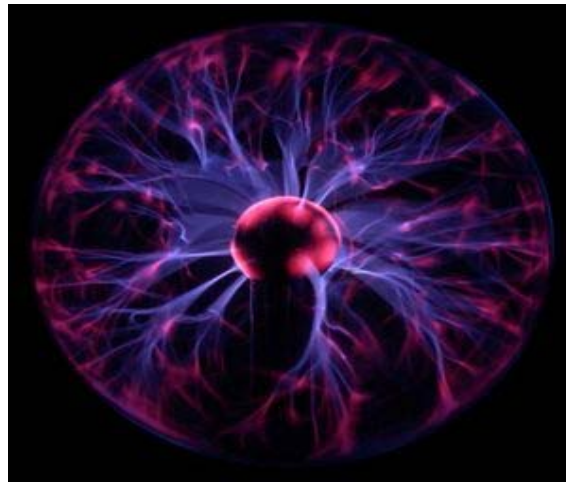
Η τεχνική LIF (Φθορισμός Επαγόμενος από Laser) αποτελεί μία φασματοσκοπική τεχνική. Κατά την τεχνική αυτή το υπό εξέταση δείγμα διεγείρεται από δέσμη laser. Το μήκος κύματος του laser με το οποίο γίνεται η διέγερση του δείγματος διαλέγεται έτσι ώστε να είναι αυτό με το οποίο το δείγμα έχει το μεγαλύτερο cross section (πιθανότητα αλληλεπίδρασης). Στη συνέχεια το διεγερμένο δείγμα, μετά από κάποιο χρονικό διάστημα της τάξεως των nanosecond ή microsecond, αποδιαγείρεται και εκπέμπει φως σε μήκος κύματος μεγαλύτερο από το μήκος κύματος διέγερσης. Αυτό το φως που εκπέμπεται (φθορισμός) καταγράφεται και αναλύεται.

Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου από την φασματοσκοπία απορρόφησης είναι το ότι είναι δυνατό να καταγραφούν δύο ή τρεις διαστατικές εικόνες λόγω της ισοτροπικής μορφής του φθορισμού. Το signal to noise ratio του σήματος φθορισμού είναι πολύ υψηλό, παρέχοντας έτσι μεγάλη ευαισθησία σε αυτή την τεχνική. Είναι επίσης δυνατή η διάκριση μεταξύ των στοιχείων σε ένα δείγμα, η οποία επιτυγχάνεται με την κατάλληλη επιλογή του μήκους κύματος του laser στο μήκος κύματος διέγερσης ενός συγκεκριμένου στοιχείου, το οποίο διαφέρει από το μήκος κύματος διέγερσης των υπολοίπων στοιχείων.

2.5) LIBS (Laser Induced Breakdown Spectroscopy)

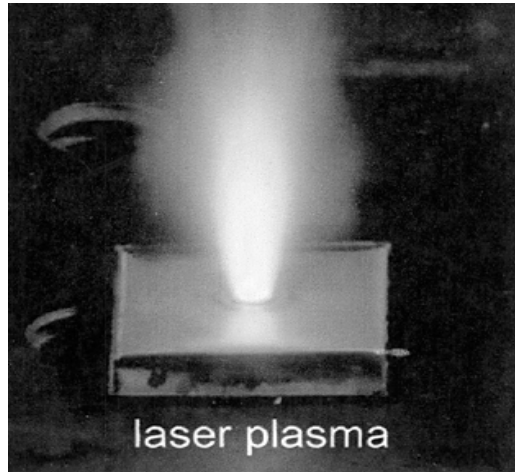
Η φασματοσκοπική τεχνική LIBS ή LIPS (Laser Induced Plasma Spectroscopy) αναπτύχθηκε με γοργούς ρυθμούς σαν μία αναλυτική φασματοσκοπική τεχνική τις τελευταίες δύο δεκαετίες και βασίζεται στην δημιουργία πλάσματος από το υπό εξέταση δείγμα με την χρήση ακτινοβολίας laser.

Το πλάσμα ουσιαστικά είναι ένα ιονισμένο αέριο και θεωρείται ως μία τέταρτη μορφή της ύλης μετά από τα στερεά τα υγρά και τα αέρια λόγω των ξεχωριστών του ιδιοτήτων. Με τον όρο ιονισμένο, θεωρείται ότι τουλάχιστον ένα ηλεκτρόνιο έχει αποσυνδεθεί από το άτομο ή το μόριο στο οποίο ανήκε αρχικά. Το ελεύθερο ηλεκτρονικό φορτίο κάνει το πλάσμα ηλεκτρικά αγωγίμο με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρά ισχυρά με το ηλεκτρομαγνητικό πεδίο.



Εικόνα 28: Λάμπα πλάσματος

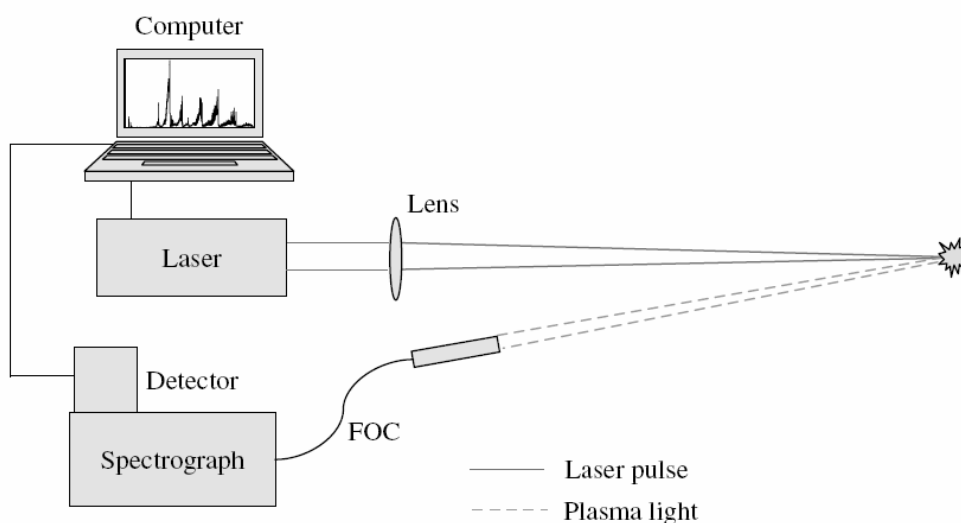
Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής LIBS έχει ως στόχο της την δημιουργία πλάσματος από το εξεταζόμενο δείγμα και στη συνέχεια συλλογή του φωτός αυτού για ανάλυση. Για το σκοπό αυτό πραγματοποιείται εστίαση του laser σε μία πολύ μικρή περιοχή στην επιφάνεια του δείγματος, με αποτέλεσμα την αφαίρεση πολύ μικρής ποσότητας του υλικού, της τάξης του 1 μg , το οποίο υπερθερμαίνεται στιγμιαία δημιουργώντας πλάσμα με θερμοκρασίες περίπου 10.000 $^{\circ}\text{C}$. Σε αυτές τις θερμοκρασίες το υλικό που αφαιρείται διαχωρίζεται σε διεγερμένα ιοντικά και ατομικά είδη. Σε αυτό το χρονικό διάστημα το πλάσμα εκπέμπει συνεχή ακτινοβολία η οποία δεν περιέχει κάποια χρήσιμη πληροφορία για τα στοιχεία που αποτελούν το δείγμα. Μέσα όμως σε ένα πολύ μικρό χρονικό διάστημα το πλάσμα εξαπλώνεται με υπερηχητικές ταχύτητες και ψύχεται με αποτέλεσμα να μπορούν να παρατηρηθούν οι ατομικές γραμμές εκπομπής των στοιχείων που παρατηρούνται στο δείγμα. Η καθυστέρηση ανάμεσα στην εκπομπή της συνεχούς ακτινοβολίας και της χαρακτηριστικής ακτινοβολίας είναι της τάξης των 10 μs και για αυτό είναι απαραίτητο το χρονικό gate του ανιχνευτή.



Εικόνα 29: Δημιουργία πλάσματος κατά την ακτινοβολήση του δείγματος με ακτίνα laser.

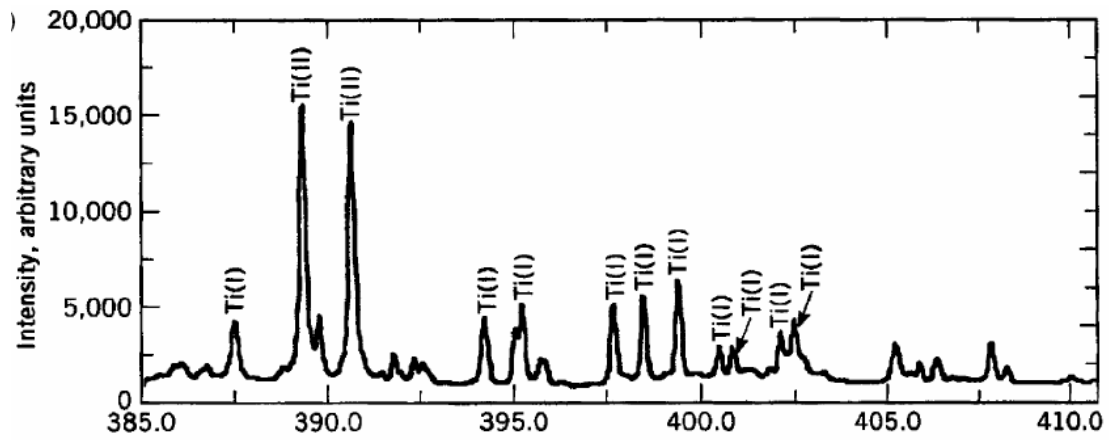
Η φασματοσκοπία LIBS μπορεί να αναλύσει οποιαδήποτε μορφή ύλης ανεξάρτητα από την φυσική της κατάσταση, στερεό, υγρό ή αέριο. Ακόμη και διαλύματα πυλού, αεροσόλ, ζελέ και άλλα μπορούν να ερευνηθούν. Η τεχνική LIBS μπορεί να ανιχνεύσει όλα τα στοιχεία, ενώ περιορίζεται μόνο από την ισχύ του laser όπως επίσης και από την ευαισθησία και το εύρος των μηκών κύματος του φασματογράφου ή του ανιχνευτή.

Μία τυπική διάταξη της τεχνικής LIBS έχει ως εξής: γίνεται χρήση ενός παλμικού laser μεγάλης ενέργειας (συνήθως δεκάδες ή εκατοντάδες mJ ανά παλμό) σε συνδυασμό με ένα συγκεντρωτικό φακό για την δημιουργία πλάσματος κατά την εξάτμιση μικρού μέρους του δείγματος. Το πλάσμα συλλέγεται από οπτική ίνα και ένας φασματογράφος διαχωρίζει το φως που διαδίδεται από τα διεγερμένα ατομικά και ιοντικά είδη που βρίσκονται στο πλάσμα. Στη συνέχεια ένας ανιχνευτής καταγράφει τα σήματα εκπομπής και ηλεκτρονικά κυκλώματα ψηφιοποιούν και αναπαριστούν τα αποτελέσματα



Εικόνα 30: Αναπαράσταση της τεχνικής LIBS

Το φάσμα εκπομπής χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των στοιχείων που αποτελούν το υπό εξέταση δείγμα.



Εικόνα 31: Φάσμα εκπομπής Τιτανίου μετά από την δημιουργία πλάσματος.

Η τεχνική LIBS έχει πολλά πλεονεκτήματα συγκρινόμενη με άλλες αναλυτικές τεχνικές λόγω της απλού σχεδιασμού της διάταξης που απαιτείται για την πραγματοποίηση των μετρήσεων.

2.6) Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

Ο τομέας της διαθλαστικής χειρουργικής είναι αυξημένου ενδιαφέροντος λόγω της μεγάλης του αποτελεσματικότητας και της απήχησης που έχει στο ευρύ κοινό. Για το σκοπό αυτό έχει πραγματοποιηθεί πληθώρα μελετών που στόχο της έχει την καλύτερη κατανόηση των μηχανισμών που λαμβάνουν μέρος κατά την διάρκεια της αλληλεπίδρασης του laser με τον κερατοειδικό ιστό και της διαδικασίας εκτομής του ιστού, καθώς και την χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών για την μελέτη επιμέρους παραμέτρων που μπορεί να συμβάλουν στην επιτυχή ή όχι έκβαση μιας επέμβασης διαθλαστικής χειρουργικής.

Το laser που χρησιμοποιείται ως επί το πλείστον στην διαθλαστική χειρουργική είναι το excimer laser ArF με μήκος εκπομπής στα 193nm. Ο μηχανισμός αποδόμησης του ιστού με laser στο υπεριώδες εξηγείται με δύο θεωρίες: τη θερμική και τη φωτοχημική. Το θερμικό μοντέλο υποστηρίζει ότι η ενέργεια του laser απορροφάτε κατά κύριο λόγο από το νερό του στόχου και μετατρέπεται σε θερμότητα, μεταβάλλοντας κατά αυτό τον τρόπο την θερμική του ισορροπία, ενώ σύμφωνα με το φωτοχημικό μοντέλο εκτομής, γνωστό και ως φωτοαποδόμηση ή κρύα αποδόμηση, θεωρείτε ότι η ενέργεια ενός laser UV είναι ικανή να σπάσει τους χημικούς δεσμούς και να προκαλέσει την φωτοχημική αποσύνθεση του υλικού (Trokel , Srinivisan& Braren,1983, Vogel&Venugopalan, 2003,Ediger &Pettit 1995). Το laser ArF έχει ενέργεια φωτονίου 6,4 eV, ενώ η ενέργεια διαχωρισμού των δεσμών C-C και C-H είναι 3,4 eV και 4,3 eV αντίστοιχα. Το ελεύθερο υλικό στη συνέχεια εκτινάσσεται γρήγορα από την επιφάνεια (νέφος εκτομής – ablation plume) καθώς διαχέεται το πιεστικό κύμα. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται οι ενέργειες διάσπασης κάποιων μοριακών δεσμών , σε συνδυασμό με την ενέργεια φωτονίων συστημάτων laser στο υπεριώδες:

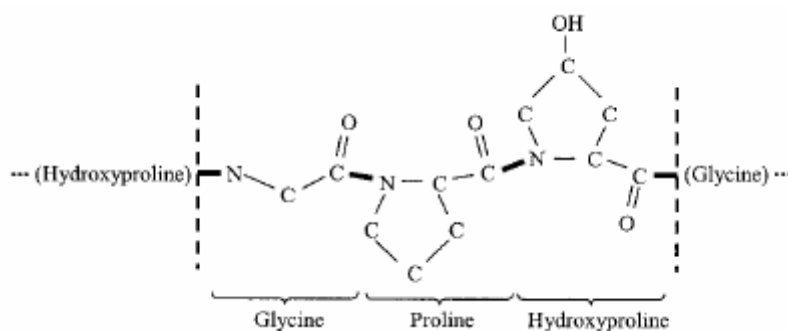
Πίνακας 4: ενέργειες διάσπασης χαρακτηριστικών μοριακών δεσμών.

Μοριακός δεσμός	Ενέργεια Διάσπασης (eV)
C=O	7.5
C=C	6.4
O-H	4.8
C-H	4.3
N-H	4.1
C-O	3.6
C-C	3.6
C-N	3.0

Πίνακας 5: ενέργεια φωτονίων χαρακτηριστικών συστημάτων laser με μήκος εκπομπής στο UV

laser	Μήκος κύματος	Ενέργεια φωτονίου (eV)
ArF excimer	193	6.4
Nd:YAG (5 ^η αρμονική)	213	5.8
KrF excimer	248	5.0
Nd:YAG (4 ^η αρμονική)	266	4.6
XeCl excimer	308	4.0
N ₂	337	3.7
Nd:YAG (3 ^η αρμονική)	355	3.5

Καθώς ο κύριος απορροφητής της ενέργειας στα 193nm είναι το κολλαγόνο, χρήσιμο είναι να αναφερθεί η χημική δομή του κολλαγόνου (Fisher&Hahn,2004). Το κολλαγόνο είναι ένα μακρομόριο τριπλής ελικοειδής δομής, δεξιόστροφο, στο οποίο η κάθε ελικοειδής αλυσίδα αποτελείται από αμινοξέα. Οι αλυσίδες συνδέονται μεταξύ τους με ομοιοπολικούς δεσμούς που παρέχουν μεγάλη δομική ευστάθεια. Η αλληλουχία των αμινοξέων στην κάθε αλυσίδα, είναι επαναλαμβανόμενος σε μεγάλο βαθμό. Η αναπαράσταση των αμινοξέων σε μία αλυσίδα του κολλαγόνου είναι της μορφής : Gly – X –Y στην οποία Gly είναι η γλυκίνη (χημική σύσταση C₂H₅NO₂), X είναι προλίνη (C₅H₉NO₂) και ως Y είναι η υδροξυπρολίνη (C₅H₉NO₃). Άλλα αμινοξέα, μπορεί να εμφανιστούν σε μικρό ποσοστό στην θέση της προλίνης και της υδροξυπρολίνης, αλλά σε γενικές γραμμές το κολλαγόνο αναπαρίσταται ως μία επαναλαμβανόμενη ακολουθία γλυκανών, προλινών και υδροξυπρολινών.



Εικόνα 32:Η ακολουθία αμινοξέων που απαρτίζει την πρωταρχική δομή του κολλαγόνου (C₁₂H₁₇N₃O₄). Οι έντονες μαύρες γραμμές αναπαριστούν τους πεπτιδικούς δεσμούς ανάμεσα στα γειτονικά αμινοξέα.

Ο γενικός μοριακός τύπος των 3 επαναλαμβανόμενων αμινοξέων που απαρτίζουν το κολλαγόνο είναι C₁₂H₁₇N₃O₄.

Οι αρχικές έρευνες για τις διαδικασίες εκτομής πραγματοποιήθηκαν με την χρήση πολυμερών υλικών που προσομοίωναν τον κερατοειδή, με αποτέλεσμα την εξαγωγή πολύτιμων συμπερασμάτων για τον μηχανισμό εκτομής (Ediger et al.1993, Pettit et al.1994, Krueger et al. 1985). Η ένταση του laser πρέπει να υπερβεί μία συγκεκριμένη τιμή έντασης (κατώφλι εκτομής –

ablation threshold) για να πραγματοποιηθεί εκτομή. Κάτω από αυτή την τιμή δεν πραγματοποιείται εκτομή, ενώ εντάσεις ενέργειας πάνω από αυτό το κατώφλι προκαλούν φωτοαποδόμηση και αφαίρεση του ιστού. Με το excimer laser ArF στα 193nm, προκαλείται τοπική εκτομή του υλικού χωρίς να επηρεάζεται ή να προκαλείται λιώσιμο του παρακείμενου ιστού, ενώ το υλικό που αφαιρείτε απομακρύνεται με υπερηχητικές ταχύτητες (Garrison & Shrinivisan,1984). Η εκτομή του πολυμερούς υλικού PMMA μελετήθηκε με την λήψη φωτογραφιών υψηλής ταχύτητας, κατά την οποία βρέθηκε ότι εμφανίζεται μία καθυστέρηση μεταξύ του παλμού του laser και την αρχή της εκτομής του υλικού , η οποία συσχετίζεται με το πλάτος του παλμού. Πιο συγκεκριμένα, ένας τυπικός παλμός από excimer laser έχει πλάτος 10-20 nsec, ενώ η εκτίναξη του υλικού δεν ξεκινάει παρά εκατοντάδες nanoseconds αργότερα (Srinivasan, 1993). Με βάση έρευνες των Chirila et al, 1992 υποστηρίζεται ότι ο ρυθμός αποδόμησης αυξάνει με την αύξηση της έντασης της ενέργειας μέχρι ένα σημείο κορεσμού από το οποίο και έπειτα ο ρυθμός αποδόμησης παραμένει σταθερός.

Από εικόνες που πάρθηκαν με φωτογράφιση υψηλών ταχυτήτων κατά την αλληλεπίδραση laser με το κερατοειδικό ιστό (Puliafito et al,1987a) εμφανίζεται ένα μικρό νέφος από το αφαιρούμενο υλικό περίπου 0.2 mm πάνω από την επιφάνεια του κερατοειδή και περίπου 0,5 μsec μετά από τον παλμό του laser. Για τα επόμενα 50 μs είναι εμφανές ένα ευδιάκριτο «μανιτάρι» όπως μετά από μία έκρηξη. Από τις έρευνες αυτές εξήχθη το συμπέρασμα ότι η διαδικασία εκτομής τοποθετείται κάπου μεταξύ 5 και 15 μs από τον παλμό του laser , αλλά το υλικό που εκτινάσσεται συνεχίζει να απομακρύνεται για 150 μs το λιγότερο. Είναι πλέον κοινώς αποδεκτό ότι η χρήση του excimer laser είναι ασφαλής και αποτελεσματική για την εκτομή του κερατοειδικού ιστού, συγκλίνει στην θεωρία για την ύπαρξη ενός κατωφλίου έντασης για την πραγματοποίηση της εκτομής , ενώ τα αποτελέσματα είναι υψηλής αποτελεσματικότητας και προβλεψιμότητας κατά την χρήση εντάσεων πολύ ψηλότερων από το κατώφλι, λόγω του κορεσμού του ρυθμού αποδόμησης (Albagli et al.1994, Berns et al. 1999, Pettit et al. 1995).

Από πειράματα παρατηρήθηκε οι υψηλές εντάσεις προκαλούν ακουστικά shock waves και τη ύπαρξη δευτερεύουσας ακτινοβολίας, ενώ οι μεγάλοι ρυθμοί επαναληψιμότητας των παλμών μπορεί να προκαλέσουν θερμικά παράπλευρα αποτελέσματα. Κατά τις αρχικές μελέτες, υποστηρίχθηκε η άποψη ότι η διαδικασία εκτομής ήταν μία ισχυρή θερμική διαδικασία η οποία προκαλούσε την εξάτμιση του ακτινοβολούμενου υλικού. Για την μελέτη των σωματιδίων που απάρτιζαν το νέφος εκτομής πραγματοποιήθηκε μελέτη της σκέδασης του laser (Hahn et al.,1995), κατά την οποία μετρήθηκε η σκέδαση των σωματιδίων του νερού και υπολογίστηκε ότι αποτελούσαν το 78% του συνολικού εκτεμόμενου υλικού. Το ποσοστό αυτό ανταποκρίνεται στην περιεκτικότητα του κερατοειδή σε νερό , το οποίο είναι περίπου 75%. Αυτή η παρατήρηση προτείνει την απουσία οποιασδήποτε σημαντικής θερμικής διαδικασίας ή εξάτμισης του νερού και υποστήριζε το μοντέλο εκρηκτικής φωτοαποδόμησης.

Σύμφωνα με μια άλλη άποψη (Staveteig et al.,1996) , το νερό στον κερατοειδή μπορεί να υπερθερμαίνεται από την ακτινοβολία του laser , με αποτέλεσμα το υπερθερμασμένο νερό να

μετατρέπεται σε ισχυρό απορροφητή της ακτινοβολίας laser. Η άποψη ότι η εκτομή με excimer laser πραγματοποιείται λόγω θερμικών φαινομένων, υποστηρίχθηκε επιπλέον με την πραγματοποίηση μετρήσεων θερμικής ακτινοβολίας, κατά τις οποίες υπολογίστηκε ότι η μέγιστη θερμοκρασία στην επιφάνεια κερατοειδών από χοίρους ήταν περίπου 240°C σε εντάσεις ενέργειας που χρησιμοποιούνται κλινικά. Παρόλα αυτά, αυτή η μέγιστη θερμοκρασία παρατηρείται για πολύ μικρό χρονικό διάστημα και κατά πάσα πιθανότητα δεν είναι αντιπροσωπευτική της πραγματικής κερατοειδικής θερμοκρασίας κατά την διάρκεια της εκτομής. Σύμφωνα με άλλη μελέτη (Krueger et al., 1985), κατά την οποία χρησιμοποιήθηκαν μικροφωτογραφίες για την απεικόνιση των σημείων εκτομής σε κερατοειδείς βοοειδών, έδειξε ότι οι περιοχές του κερατοειδικού στρώματος που ήταν παρακείμενες στις περιοχές εκτομής έμεναν ανέπαφες, ενώ το κατώφλι έντασης εκτομής είναι ανεξάρτητο από το ρυθμό επαναληψιμότητας των παλμών. Από την ίδια μελέτη προέκυψε ότι σε εντάσεις ενέργειας κάτω από το κατώφλι εκτομής, δεν παρατηρήθηκε καμία πήξη του ιστού, γεγονός που υποστηρίζει την άποψη η εκτομή ιστού με ArF excimer laser στα 193nm, αποτελεί μία φωτοχημική διαδικασία.

Πολύ μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζει και η χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών για την μελέτη της εκτομής ιστού με excimer laser. Αρχικά οι φασματοσκοπικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της αλληλεπίδρασης του laser με πολυμερή υλικά (Garrison et al., 1984, Srinivasan, 1993). Κάποια αρχικά πειράματα χρησιμοποιήθηκαν με φύλλα PMMA τα οποία ακτινοβολήθηκαν με εντάσεις 300 mJ/cm^2 ενώ καταγραφόταν τα φάσματα από την εκπομπή που συνοδεύει την εκτομή του υλικού. Παρατηρήθηκε η ύπαρξη χαρακτηριστικών γραμμών εκπομπής οι οποίες αντιστοιχούσαν σε στοιχεία όπως: N_2 , CO , C_2 , CH και CN , και εξήχθη το συμπέρασμα ότι η εκτομή του PMMA αποτελεί κατά κύριο λόγο μία φωτοχημική διαδικασία κατά την οποία σπάνε οι πολυμερικοί δεσμοί. Η εκτομή του PMMA μελετήθηκε και με την χρήση της φασματοσκοπικής τεχνικής LIF, όπου ως πηγή διέγερσης χρησιμοποιήθηκε ένα dye laser για την εξερεύνηση του C_2 μέσα στο νέφος εκτομής, ενώ τα αιωρούμενα προϊόντα της αποδόμησης αναλύθηκαν με την χρήση ενός φασματόμετρου μάζας και χρωμογράφου. Βρέθηκε ότι τα κύρια προϊόντα της αποδόμησης του PMMA με laser στα 193nm είναι C_2 , μεθυλομεθακρυλικό (MMA) καθώς και άγνωστα στοιχεία χαμηλού μοριακού βάρους. Τα στοιχεία που προέκυψαν από αυτά τα πειράματα πρότειναν την φωτοχημική φύση της διαδικασίας εκτομής.

Φασματοσκοπικές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί και κατά την εκτομή κερατοειδικών ιστών (Cohen et al., 2001, Ediger, 1991). Σε έρευνα (Ediger, 1991) μετρήθηκε ο υποκινούμενος φθορισμός, ολοκληρούμενος για χρόνο 100ns, από κερατοειδείς κουνελιών τα οποία ακτινοβολήθηκαν με laser χαμηλής έντασης ($\approx 85\text{ mJ/cm}^2$) καθώς και υψηλών εντάσεων ($\approx 950\text{ mJ/cm}^2$). Σε φασματικό παράθυρο εύρους από 250-500nm παρατηρήθηκε η ύπαρξη 2 ευρέων ζωνών φθορισμού για έκθεση του ιστού σε χαμηλές εντάσεις, ενώ μόνο η μία από τις 2 ζώνες ήταν ορατή σε έκθεση σε υψηλότερες εντάσεις.

Ο φθορισμός επίσης μετρήθηκε και από κερατοειδείς χοιρινών, με το σήμα φθορισμού να ολοκληρώνεται για χρονικό διάστημα 1μs το οποίο ξεκινούσε αμέσως μετά από το τέλος του παλμού του laser. Σε πολύ υψηλές εντάσεις ενέργειας ($2\text{J}/\text{cm}^2$), οι ζώνες εκπομπής που παρατηρήθηκαν αποδόθηκαν στην ύπαρξη των στοιχείων C, Na, H, N και O. Όμως, μόνο μία πολύ πλατιά ζώνη φθορισμού παρατηρήθηκε ανάμεσα στα 200-800nm όταν οι κερατοειδείς εκτίθονταν σε κλινικές συνθήκες με εντάσεις κάτω από $500\text{mJ}/\text{cm}^2$. Η διακριτή κορυφή εκπομπής σε υψηλές εντάσεις ενέργειας, πιστεύεται ότι είναι αποτέλεσμα ασθενούς πλάσματος. Οι Cohen et al., 2001 μετρήσαν το φάσμα εκπομπής από 200-900 nm με εντάσεις πυκνότητας ενέργειας στα $170\text{mJ}/\text{cm}^2$, όπου εξήχθησαν ποιοτικά αποτελέσματα τα οποία δεν έδειχναν κάποιο κλινικό ενδιαφέρον.

Οι φασματοσκοπικές μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι τώρα, τόσο σε πολυμερή όσο και σε κερατοειδικούς ιστούς, είναι περισσότερο ποιοτικές και χωρίς σημαντικά συμπεράσματα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, χρήσιμα φάσματα επιτυγχάνονταν σε εντάσεις ενέργειας πολύ ψηλότερες από τις κλινικές τιμές. Πιο προσεχτικές φασματοσκοπικές μελέτες, όπως φυσική εκπομπή ή LIF, αναμένεται να δώσουν περισσότερα στοιχεία για την διαδικασία εκτομής.

Μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους που αφορούν την διαθλαστική χειρουργική είναι ο ρυθμός φωτοαποδόμησης (ablation rate) του κερατοειδή. Η εύρεση του ρυθμού φωτοαποδόμησης ενός οποιαδήποτε υλικού είναι μια σχετικά απλή διαδικασία: αρκεί να εκτεθεί το υλικό σε επαναλαμβανόμενους παλμούς του laser και στην συνέχεια να διαιρεθεί το βάθος του κρατήρα εκτομής από τον συνολικό αριθμό των παλμών. Το πρόβλημα σε αυτή την περίπτωση έγκειται σε ότι αφορά τη μέτρηση του βάθους εκτομής με ακρίβεια. Για το λόγο αυτό έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι μέτρησης του βάθους εκτομής, όπως η εστίαση ενός μικροσκοπίου υψηλής μεγέθυνσης στην άθικτη επιφάνεια του ματιού και στην συνέχεια μέτρηση με ένα μικρόμετρο της απόστασης που πρέπει να διασχίσει το μικροσκόπιο μέχρι να επανεστιάσει στο βάθος του κρατήρα.

Βρέθηκε, από μελέτη κατά την οποία καταγραφόταν ο αριθμός των βολών laser που απαιτούνταν για την διάτρηση δείγματος γνωστού πάχους ότι ο ρυθμός εκτομής του κερατοειδικού ιστού είναι $0.27\mu\text{m}$ ανά παλμό σε εντάσεις ενέργειας $180\text{mJ}/\text{cm}^2$ (Campos et al., 1993). Ακόμη με την χρήση βιντεογραφίας Scheimpflug για την in vivo μέτρηση της καμπυλότητας ανθρώπινων κερατοειδών πριν και μετά την επέμβαση, βρέθηκε ότι ο ρυθμός εκτομής κυμαίνεται από 0.23-0.30 $\mu\text{m}/\text{παλμό}$ (Huebscher et al., 1996). Ένας περιορισμός στην μέθοδο αυτή είναι η υπόθεση ότι οι αλλαγές στην καμπυλότητα του κερατοειδή από την αρχή ως το τέλος της διαδικασίας εκτομής είναι αποτέλεσμα μόνο της αφαίρεσης ιστού, ενώ στην πραγματικότητα η καμπυλότητα του κερατοειδή μπορεί να επηρεάζεται και από αλλαγές στην ενυδάτωση του κερατοειδή. Ακόμη ο ρυθμός εκτομής μετρήθηκε σε οφθαλμούς βοδινών με τον υπολογισμό των διαφορών στο βάρος του ιστού πριν και μετά την εκτομή και πραγματοποιώντας διορθώσεις που αφορούσαν την αλλαγή της ενυδάτωσης χρησιμοποιώντας δείγματα ελέγχου (Dougherty et al., 1994).

Ο μέσος όρος του ρυθμού εκτομής του κερατοειδή καθορίστηκε σύμφωνα με τα αρχικά κλινικά συμπεράσματα και χρησιμοποιείται πλέον εμπειρικά στις διαθλαστικές επεμβάσεις. Παρόλα αυτά δεν υπάρχει κάποια μέθοδος για την πρόβλεψη του ακριβούς ρυθμού αποδόμησης του κερατοειδούς κάθε συγκεκριμένου ασθενή λόγω της μη επακριβής γνώσης του πραγματικού μηχανισμού που λαμβάνει χώρα κατά την αποδόμηση με excimer laser.

Από τις μελέτες που πραγματοποιήθηκαν για την εύρεση του ρυθμού αποδόμησης προέκυψε ότι ο ρυθμός αποδόμησης αποτελεί συνάρτηση της έντασης του laser ενώ συσχετίζεται ισχυρά και με τον ρυθμό ενυδάτωσης του κερατοειδούς. Μάλιστα ο υγρός κερατοειδής εκτέμνεται λιγότερο από έναν ξηρό, ενώ αλλαγές στην ενυδάτωση του κερατοειδή έχουν ως αποτέλεσμα 10-15% σφάλμα στην διαθλαστική διόρθωση (Lin et al., 1993, McDonald et al., 1988). Οι Dougherty et al. (1994) μελέτησαν διάφορους ρυθμούς αποδόμησης, οι οποίοι συμπεριελάμβαναν ενυδατωμένους κερατοειδικούς ιστούς καθώς και ξηρούς. Χρησιμοποίησαν ως όρο τον “dry ablation component rate” δηλαδή τον ρυθμό αποδόμησης των ξηρών συστατικών, που οριζόταν ως τη μάζα του κολλαγόνου και των θεμελιωδών συστατικών που αφαιρούνταν ανά παλμό, και βρήκαν ότι αύξανε με την μειωμένη ενυδάτωση του ιστού, ενώ μειωνόταν με την αύξηση της ενυδάτωσης του ιστού. Από στατιστικές μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στις ΗΠΑ επαληθεύθηκε η εξάρτηση του ρυθμού αποδόμησης από την ενυδάτωση του κερατοειδή, καθώς βρέθηκε στατιστικά σημαντική εξάρτηση των αποτελεσμάτων διαθλαστικών επεμβάσεων με την υγρασία. Σε ένα γενικότερο πλαίσιο, η πλειοψηφία των ερευνητών συμφωνεί ότι ο ρυθμός ενυδάτωσης του κερατοειδή μπορεί να επηρεάσει άμεσα τον ρυθμό αποδόμησης του κερατοειδικού ιστού κατά την ακτινοβολήση του με excimer laser στα 193nm.

Για την ποσοτικοποίηση των παραγόντων που πιθανώς να επηρεάζουν την κερατοειδική ενυδάτωση κατά την διάρκεια της επέμβασης, οι Pallikaris et al. (1998) ερεύνησαν την χρήση της φασματοσκοπικής τεχνικής LIBS για την καταγραφή της κερατοειδικής ενυδάτωσης. Αναφέρουν ότι η ένταση των ατομικών γραμμών εκπομπής του υδρογόνου παρέμενε σταθερή, ενώ η ένταση της ατομικής εκπομπής του ασβεστίου διαφοροποιόταν συναρτήσει της κερατοειδικής ενυδάτωσης. Με την τεχνική LIBS γίνεται χρήση δέσμης laser ενέργειας δεκάδων mJ για την εξάτμιση μικρού δείγματος του κερατοειδικού ιστού, με αποτέλεσμα την ύπαρξη ισχυρού shock wave και την εκπομπή ορατής ακτινοβολίας.

Μία ακόμη φασματοσκοπική τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή της ενυδάτωσης του κερατοειδή είναι η φασματοσκοπία Raman. Στην φασματοσκοπία Raman χρησιμοποιείται συνήθως ως πηγή διέγερσης συνεχές laser για την διερεύνηση των δονητικών ενεργειών των δεσμών των μορίων, μέσω της ανελαστικής σκέδασης του φωτός.

Ο κερατοειδής μπορεί να υποστεί απευθείας ανάλυση Raman λόγω της σύνθεσης του. Το κολλαγόνο και οι πρωτεΐνες που βρίσκονται στον κερατοειδή, έχουν χαρακτηριστικές δονητικές συχνότητες, γνωστές ως Raman bands. Συγκεκριμένα η ζώνη στα 2940cm^{-1} ανταποκρίνεται στον δεσμό C-H. Το νερό, το οποίο αποτελεί το 75% της σύστασης ενός υγιούς κερατοειδούς,

επιδεικνύει μία φαρδιά Raman band από τα 3000-3700 cm^{-1} η οποία ανταποκρίνεται στον δεσμό O-H.

Οι Jongsma et al.(1997) περιγράφουν τη χρήση ενός συνεστιακού συστήματος Raman, για την *in vitro* ανάλυση σε οφθαλμούς κουνελιών, όπου η διέγερση του δείγματος και η συλλογή του σκεδαζόμενου φωτός πραγματοποιούνταν μέσω ενός συνεστιακού αντικειμενικού μικροσκοπίου.

Το συνεστιακό σύστημα Raman , επιτρέπει την διερεύνηση του βαθμού ενυδάτωσης κατά βάθος του κερατοειδή. Οι Bauer et al. (1998) μέτρησαν την ενυδάτωση του κερατοειδούς κουνελιών *in vivo* και *in vitro* καθώς και σε δείγματα που προσομοίωναν το κερατοειδή και χρησιμοποιώντας το κλάσμα της έντασης της ζώνης O-H προς την ένταση της ζώνης C-H , βρήκαν ότι η ενυδάτωση ήταν σταθερή μέσα σε ένα δείγμα αλβουμίνης με ομοιόμορφη κατανομή νερού.

Σκοπός της παρούσας μελέτης είναι μέσα από την χρήση φασματοσκοπικών μεθόδων να μελετηθούν οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την ακτινοβολήση του κερατοειδούς με excimer laser ArF στα 193nm, για διαφορετικές επιφανειακές πυκνότητες ενέργειας. Επίσης μελετάται κατά πόσο είναι ωφέλιμη η καταγραφή του φάσματος εκπομπής κατά την διάρκεια μιας διαθλαστικής επέμβασης. Στο φάσμα εκπομπής που προκύπτει λόγω της αλληλεπίδρασης laser – κερατοειδούς ενδέχεται να υπάρχουν πληροφορίες, χρήσιμες για την εκτίμηση της ενυδάτωσης του κερατοειδούς κατά την διάρκεια διαθλαστικής χειρουργικής. Το καινοτόμο στην παρούσα μελέτη, είναι ότι τα αποτελέσματα που εξήχθησαν για την συσχέτιση της ενυδάτωσης του κερατοειδούς με τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του κατεγραφόμενου φάσματος εκπομπής , ανταποκρίνονται σε συνθήκες που προσομοίωναν στο μεγαλύτερο δυνατό βαθμό της κλινικές συνθήκες που επικρατούν κατά την επέμβαση διαθλαστικής χειρουργικής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

Σχεδίαση πειράματος

3.1) Οργανολογία

Οι πειραματικές μετρήσεις χωρίζονται σε δύο μέρη, όπου σε κάθε ένα από αυτά τα μέρη χρησιμοποιήθηκε ως πηγή διέγερσης παλμικό excimer laser διαφορετικού μήκους κύματος.

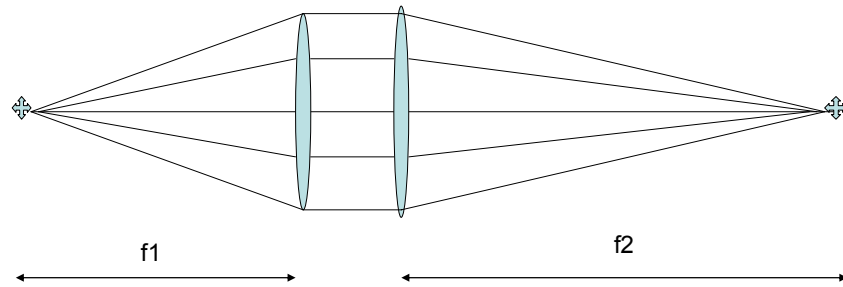
Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το excimer laser AG Braggstar 200, KrF (Krypton Fluoride) της TuiLaser με μήκος κύματος εκπομπής στα 248 nm (χρονική διάρκεια παλμού 10 ns) ενώ στο δεύτερο πειραματικό μέρος χρησιμοποιήθηκε το excimer laser AG Braggstar 200, ArF (Argon Fluoride) της TuiLaser με μήκος κύματος εκπομπής στα 193nm και χρονική διάρκεια παλμού 10 nsec. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με ρυθμό επανάληψης (repetition rate) 5Hz, ενώ οι επιθυμητές τιμές ενέργειας επιτυγχάνονταν με την χρήση κατάλληλων attenuator. Η δέσμη του laser εστιαζόταν στο δείγμα με την χρήση κατάλληλων οπτικών σε spot του οποίου το εμβαδό υπολογιζόταν σε κάθε πείραμα.

Κατάλληλα οπτικά, διαφορετικά στα δύο πειραματικά μέρη, χρησιμοποιήθηκαν για την καθοδήγηση της δέσμης του laser. Για τα πειράματα με το excimer laser KrF χρησιμοποιήθηκαν διχροϊκοί καθρέφτες με μέγιστη ανακλαστικότητα στα 248 nm, ενώ για το excimer laser ArF οι καθρέφτες που χρησιμοποιήθηκαν εμφάνιζαν μέγιστη ανακλαστικότητα στα 193 nm. Για την επιλογή της επιθυμητής ενέργειας χρησιμοποιήθηκαν attenuator από 0°-45°, στα 248 nm στην πρώτη περίπτωση και στα 193 nm στην δεύτερη. Κάθε φορά που πραγματοποιούταν κάποιο πείραμα γινόταν βαθμονόμηση της ενέργειας συναρτήσει της θέσης του attenuator για να είναι γνωστή η τιμή της ενέργειας με την οποία πραγματοποιούταν οι μετρήσεις.

Συλλογή και ανάλυση εκπεμπόμενου σήματος

Για την εκπόνηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές διατάξεις, όπου και στις δύο το δείγμα τοποθετούνταν κάθετα στην δέσμη του laser και τα οπτικά σε συνδυασμό με την οπτική ίνα για την συλλογή του σήματος τοποθετούνταν σε γωνία 45° σχετικά με την προσπίπτουσα δέσμη. Για την όσο το δυνατό καλύτερη συλλογή του εκπεμπόμενου σήματος χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη διάταξη οπτικών όπου εστίαζαν το σήμα πάνω στην οπτική ίνα. Έτσι στο πρώτο μέρος των πειραμάτων (KrF, 248 nm) τοποθετούνταν σε γωνία 45° από την προσπίπτουσα δέσμη και σε απόσταση 5 cm από το δείγμα, συγκλίνων φακός εστιακής απόστασης $f_1=5\text{cm}$ ενώ πίσω από αυτόν είχε τοποθετηθεί συγκλίνων φακός εστιακής απόστασης

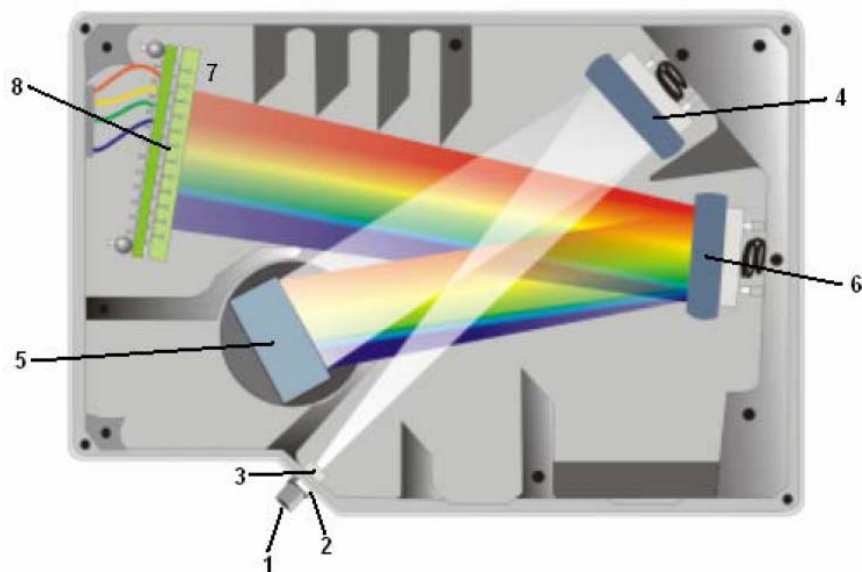
$f_2=7,5$ cm, με αποτέλεσμα η ακτινοβολία που συλλεγόταν να εστιάζεται σε οπτική ίνα η οποία βρισκόταν σε απόσταση 7,5 cm από τον δεύτερο φακό.



Εικόνα 33: Οπτική διάταξη επιπεδόκυλων φακών διαφορετικής εστιακής απόστασης για την συλλογή και εστίαση του συλλεγόμενου σήματος στην οπτική ίνα ($f_1=5$ cm, $f_2=7,5$ cm)

Μπροστά από την οπτική ίνα παρεμβαλλόταν κατάλληλο φίλτρο για την απορρόφηση της ακτινοβολίας του laser που σκεδαζόταν από την επιφάνεια του δείγματος. Στο δεύτερο μέρος των πειραμάτων λόγω του περιορισμένου χώρου ακολουθήθηκε η ίδια μεθοδολογία για την συλλογή της ακτινοβολίας εκπομπής με την διαφορά ότι στην περίπτωση αυτή τοποθετήθηκε πρώτα ο συγκλίνων φακός των 7,5 cm σε απόσταση 7,5 cm από το δείγμα και μετά ο συγκλίνων φακός εστιακής απόστασης 5 cm, ο οποίος εστίαζε το φάσμα εκπομπής στην οπτική ίνα που ήταν τοποθετημένη σε απόσταση 5 cm από αυτόν.

Και στις δύο περιπτώσεις για την καταγραφή του φάσματος χρησιμοποιήθηκε ο φασματογράφος ocean optics **HR4000** με τον ανιχνευτή **HR4000CG-UV-NIR**. Η αρχή λειτουργίας του φασματογράφου έχει ως εξής:

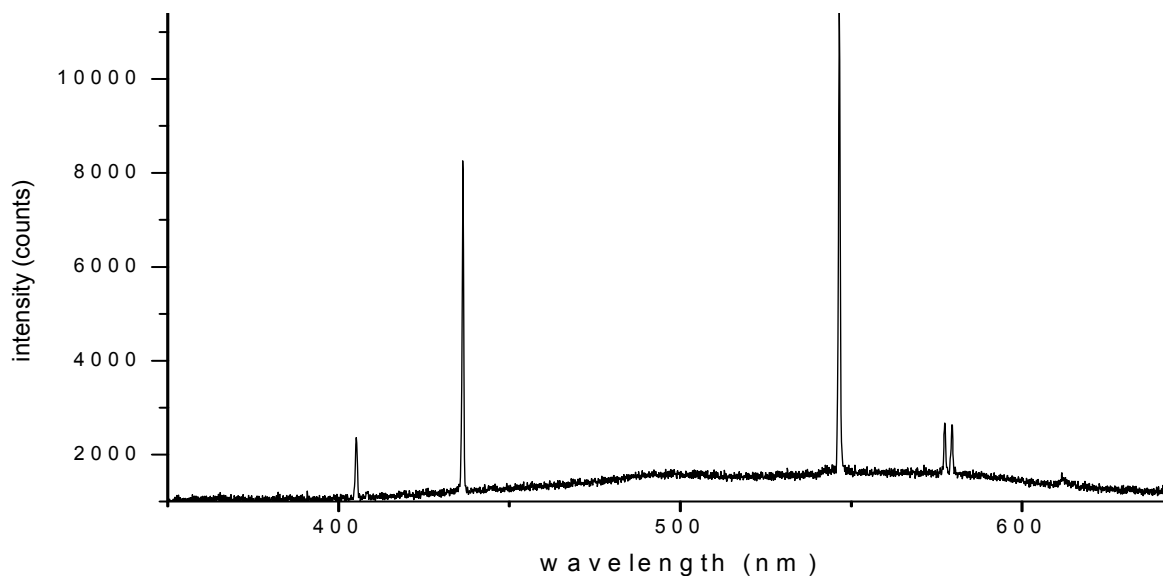


Εικόνα 34: Τομή φασματογράφου ocean optics

1. Στο σημείο αυτό συνδέεται η οπτική ίνα με τον φασματογράφο. Η οπτική ίνα μεταφέρει το ανιχνευόμενο φως μέσω αυτού του συνδετήρα, μέσα στον φασματογράφο.

2. Πίσω από τον συνδετήρα σύζευξης συνδέεται ένα σκουρόχρωμο υλικό το οποίο περιλαμβάνει ένα ορθογώνιο άνοιγμα. Το μέγεθος του ανοίγματος ρυθμίζει το ποσό του φωτός που εισέρχεται στον φασματογράφο και ρυθμίζει την φασματική ανάλυση.
3. Στη συνέχεια τοποθετείται φίλτρο το οποίο περιορίζει την οπτική ακτινοβολία σε προκαθορισμένες περιοχές του μήκους κύματος. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν φίλτρα είτε bandpass είτε longpass για να περιορίσουν τη ακτινοβολία σε συγκεκριμένες περιοχές του φάσματος.
4. Η εισερχόμενη ακτινοβολία κατευθύνεται προς ένα καθρέφτη ευθυγράμμισης , ο οποίος εστιάζει το φως στο grating του φασματογράφου.
5. Στη συνέχεια το grating προκαλεί διάθλαση στο φως που εστιάζεται πάνω του από τον καθρέφτη , και κατευθύνει το διαθλωμένο φως στον καθρέφτη εστίασης. Υπάρχουν διαθέσιμα grating διαφορετικής πυκνότητας γραμμών ώστε να μπορεί να επιλεγεί το κατάλληλο για την επιθυμητή ανάλυση του φασματογράφου και την περιοχή του φάσματος που επιθυμείτε να γίνει η ανίχνευση.
6. Ο καθρέφτης εστίασης , εστιάζει το διαθλωμένο φως είτε στον CCD ανιχνευτή είτε σε ανιχνευτή συλλογής καθρεφτών.
7. Ο ανιχνευτής συλλογής καθρεφτών αποτελεί ένα προαιρετικό εξάρτημα που τοποθετείται πάνω στον ανιχνευτή CCD, και εστιάζει το φως από μία λεπτή σχισμή στα κοντύτερα στοιχεία του ανιχνευτή CCD.
8. Ο ανιχνευτής CCD (στο υπεριώδες ή στο ορατό) συλλέγει το φως από τον καθρέφτη εστίασης ή τον Detector Collection Lens και μετατρέπει το οπτικό σήμα σε ψηφιακό. Το κάθε pixel του ανιχνευτή CCD ανταποκρίνεται στο μήκος κύματος του φωτός που προσέκρουσε πάνω του, δημιουργώντας μία ψηφιακή απόκρισή. Στην συνέχεια ο φασματογράφος μεταφέρει το ψηφιακό σήμα στο υπολογιστικό πρόγραμμα OOIBase3 με το οποίο πραγματοποιείται η οπτική αναπαράσταση του φάσματος.

Ο συγκεκριμένος φασματογράφος εμφάνιζε ευαισθησία στην περιοχή από 300-600 nm, με ευαισθησία 0,13 nm. Για να ελεγχθεί το σφάλμα του φασματογράφου καταγράφηκε το φάσμα από λάμπα υδραργύρου και έγινε σύγκριση των κατεγγραφόμενων γραμμών εκπομπής με τις γνωστές τιμές .Στο φάσμα παρατηρήθηκαν 5 χαρακτηριστικές γραμμές της λάμπας υδραργύρου (οι οποίες βρίσκονταν μέσα στην φασματική ευαισθησία του φασματογράφου) και πραγματοποιήθηκε σύγκρισή με τις γνωστές τιμές.



Εικόνα 35: Ανιχνεύσιμο φάσμα λάμπας Hg από τον φασματογράφο ocean optics

Πίνακας 6: Σύγκριση γνωστών ατομικών γραμμών εκπομπής από λάμπα Hg , με τις τιμές που ανιχνεύτηκαν από τον φασματογράφο ocean optics

ocean optics (nm)	λ Hg (nm)	$\Delta\lambda$ (nm)
405,19	404,656	0,534
436,36	435,833	0,527
546,56	546,077	0,483
577,4	576,96	0,44
579,43	579,066	0,364

Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα γίνεται η παραδοχή ότι το σφάλμα του φασματογράφου είναι περίπου $0,47 \pm 0,07$ nm.

3.2) Μεθοδολογία

Για την πραγματοποίηση των μετρήσεων χρησιμοποιήθηκαν ιστοί κερατοειδούς από οφθαλμούς υγείων κουνελιών οι οποίοι αφαιρέθηκαν αμέσως μετά από την θανάτωση τους, ενώ τα πειράματα που αφορούσαν την ενυδάτωση του κερατοειδούς πραγματοποιήθηκαν με δείγματα κερατοειδών που αφαιρέθηκαν από οφθαλμούς χοίρων. Μέρος των πειραμάτων πραγματοποιήθηκε με ένα υλικό το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως πειραματικό μοντέλο και το οποίο εμφάνιζε τις οπτικές και μηχανικές ιδιότητες του κερατοειδούς. Το υλικό αυτό ονομάζεται PALM (Photo- Ablatable Lenticular Modulator και προσομοιώνει σε πολύ μεγάλο βαθμό την σύσταση του κερατοειδούς (Katsanevaki et al., 2003).

Ουσιαστικά το υλικό αυτό είναι ένα τζελ το οποίο κατασκευάζεται από ζελατίνη τύπου A η οποία προέρχεται από δέρμα χοιρινών και από έναν πολυσακχαρίτη, την carrageenan K τύπου III. Τα

συστατικά αυτά αναμειγνύονται σε κατάλληλες ποσότητες με αντίστοιχη ποσότητα νερού κατάλληλης θερμοκρασίας για να κατασκευαστεί το τζελ.

Το υλικό αυτό όντας θερμοαντιστρέψιμο μπορεί να φυλαχθεί σε θερμοκρασία δωματίου σε στερεή κατάσταση. Όταν θερμαίνεται στους 49°C, υγροποιείται σε ένα ρευστό υψηλής ελαστικότητας ενώ στερεοποιείται εκ νέου όταν αφαιρεί σε θερμοκρασία δωματίου.

Κατά την διάρκεια των πειραμάτων ποσότητα του υλικού φυλασσόταν σε ψυγείο ώστε να παραμένει σε σταθερή θερμοκρασία. Για να μπορέσει να χρησιμοποιηθεί το υλικό, μέρος της ποσότητας του υλικού θερμαινόταν στους 49° C, ώστε να υγροποιηθεί και εν συνεχεία τοποθετούνταν σε πλακίδιο quartz σχηματίζοντας μία μεμβράνη σταθερού πάχους και ομοιογενούς σύνθεσης. Το υλικό σχεδόν αμέσως στερεοποιούταν και για να αποφευχθεί η αφυδάτωση του μέχρι την πραγματοποίηση του πειράματος, καλυπτόταν με μεμβράνη ώστε να αποφεύγεται η αλληλεπίδραση του υλικού με το περιβάλλον που θα είχε ως αποτέλεσμα την αφυδάτωση του. Το PALM τοποθετούνταν σε πλακίδιο quartz και όχι σε ένα οποιοδήποτε γυάλινο πλακίδιο, γιατί το πλακίδιο quartz δεν φθορίζει και έτσι αποφεύχθηκε ο κίνδυνος μέρος του ανιχνευόμενου φθορισμού να προκύπτει από το πλακίδιο πάνω στο οποίο ήταν τοποθετημένο το υλικό. Αν και ήταν ο γνωστό ότι το πλακίδιο quartz δεν φθορίζει, ελέγχθηκε πριν από την χρήση του η τυχόν εκπομπή φθορισμού από το πλακίδιο κατά την ακτινοβόληση του με excimer laser και τα αποτελέσματα ήταν αρνητικά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

Πειραματικό μέρος

Το πειραματικό μέρος διακρίνεται σε δύο μέρη, σύμφωνα με το μήκος κύματος εκπομπής της πηγής που χρησιμοποιήθηκε για την διέγερση του δείγματος. Και στις δύο περιπτώσεις το μέσο διέγερσης ήταν excimer laser με μήκος κύματος εκπομπής στα 248 nm αρχικά και στα 193 nm στην συνέχεια. Τα πρώτα πειράματα με το excimer laser KrF στα 248 nm, είχαν ερευνητικό κυρίως χαρακτήρα ενώ το κύριο μέρος των πειραμάτων που αφορούσε την μελέτη ύπαρξης συσχέτισης της ενυδάτωσης του κερατοειδούς με τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά, πραγματοποιήθηκαν με το excimer laser ArF στα 193nm και υπό συνθήκες που προσομοίωναν στο δυνατό μέγιστο βαθμό τις κλινικές συνθήκες που επικρατούν κατά τις επεμβάσεις διαθλαστικής χειρουργικής.

4.1) Μετρήσεις με excimer laser KrF στα 248nm

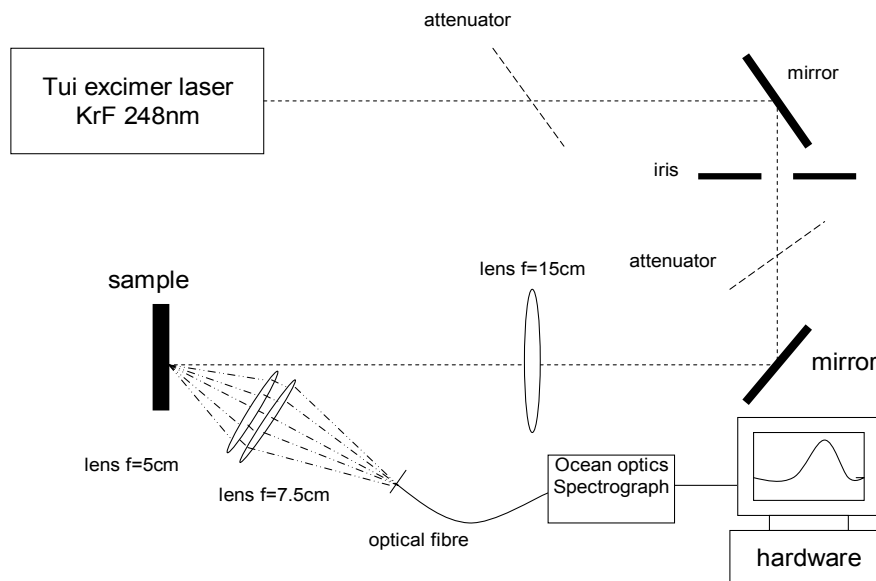
4.1.1) Πειραματική διάταξη

Κατά την διέγερση των δειγμάτων με το excimer laser KrF (248 nm) μελετήθηκε αν και κατά πόσο φθορίζει ο κερατοειδής κατά την αλληλεπίδραση του με laser στα 248nm. Επίσης πραγματοποιήθηκε μελέτη του φάσματος φθορισμού που προκύπτει λόγω αυτής της αλληλεπίδρασης. Στα πειράματα αυτά δεν χρησιμοποιήθηκαν πραγματικοί κερατοειδείς αλλά ένα υλικό το οποίο προσομοιώνει σε μεγάλο βαθμό την σύσταση του κερατοειδή, το PALM, η σύσταση του οποίου αναφέρεται στο κεφάλαιο 3.



Εικόνα 36: Φωτογραφία πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε στην Α φάση των πειραμάτων

Από την σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης παρατηρείται ότι η δέσμη του laser κατά την έξοδο της από το σύστημα laser κατευθυνόταν με την χρήση κατάλληλων ανακλαστικών καθρεφτών προς το δείγμα, το οποίο τοποθετούνταν κάθετα στην δέσμη του laser. Η ένταση της δέσμης του laser πριν από την ακτινοβολία του δείγματος μειωνόταν στα επιθυμητά επίπεδα με την χρήση κατάλληλων attenuator, ώστε να επιτυγχάνεται η επιθυμητή τιμή πυκνότητας ενέργειας.



Εικόνα 37: Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιήθηκε στο πρώτο μέρος των πειραμάτων.

Επειδή στην φασματοσκοπική τεχνική LIF το δείγμα διεγείρεται με δέσμη laser χαμηλής ενέργειας, κρίθηκε αναγκαία η ένταση της ενέργειας να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα, κάτω ή κοντά στο κατώφλι αποδόμησης του κερατοειδή. Για το σκοπό αυτό, κατά την χρήση του excimer laser KrF χρησιμοποιήθηκαν 2 attenuator από 0° - 45° οι οποίοι είχαν ελευθερία γωνιακής περιστροφής και είχαν βαθμονομηθεί ώστε να είναι γνωστή η ένταση της ενέργειας για τις εκάστοτε δυνατές θέσεις των attenuator. Επίσης, χρησιμοποιήθηκε ίριδα αμέσως μετά από τον πρώτο καθρέπτη ώστε να κόβονται οι οπισθοσκεδάσεις και για να διατηρείται ομοιογενής η ένταση της ενέργειας. Μετά τον δεύτερο καθρέπτη τοποθετήθηκε φακός εστιακής απόστασης $f=15\text{cm}$ ο οποίος εστίαζε την δέσμη πάνω στο δείγμα. Το δείγμα τοποθετούνταν σε κατάλληλο μικρομετρικό στήριγμα το οποίο είχε 3 βαθμούς ελευθερίας :πάνω-κάτω, μπροστά-πίσω και δεξιά-αριστερά, ώστε να μπορεί να επιλεγεί το σημείο ακτινοβολίας του δείγματος, ενώ παράλληλα με την κίνηση του mount μπροστά-πίσω το δείγμα απομακρυνόταν από την θέση εστίασης της δέσμης laser, ώστε να μην παρατηρείται μεγάλη επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας και κατ' επέκταση εκτομή του δείγματος.

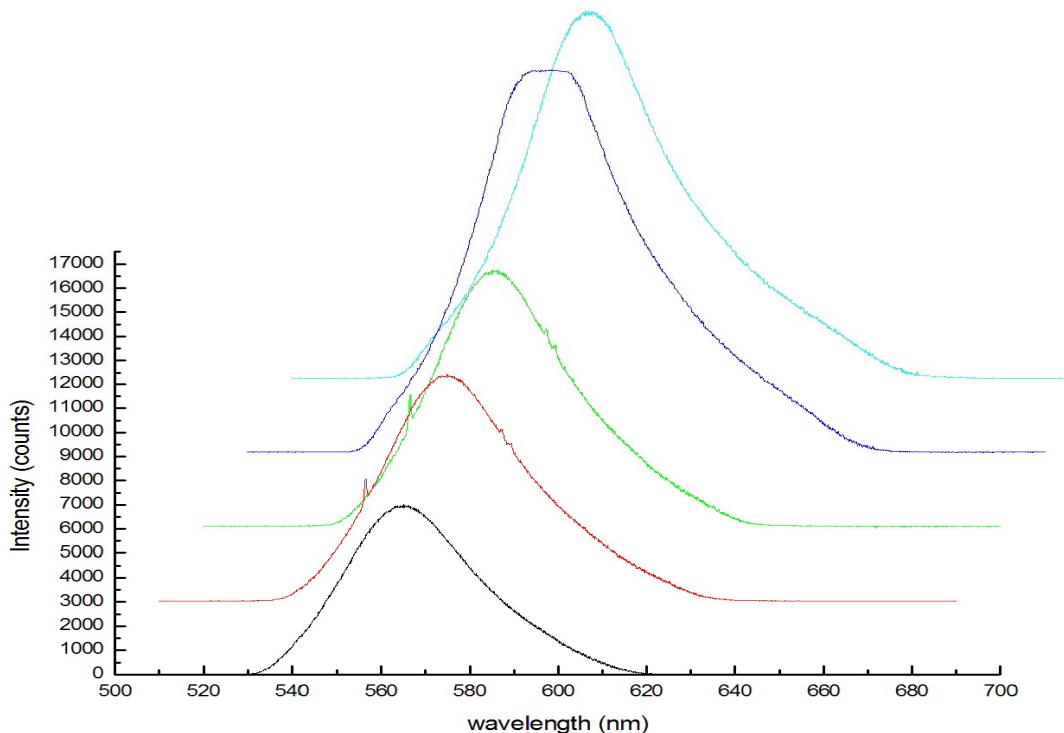
Για την συλλογή της εκπεμπόμενης ακτινοβολίας φθορισμού χρησιμοποιήθηκε σύστημα φακών, εστιακών αποστάσεων $f_1=5\text{cm}$ και $f_2=7.5\text{cm}$, οι οποίοι συνέλλεγαν την ακτινοβολία εκπομπής και την εστίαζαν σε οπτική ίνα, η οποία είχε τοποθετηθεί σε απόσταση ίση με την εστιακή απόσταση

του δεύτερου φακού ($f_2=7.5$ cm). Η οπτική ίνα οδηγούσε το ανιχνευόμενο σήμα στον φασματογράφο ocean optics ο οποίος ήταν συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή, στον οποίο ήταν εγκατεστημένο ειδικό λογισμικό πρόγραμμα, με αποτέλεσμα την on-line καταγραφή του φάσματος φθορισμού κατά την διάρκεια του πειράματος.

Αξιολόγηση συστήματος συλλογής ακτινοβολίας εκπομπής

Για την επίτευξη των καλύτερων δυνατών συνθηκών κατά την διάρκεια των πειραμάτων, στα πρώτα στάδια του πειράματος χρησιμοποιήθηκαν δείγματα ροδαμίνης για την καλύτερη ευθυγράμμιση και βαθμονόμηση της διάταξης, καθώς και για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών (ρυθμού επανάληψης του laser, χρόνο ολοκλήρωσης του ανιχνευτή) για την πραγματοποίηση των πειραμάτων.

Διαπιστώθηκε ότι διατηρώντας σταθερό το ρυθμό επανάληψης και μεταβάλλοντας τον χρόνο ολοκλήρωσης του φασματογράφου σε συνδυασμό με την μέση τιμή των κατεγγραφόμενων φασμάτων ώστε να παραμένουν ίδιοι οι συνολικοί παλμοί που διέγειραν το δείγμα, η ένταση του σήματος αύξανε καθώς μεγάλωνε ο χρόνος ολοκλήρωσης, φτάνοντας όμως σε ένα πλατό. Για χρόνους ολοκλήρωσης μεγαλύτερους των 800 msec δεν πραγματοποιούνταν αύξηση της έντασης του φάσματος.



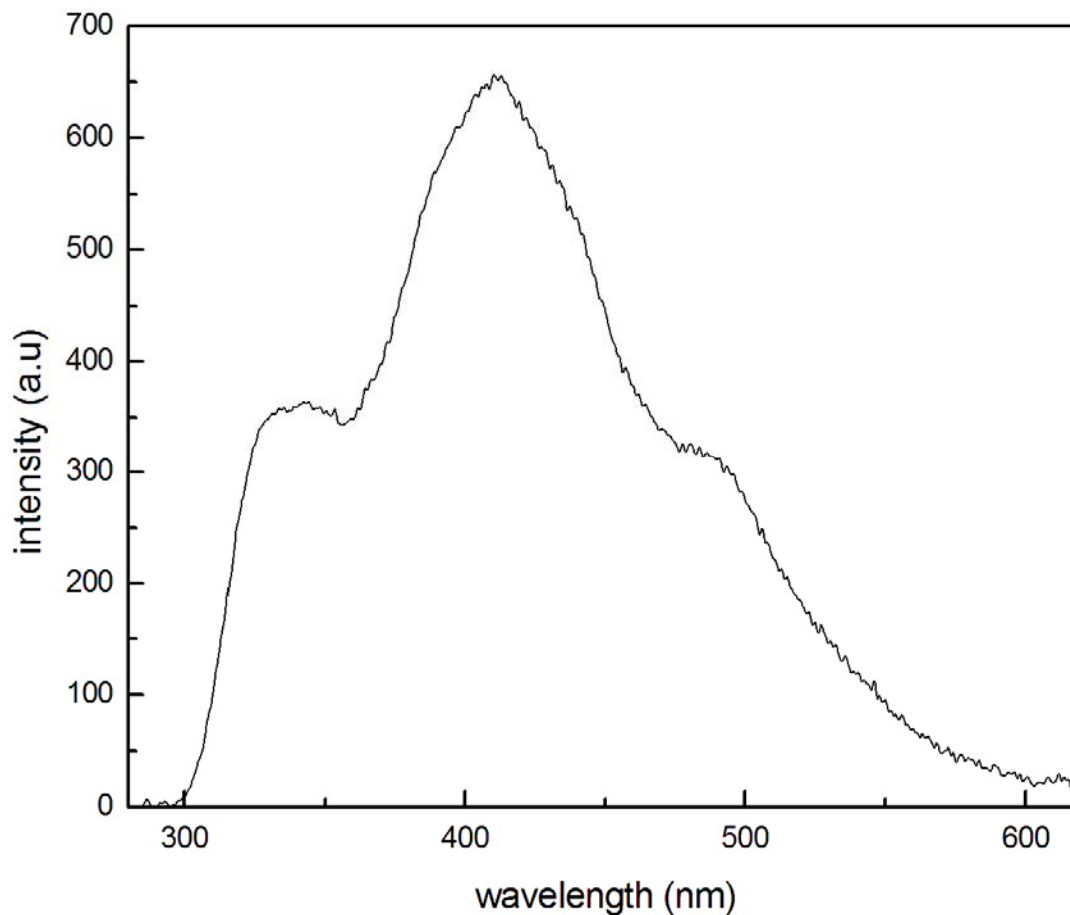
Εικόνα 38: φάσμα εκπομπής φθορισμού ροδαμίνης για integration time: 100ms,400ms,500ms,800ms,1000ms

Παράλληλα διαπιστώθηκε ότι, για το ίδιο set χρόνου ολοκλήρωσης – μέσης τιμής κατεγγραφόμενων φασμάτων η ένταση του σήματος αύξανε καθώς μεγάλωνε ο ρυθμός επανάληψης του laser. Συνυπολογίζοντας όλα τα παραπάνω δεδομένα και λαμβάνοντας υπ’

όψην τις βέλτιστες συνθήκες για την πραγματοποίηση των πειραμάτων αποφασίστηκε ότι οι καλύτερες συνθήκες για την πραγματοποίηση των πειραμάτων ήταν οι εξής :χρόνος ολοκλήρωσης του φασματογράφου 800 ms, μέση τιμή κατεγραφόμενων φασμάτων 10 και ρυθμός επανάληψης 5 Hz. Υπό αυτές τις συνθήκες ήταν γνωστό ότι το δείγμα είχε ακτινοβοληθεί με 40 παλμούς (4παλμούς/integration time * 10 (average)) κάθε φορά που ένα νέο φάσμα καταγραφόταν στην οθόνη του υπολογιστή .

Φάσμα εκπομπής φθορισμού

Ένα τυπικό φάσμα φθορισμού που καταγράφηκε κατά την ακτινοβολήση του υλικού PALM με το excimer laser KrF στα 248nm και πυκνότητα ενέργειας $F=60 \text{ mJ/cm}^2$ είναι το παρακάτω.



Εικόνα 39: Φάσμα από δείγμα PALM , ένταση ενέργειας 60 mJ/cm^2

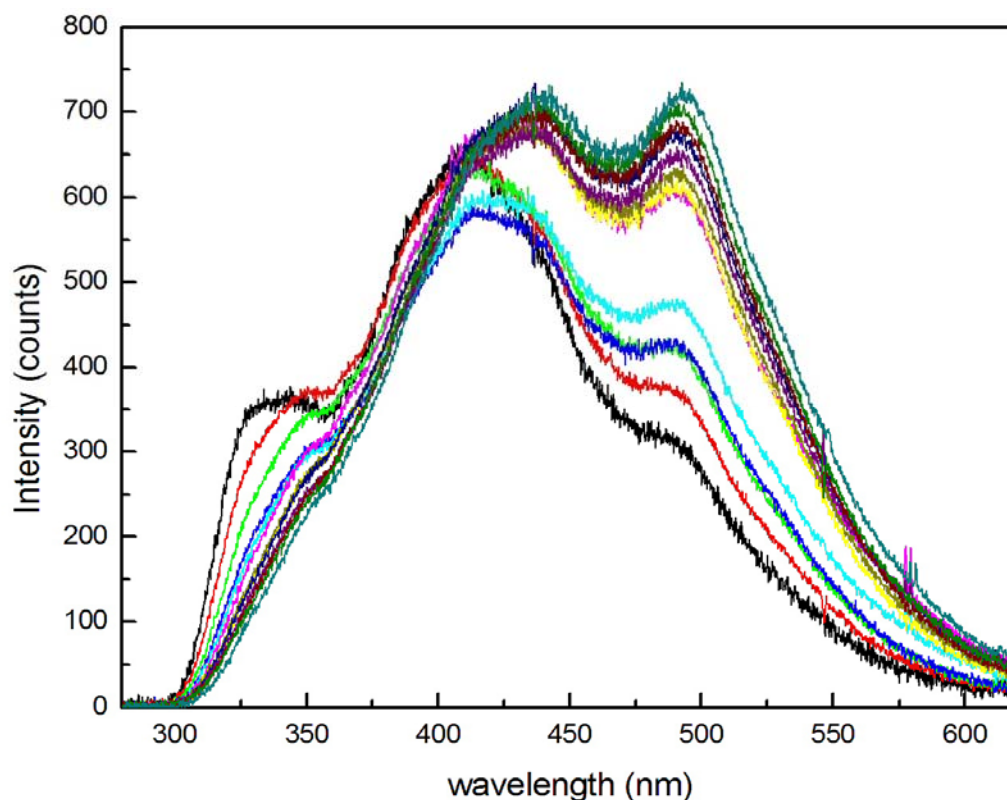
Το παραπάνω φάσμα, καταγράφηκε από δείγμα PALM αμέσως μετά από την προετοιμασία του, με αποτέλεσμα να μην παρατηρούνται φαινόμενα αφυδάτωσης του δείγματος.

Στο φάσμα φαίνονται ξεκάθαρα 3 ξεχωριστές ταινίες: μία γύρω από τα 340 nm, η δεύτερη γύρω από τα 410 nm και η τρίτη γύρω από τα 484 nm. Η κορυφή στα 340 nm πιστεύεται ότι οφείλεται στην ύπαρξη τρυπτοφάνης στο δείγμα και υπάρχει πιθανότητα στην ταινία αυτή να συμβάλει και

η τυροσίνη. Η δεύτερη κορυφή στα 410nm αποδίδεται σε προϊόντα οξειδωσης της τυροσίνης, ενώ η κορυφή στα 484 nm αποδίδεται σε προϊόντα οξειδωσης της φαινυλαλανίνης (DOPA) ενώ ενδέχεται αυτή η κορυφή να οφείλεται στην σκέδαση της δέσμης του laser.

Εξέλιξη φάσματος εκπομπής συναρτήσει παλμών του laser

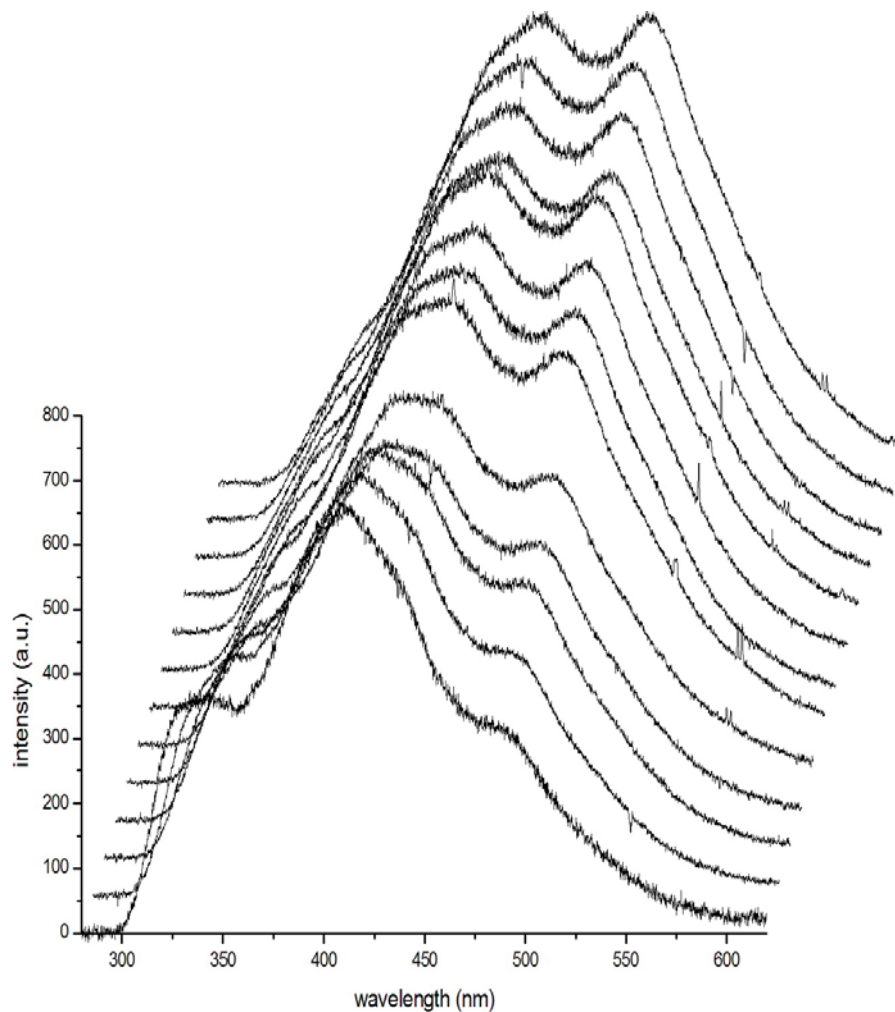
Για την μελέτη των φαινόμενων που λαμβάνουν χώρα κατά την ακτινοβόληση του κερατοειδή, πραγματοποιήθηκε το παρακάτω πείραμα: αφού προετοιμάστηκε δείγμα PALM, το οποίο είχε πάχος περίπου 2 mm, ακτινοβολήθηκε ένα σημείο του και η ακτινοβολία φθορισμού που προέκυπτε λόγω της αλληλεπίδρασης του laser με το δείγμα, καταγράφονταν κάθε 40 παλμούς, ενώ το δείγμα δέχθηκε συνολικά 520 παλμούς. Από την μελέτη των φασμάτων παρατηρείται μεγάλη διαφοροποίηση της μορφής του φάσματος φθορισμού, καθώς το δείγμα έχει ακτινοβοληθεί με όλο και περισσότερους παλμούς, γεγονός που οφείλεται πιθανώς σε φωτοχημικά φαινόμενα.



Εικόνα 40: Εξέλιξη του καταγεγραμμένου φάσματος εκπομπής, κατά την διαδοχική ακτινοβόληση δείγματος PALM με set των 40 παλμών κάθε φορά. Επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας 60 mJ/cm².

Καλύτερη αναπαράσταση της εξέλιξης των φασμάτων φθορισμού που καταγράφηκαν κατά την ακτινοβόληση του δείγματος PALM, πραγματοποιείται στο διάγραμμα της εικόνας 41. Στο διάγραμμα αυτό, το τελευταίο φάσμα είναι μετατοπισμένο σε σχέση με το αρχικό κατά 20% στον άξονα x και 90% στον άξονα y, ώστε να γίνουν ευκολότερα αντιληπτές οι διαφοροποιήσεις στην

μορφή του φάσματος με την περαιτέρω ακτινοβολήση του δείγματος, ενώ το κάθε καταγραφόμενο φάσμα προκύπτει μετά από ακτινοβολήση του δείγματος με 40 παλμούς.



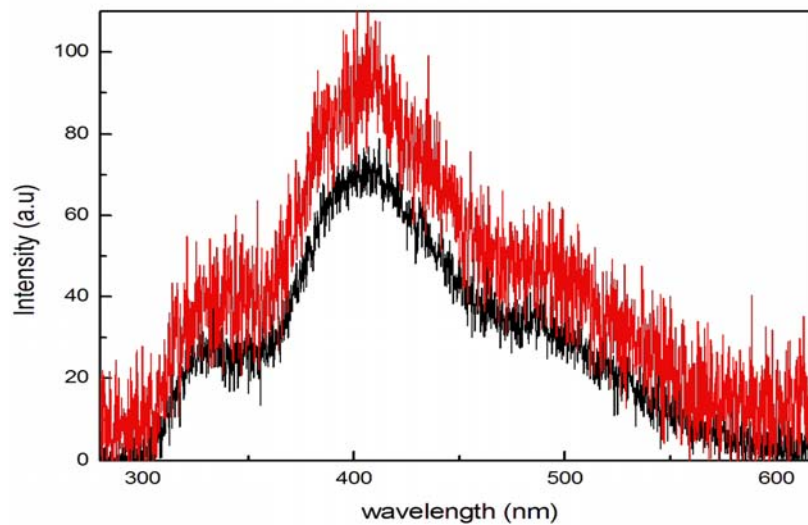
Εικόνα 41: Μετατοπισμένη αναπαράσταση των φασμάτων εκπομπής που καταγράφονται κατά την ακτινοβολήση δείγματος PALM με set των 40 παλμών. Επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας 60 mJ/cm^2 .

Η μορφή του φάσματος φθορισμού διαφοροποιείται καθώς το δείγμα ακτινοβολείται με ένα μεγάλο αριθμό παλμών. Ενώ αρχικά είναι ευδιάκριτες οι 3 μπάντες με κορυφές στα 340 nm, στα 410 nm και στα 484 nm, καθώς το δείγμα δέχεται περισσότερους παλμούς παρατηρείται σημαντική μείωση της έντασης της κορυφής στα 340 nm, ενώ αυξάνει η ένταση της κορυφής στα 484 nm. Οι ευδιάκριτες γραμμές εκπομπής που παρατηρούνται σε κάποια από τα καταγραφόμενα φάσματα οφείλονται στις γραμμές εκπομπής από τις λάμπες Hg που βρίσκονταν στο χώρο πραγματοποίησης των πειραμάτων.

Μία πιθανή εξήγηση του παραπάνω φαινομένου, ενδεχομένως να βρίσκεται στην ύπαρξη φωτοχημικών φαινομένων που λαμβάνουν χώρα κατά την ακτινοβολήση του δείγματος, ενώ δεν αποκλείεται η πιθανότητα κατά την ακτινοβολήση του δείγματος να συσσωρεύεται νερό από τις γειτονικές περιοχές στην περιοχή ακτινοβολήσης, το οποίο με την σειρά του να συμβάλει στην διαφοροποίηση του φάσματος φθορισμού.

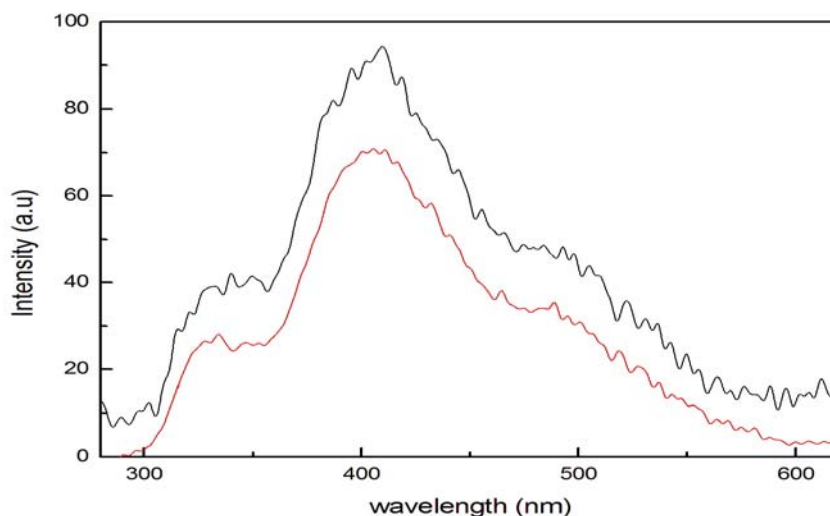
Ο ισχυρισμός ότι λόγω της συνεχής ακτινοβόλησης του ίδιου σημείου παρατηρείται εκτομή του δείγματος με αποτέλεσμα η αλλαγή της μορφής του φάσματος φθορισμού να οφείλεται στην ύπαρξη διαφορετικών δομικών συστατικών που βρίσκονται σε βαθύτερα στρώματα του δείγματος δεν φαίνεται να είναι δόκιμη, λόγω της ομοιογενούς σύστασης του δείγματος.

Υπήρχε το ενδεχόμενο οι παρατηρούμενες αλλαγές στα φάσματα φθορισμού να προέρχονταν και από πιθανή αφυδάτωση του δείγματος. Για τον έλεγχο αυτής της υπόθεσης, μετά το πέρας του πειράματος καταγράφηκε το φάσμα φθορισμού από διάφορα σημεία του δείγματος τα οποία δεν είχαν ακτινοβοληθεί και συγκρίθηκαν με φάσματα που ελήφθησαν κατά την έναρξη του πειράματος, όπου το δείγμα ήταν πλήρως ενυδατωμένο. Τα αποτελέσματα από την παραπάνω σύγκριση φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα:



Εικόνα 42: Σύγκριση αφυδατωμένου (μαύρο) με ενυδατωμένο (κόκκινο) δείγμα PALM. Επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας 60 mJ/cm^2

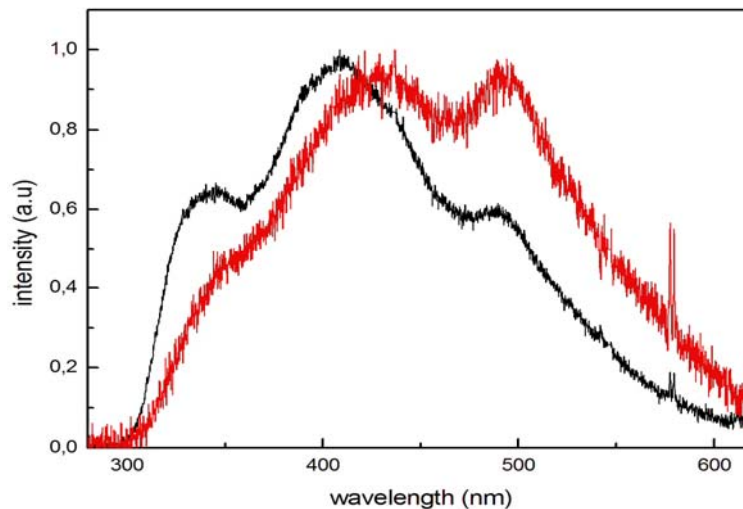
Πραγματοποιήθηκε επεξεργασία και στα δύο φάσματα ώστε να είναι πιο ευδιάκριτες οι τυχόν ομοιότητες ή διαφορές:



Εικόνα 43: Σύγκριση αφυδατωμένου (μαύρο) με ενυδατωμένο (κόκκινο) δείγμα PALM. Τα παραπάνω φάσματα έχουν υποστεί επεξεργασία ομαλοποίησης (smoothing) Επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας 60 mJ/cm^2 .

Είναι εμφανής η ομοιότητα στην μορφή των δύο φασμάτων με μια μικρή διαφοροποίηση που παρατηρείται σε ότι αφορά την ένταση του φάσματος φθορισμού, αλλά όπως αποδεικνύεται στην συνέχεια η ένταση του καταγεγραμμένου φάσματος δεν αποτελεί μία αξιόπιστη πληροφορία.

Για να μελετηθεί η διαφοροποίηση στην μορφή του φάσματος που καταγράφεται από δείγμα ίδιας ενυδάτωσης, σε ότι αφορά το πλήθος των παλμών με τους οποίους ακτινοβολήθηκε το δείγμα, πραγματοποιήθηκε σύγκριση του φάσματος που καταγράφηκε από πλήρως ενυδατωμένο δείγμα PALM κατά την ακτινοβολήση του με 40 παλμούς με το φάσμα που καταγράφηκε κατά την ακτινοβολήση πλήρως ενυδατωμένου δείγματος PALM με 520 παλμούς. Τα φάσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα:

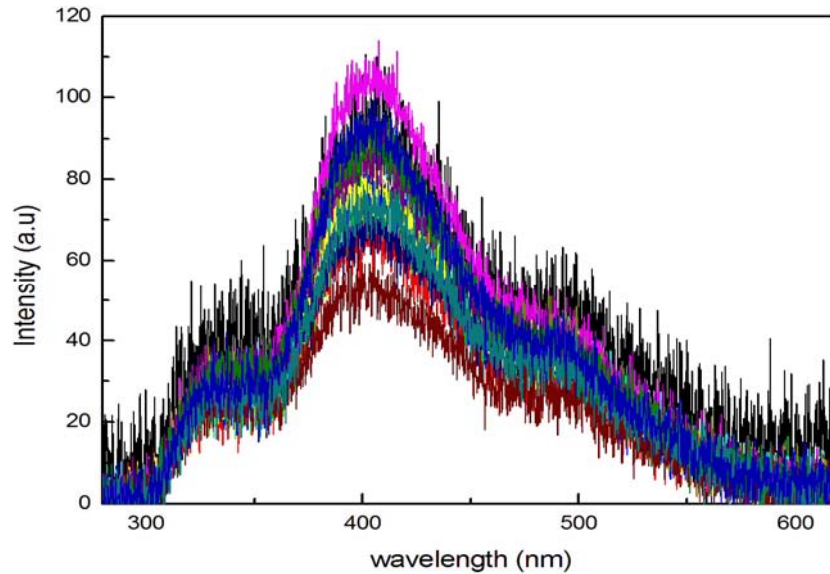


Εικόνα 44: Φάσμα που προκύπτει κατά την ακτινοβολήση δείγματος PALM με 40 παλμούς (μάυρο) σε σύγκριση με φάσμα που καταγράφηκε κατά την ακτινοβολήση δείγματος PALM με 520 παλμούς (κόκκινο). Και τα δύο δείγματα ήταν ίδιας ενυδάτωσης (επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας ακτινοβολήσης 60 mJ/cm^2).

Για την καλύτερη μελέτη των δύο φασμάτων πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση ως προς την μεγαλύτερη κορυφή του κάθε φάσματος. Καθώς δείγματα ίδιας ενυδάτωσης ακτινοβολούνται με σημαντικά διαφορετικό αριθμό παλμών, παρατηρείται μια σημαντική διαφοροποίηση στην μορφή του φάσματος φθορισμού. Η διαφοροποίηση αυτή, αφού αποκλείστηκε η πιθανότητα να οφείλεται σε παράγοντες όπως η ενυδάτωση, αποδίδεται σε φωτοχημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν μέρος κατά την διάρκεια αλληλεπίδρασης του laser με το δείγμα.

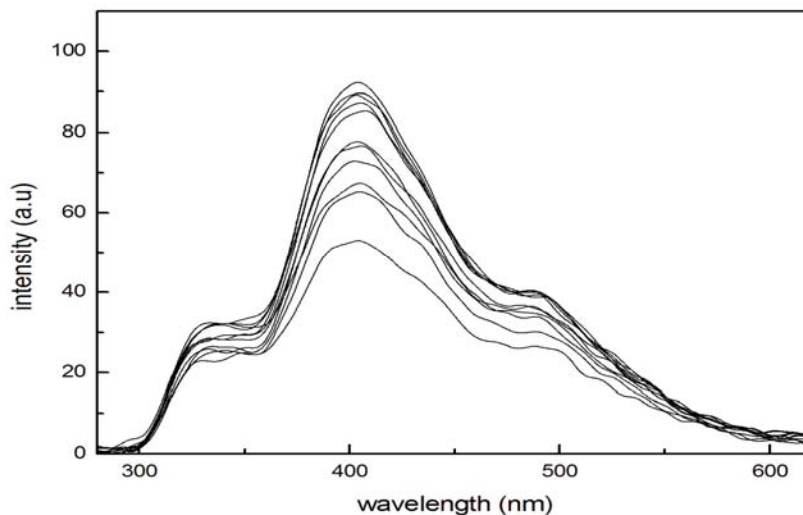
Ένταση φθορισμού.

Αντικείμενο έρευνας αποτέλεσε και η σύγκριση των φασμάτων φθορισμού που καταγράφονταν από διαφορετικά σημεία του ίδιου δείγματος. Για τον σκοπό αυτό ακτινοβολήθηκαν διαφορετικά σημεία δείγματος PALM και τα καταγεγραμμένα φάσματα φθορισμού παρουσιάζονται στην εικόνα 47:



Εικόνα 45: Συγκριτικό διάγραμμα καταγεγραμμένων φασμάτων φθορισμού κατά την ακτινοβόληση διαφορετικών σημείων στο ίδιο δείγμα, με επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας 60 mJ/cm^2 .

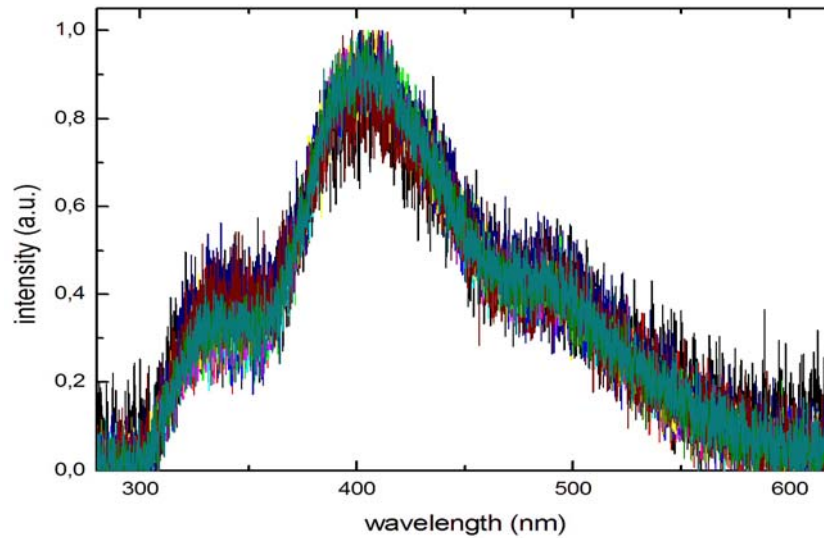
Για την απαλοιφή του θορύβου πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση των παραπάνω φασμάτων ως προς την μεγαλύτερη κορυφή:



Εικόνα 46: Επεξεργασμένα φάσματα εικόνας 47

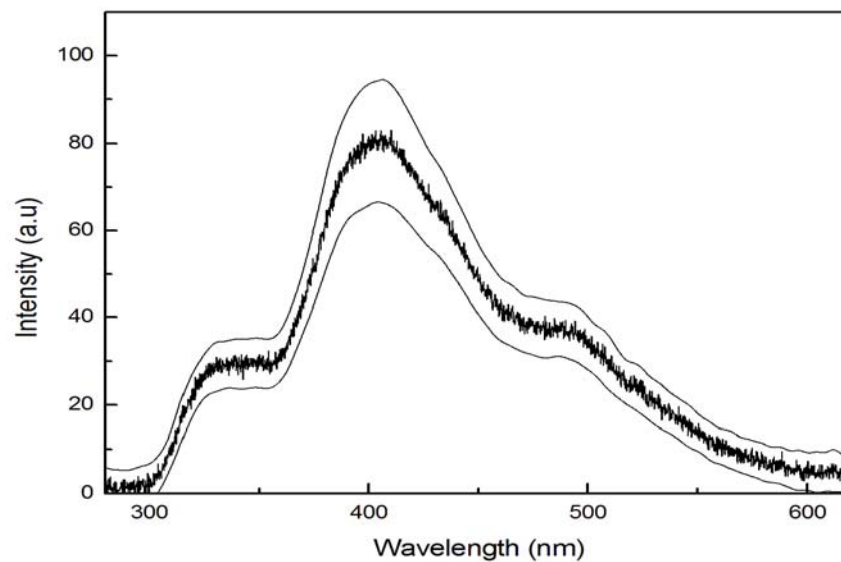
Διαπιστώνεται μια συσχέτιση του σχήματος της καμπύλης φθορισμού που προκύπτει από διάφορα σημεία του δείγματος είναι του ίδιου σχήματος αλλά παρουσιάζεται σημαντική διαφοροποίηση ως προς την ένταση των φασμάτων. Για την μελέτη των φασμάτων ως προς το

σχήμα τους πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση ως προς την μεγαλύτερη κορυφή του κάθε φάσματος :



Εικόνα 47: Κανονικοποιημένα φάσματα ως προς την μεγαλύτερη κορυφή της εικόνας 47

Είναι εμφανής η ομοιότητα της μορφής των φασμάτων γεγονός που υποδηλώνει ότι για κάποιο λόγο πραγματοποιείται απόκλιση στην τιμή της έντασης της ακτινοβολίας φθορισμού που καταγράφεται από τον φασματογράφο. Εν συνεχεία υπολογίστηκε η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση από αυτή, των καταγεγραφόμενων φασμάτων:

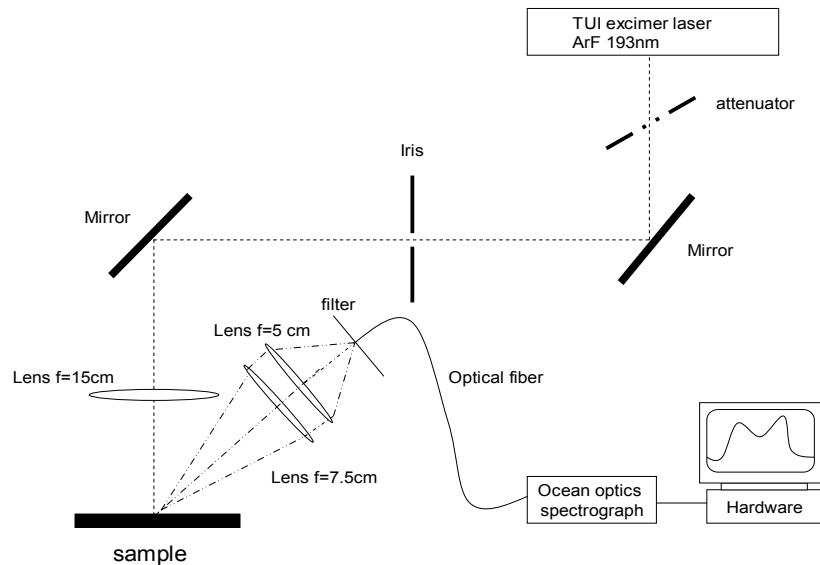


Εικόνα 48: Μέση τιμή και τυπική απόκλιση των φασμάτων που καταγράφηκαν , από διαφορετικά σημεία δείγματος PALM ,κατά την ακτινοβολή τους με excimer laser KrF, και πυκνότητα ενέργειας $60\text{mJ}/\text{cm}^2$.

Από την επεξεργασία αυτή προκύπτει ότι εντάσεις φασμάτων μέσα στο παραπάνω εύρος, αποτελούν αποδεκτές τιμές. Με βάση τα παραπάνω πιστεύεται ότι η ένταση του καταγεγραμμένου φάσματος δεν μπορεί να αποτελέσει μία αξιόπιστη πηγή για την διεξαγωγή συμπερασμάτων σε ότι αφορά την ενυδάτωση του δείγματος.

4.2) Μετρήσεις με excimer laser ArF στα 193nm

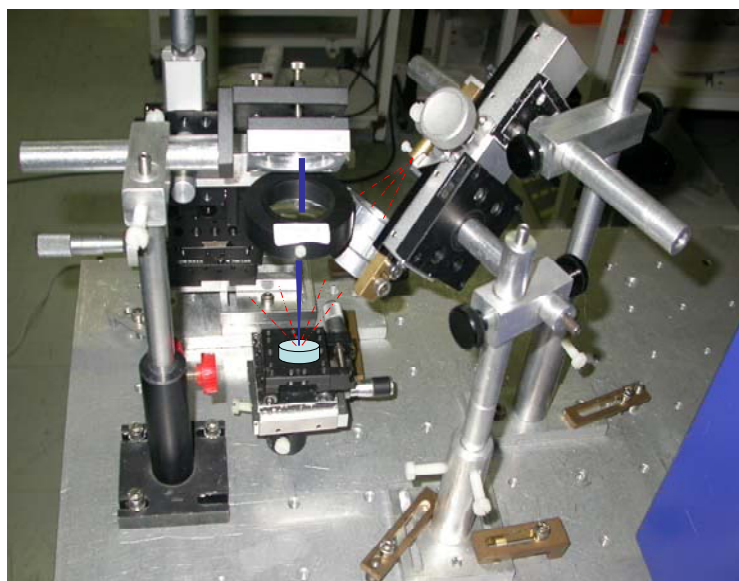
4.2.1) πειραματική διάταξη



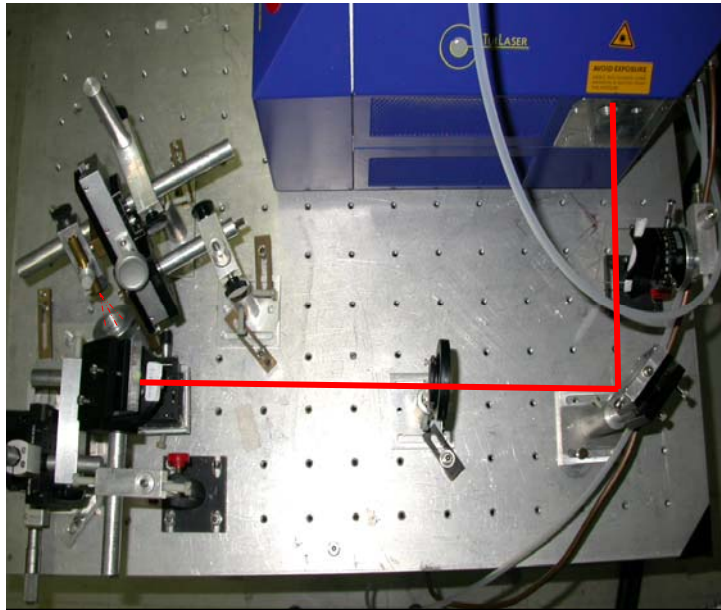
Εικόνα 49: Πειραματική διάταξη για την καταγραφή του φάσματος εκπομπής με excimer laser στα 193nm.

Το κύριο μέρος των πειραμάτων που αφορούσαν την συσχέτιση της ενυδάτωσης του κερατοειδούς με φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά πραγματοποιήθηκαν με excimer laser ArF (193 nm, χρονική διάρκεια παλμού 10 nsec)

Η πειραματική διάταξη ήταν διαφορετική από αυτή που χρησιμοποιήθηκε αρχικά, με το δείγμα να τοποθετείται σε οριζόντια θέση, προσομοιώνοντας κατ' αυτό τον τρόπο τις συνθήκες που επικρατούν κατά την επέμβαση διαθλαστικής χειρουργικής. Φωτογραφίες της πειραματικής διάταξης φαίνονται στις εικόνες 50 και 51.



Εικόνα 50: Βάση τοποθέτησης δείγματος και σύστημα ανίχνευσης φωτός εκπομπής



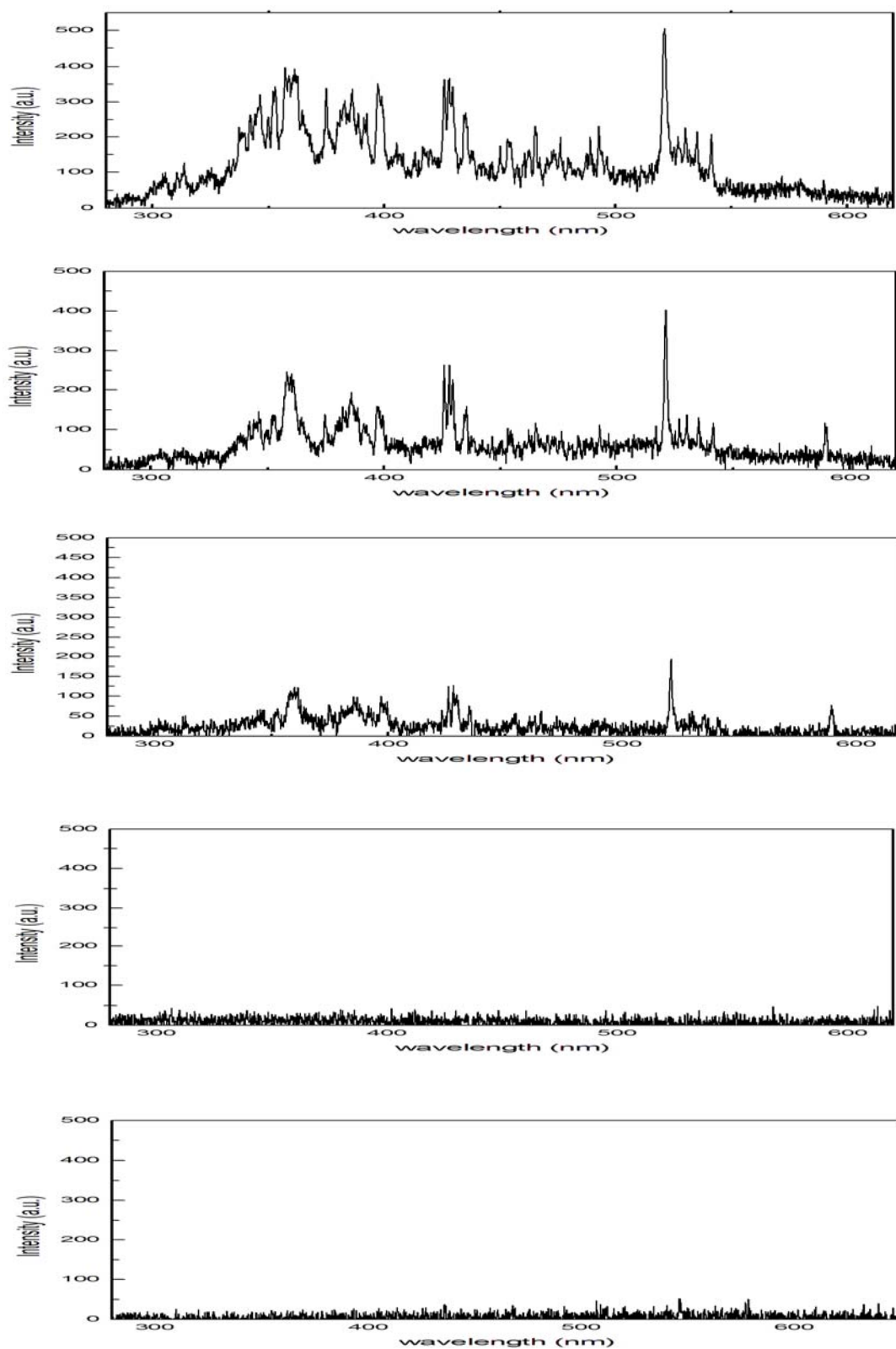
Εικόνα 51: Πειραματική διάταξη για την πραγματοποίηση πειραμάτων με το excimer laser ArF.

Φάσμα εκπομπής quartz

Πριν από την πραγματοποίηση οποιουδήποτε πειράματος με την χρήση του ArF laser, καταγράφηκε το φάσμα φθορισμού που προέκυπτε από την ακτινοβολήση πλακιδίου quartz, για να διαπιστωθεί πιθανή ύπαρξη φθορισμού από το πλακίδιο πάνω στο οποίο τοποθετούνταν τα δείγματα, γεγονός που θα αλλοίωνε τα αποτελέσματα των υπολοίπων πειραμάτων.

Διαπιστώθηκε ότι, για τις τιμές της πυκνότητας ενέργειας με τις οποίες επρόκειτο να πραγματοποιηθούν τα πειράματα ($180-250 \text{ mJ/cm}^2$), ο φθορισμός του πλακιδίου είναι αμελητέος και επικαλύπτεται από τον θόρυβο του ανιχνευτή. Αντίθετα για μεγάλες τιμές ενέργειας πραγματοποιείται εκτομή του πλακιδίου με αποτέλεσμα να καταγράφεται από τον ανιχνευτή το φάσμα εκπομπής από το πλάσμα που δημιουργείται λόγω εκτομής του πλακιδίου. Με βάση τα παραπάνω, προκύπτει το συμπέρασμα ότι το φάσμα που καταγράφεται από την αλληλεπίδραση του laser με τα δείγματα, είναι αποκλειστικά αποτέλεσμα των φυσικοχημικών διεργασιών που λαμβάνουν μέρος κατά την αλληλεπίδραση του laser με το δείγμα και δεν υπάρχει δευτερογενής φθορισμός από το background.

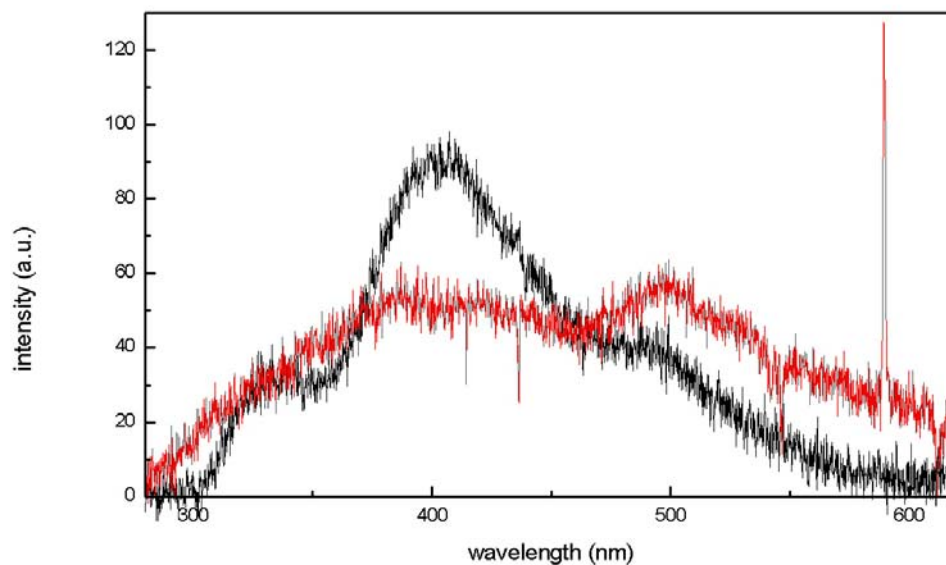
Τα φάσματα φθορισμού που καταγράφηκαν κατά την ακτινοβολήση του πλακιδίου με διάφορες ενδεικτικές επιφανειακές πυκνότητες ενέργειας είναι τα παρακάτω:



Εικόνα 52: Φάσματα εκπομπής από πλακίδιο quartz κατά την ακτινοβολήση του με επιφανειακές πυκνότητες ενέργειας: 415 mJ/cm^2 , 360 mJ/cm^2 , 288 mJ/cm^2 , 144 mJ/cm^2 και 78 mJ/cm^2 αντίστοιχα.

Σύγκριση φασμάτων εκπομπής (KrF, 248 nm, ArF, 193 nm)

Η πρώτη παράμετρος που ελέγχθηκε με την χρήση του excimer laser ArF στα 193 nm, ήταν η μορφή του φάσματος εκπομπής και κατά πόσο η διέγερση του δείγματος με laser μικρότερου μήκους κύματος επιφέρει σημαντικές αλλαγές στην συμπεριφορά του υλικού κατά την ακτινοβόληση του. Η πρώτη παρατήρηση που πραγματοποιήθηκε ήταν ότι το PALM και κατ' επέκταση και ο κερατοειδής δεν φθορίζει ισχυρά, κατά την ακτινοβόληση του με χαμηλές πυκνότητες ενέργειας. Για κοντινές τιμές επιφανειακής πυκνότητας ενέργειας που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων με το laser στα 248 nm και στα 193 nm, επιχειρήθηκε σύγκριση των κατεγγραφόμενων φασμάτων.

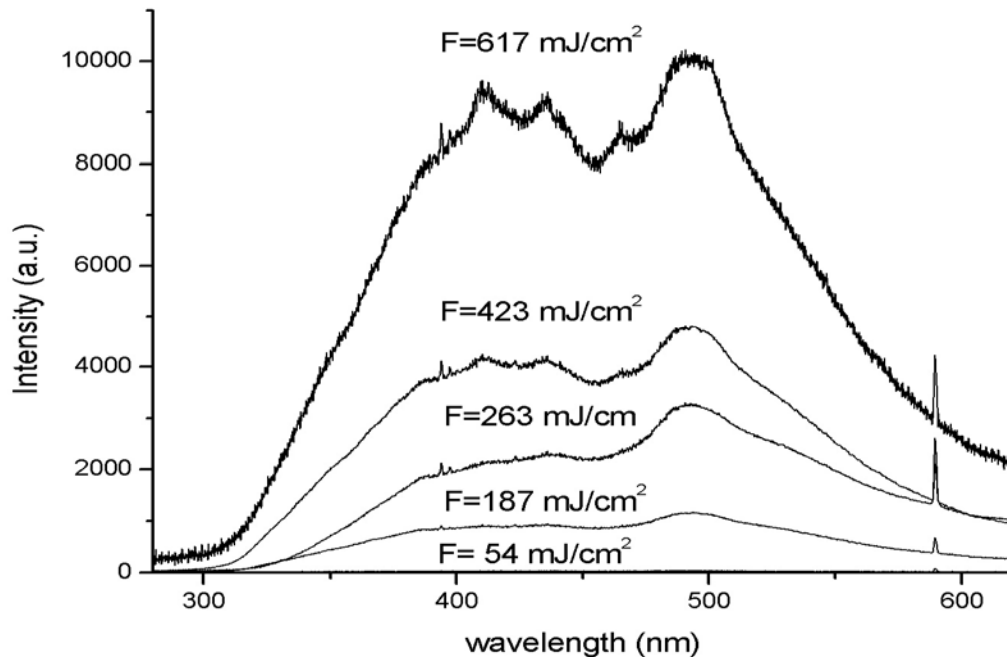


Εικόνα 53: Συγκριτικό διάγραμμα φασμάτων φθορισμού που καταγράφηκαν κατά την διέγερση δείγματος PALM με laser KrF (248 nm) και ένταση ενέργειας 60 mJ/cm² (μαύρο) και φάσμα φθορισμού που καταγράφηκε κατά τη διέγερση δείγματος PALM με laser ArF (193 nm) και ένταση ενέργειας 80 mJ/cm² (κόκκινο).

Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα η μορφή των φασμάτων είναι αρκετά διαφοροποιημένη στις δύο περιπτώσεις. Με προσεκτικότερη όμως μελέτη παρατηρείται ότι και στις 2 περιπτώσεις εμφανίζονται οι ίδιες κορυφές αν και με διαφοροποιημένες εντάσεις, εκτός από την κορυφή στα 340 nm, η οποία στην περίπτωση της διέγερσης με τα 193 nm δεν εμφανίζεται. Ακόμη δεν αποκλείεται μέρος της πληροφορίας που παρέχει το φάσμα φθορισμού κατά την διέγερση με τα 193nm, να βρίσκεται και στην περιοχή κάτω από τα 300nm, στην οποία δεν παρουσίαζε ευαισθησία ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε για την καταγραφή των φασμάτων.

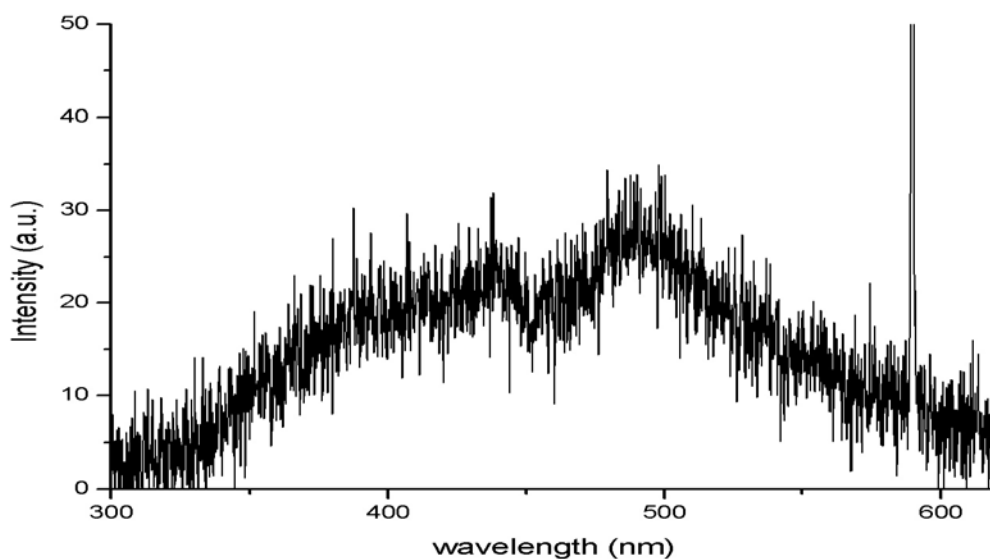
Εξάρτηση φάσματος εκπομπής από την πυκνότητα ενέργειας της ακτινοβολίας laser.

Αρχικά μελετήθηκε η εξάρτηση (μορφή και ένταση) του φάσματος εκπομπής από την πυκνότητα ενέργειας με την οποία ακτινοβολείται το δείγμα. Οι τιμές που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση του πειράματος είχαν επιλεγθεί έτσι ώστε να καλύπτουν ένα μεγάλο εύρος τιμών, ώστε να μελετηθεί το φάσμα εκπομπής υπό διαφορετικές συνθήκες



Εικόνα 54: φάσματα εκπομπής από δείγμα PALM για διαφορετικές επιφανειακές πυκνότητες ενέργειας (617, 423, 263, 187, 54 mJ/cm², αντίστοιχα)

Λόγω της χαμηλότερης έντασης του φάσματος εκπομπής για πυκνότητα ενέργειας 54 mJ/cm² παρακάτω παρατίθεται σε διαφορετική κλίμακα, το φάσμα που καταγράφηκε για την τιμή αυτή.



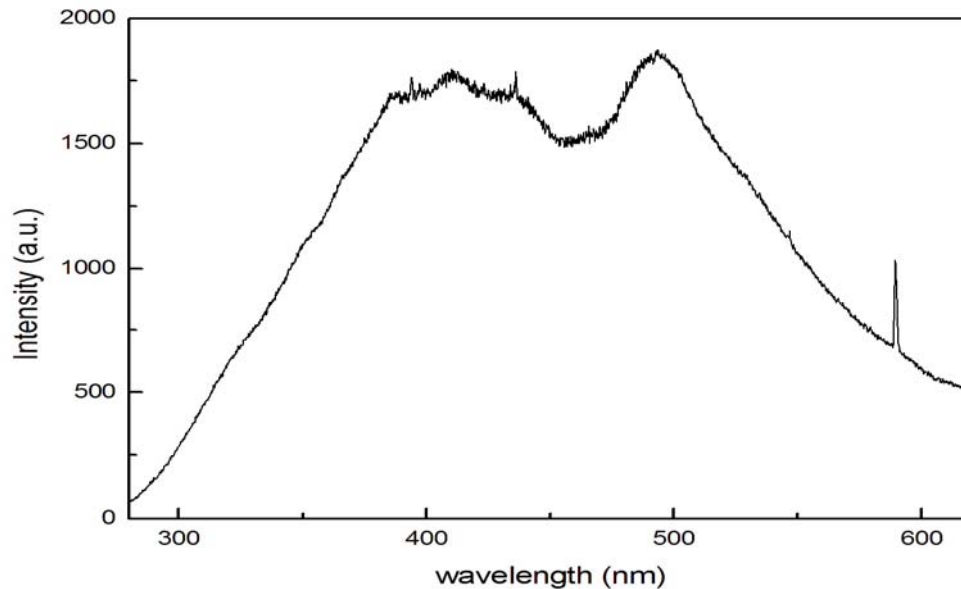
Εικόνα 55: φάσμα εκπομπής από δείγμα PALM, επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας 54 mJ/cm²

Από την μελέτη των παραπάνω φασμάτων προκύπτουν σημαντικές πληροφορίες με σημαντικότερη ίσως την διαπίστωση ότι κατά την ακτινοβολήση του δείγματος με laser ArF ,και με πυκνότητες ενέργειας πάνω από το κατώφλι φωτοεκτομής (40 mJ/cm^2), παρατηρείται η ύπαρξη πλάσματος, η οποία επιβεβαιώνεται με τις ευδιάκριτες ατομικές γραμμές εκπομπής που καταγράφηκαν. Συμπεραίνεται ότι τα φάσματα που καταγράφονται για διαφορετικές τιμές πυκνότητας ενέργειας απεικονίζουν σύνθετα φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα κατά την αλληλεπίδραση του laser με τον κερατοειδή. Πιστεύεται ότι το υπόβαθρο των φασμάτων αποτελεί προϊόν συνεχούς ακτινοβολίας πλάσματος, ενώ δεν αποκλείεται στην μορφή των φασμάτων να συνεισφέρει και μοριακός φθορισμός. Ακόμη παρατηρήθηκε ότι για υψηλές επιφανειακές πυκνότητες ενέργειας ($F=617 \text{ mJ/cm}^2$) παρουσιάζονται γραμμές εκπομπής που οφείλονται σε μοριακούς δεσμούς του άνθρακα.

Για πυκνότητες ενέργειας μέσα στις τιμές που χρησιμοποιούνται στις περιπτώσεις διαθλαστικής χειρουργικής ($180\text{-}250 \text{ mJ/cm}^2$), κατά την αλληλεπίδραση του ιστού με το laser δημιουργείται ασθενές πλάσμα το οποίο συμβάλει στην μορφή του κατεγγραφόμενου φάσματος. Επομένως για φάσματα που λαμβάνονται από τον κερατοειδικό ιστό κατά την ακτινοβολήση του με τιμές πυκνότητα ενέργειας μέσα στα κλινικά όρια, δεν είναι σωστός ο χαρακτηρισμός τους ως φασμάτων φθορισμού αλλά και ούτε ως φασμάτων ατομικής εκπομπής όπως αυτά που καταγράφονται κατά την φασματοσκοπία LIBS. Για το λόγο αυτό, στην μελέτη αυτή, τα κατεγγραφόμενα φάσματα χαρακτηρίζονται ως φάσματα εκπομπής.

Μελέτη φάσματος εκπομπής

Μελετώντας το φάσμα εκπομπής που καταγράφηκε κατά την ακτινοβόληση δείγματος PALM με πυκνότητα ενέργειας 146 mJ/cm^2 , προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:

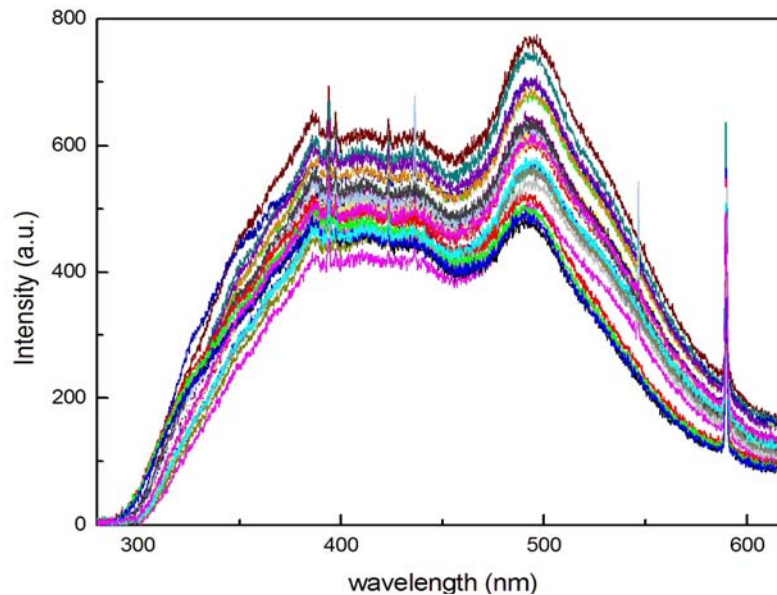


Εικόνα 56: φάσμα εκπομπής δείγματος PALM κατά την ακτινοβόληση του με laser ArF (193 nm), με πυκνότητα ενέργειας 146 mJ/cm^2

- 1) Στο φάσμα παρατηρούνται 2 κυρίως κορυφές: μία στενή μεγάλης έντασης γύρω από τα 493 nm, η οποία μπορεί να συσχετιστεί με την κορυφή στα 484 nm που παρατηρήθηκε κατά την διέγερση του δείγματος με laser στα 248nm και μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη προϊόντων οξειδωσης της φαινυλαλανίνης, και μία πλατύτερη κορυφή ανάμεσα στα 380-420nm.
- 2) Κατά την προσεκτικότερη μελέτη της πλατιάς πρώτης κορυφής μπορούν να προκύψουν σημαντικά στοιχεία. Όπως παρατηρείται η πρώτη κορυφή δεν έχει ομαλή μορφή αλλά παρατηρούνται δύο επιμέρους κορυφές, μία στα 410nm και μία στα 433nm.
- 3) Στα 394,06 nm παρουσιάζεται ατομική γραμμή εκπομπής η οποία αν ληφθεί υπ' όψη το σφάλμα στην βαθμονόμηση του φασματογράφου (0,47 nm) μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη ασβεστίου (γραμμή εκπομπής Ca στα 393,36 nm).
- 4) Ακόμη στα κατεγραφόμενα φάσματα εμφανίζεται η ατομική γραμμή εκπομπής του Νατρίου στα 589,43 nm (βιβλιογραφική τιμή 589,59 nm).

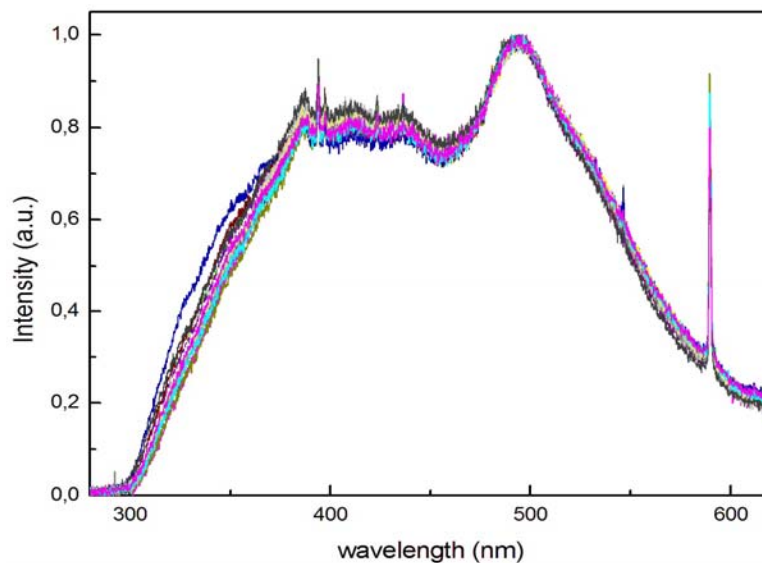
Ένταση κατεγραφόμενων φασμάτων

Για να συσχετιστεί η ένταση των κατεγραφόμενων φασμάτων με την ενυδάτωση του κερατοειδούς, έπρεπε η ένταση του κατεγραφόμενου φάσματος να αποτελεί αξιόπιστη πληροφορία. Για το σκοπό αυτό καταγράφηκαν φάσματα εκπομπής κατά την ακτινοβόληση διαφορετικών σημείων ίδιου δείγματος PALM με την ίδια τιμή επιφανειακής πυκνότητας ενέργειας (95 mJ/cm^2)



Εικόνα 57: Συγκριτικό διάγραμμα φασμάτων που προέκυψαν κατά την ακτινοβόληση διαφορετικών σημείων δείγματος PALM, με επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας 95 mJ/cm^2 .

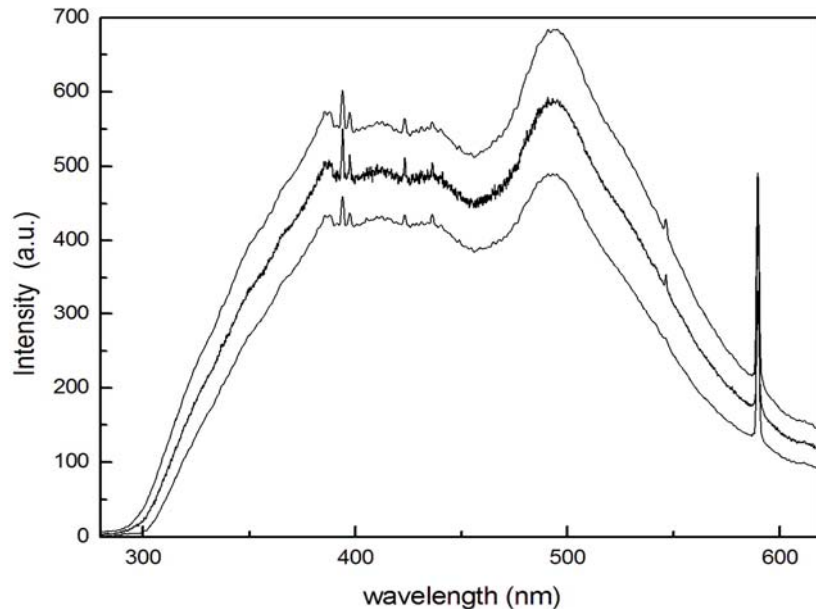
Αν και το δείγμα είχε ομοιόμορφη σύσταση, ίδιο βαθμό ενυδάτωσης και σχετικά ομοιόμορφο πάχος, παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση σε ότι αφορά την ένταση των κατεγραφόμενων φασμάτων από διαφορετικά σημεία του δείγματος. Για να μελετηθούν τυχόν ομοιότητες ή διαφορές στην μορφή των κατεγραφόμενων φασμάτων πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση τους ως προς την μεγαλύτερη κορυφή.



Εικόνα 58: Κανονικοποιημένα, ως προς την μεγαλύτερη κορυφή, φάσματα της εικόνας 58 ($F=95 \text{ mJ/cm}^2$).

Διαπιστώνεται ότι παρά τις σημαντικές διαφορές στην ένταση τους, τα φάσματα παρουσιάζουν μεγάλη ομοιότητα ως προς την μορφή τους.

Εν συνεχεία υπολογίστηκε η μέση τιμή όλων των φασμάτων καθώς και η τυπική απόκλιση από την μέση τιμή:



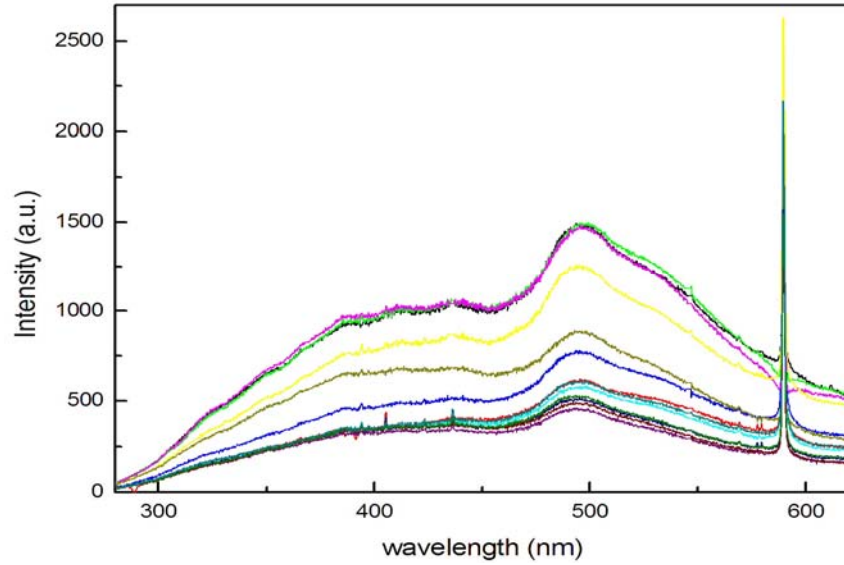
Εικόνα 59: Μέση τιμή και τυπική απόκλιση φασμάτων της εικόνας 57

Με βάση την παραπάνω μελέτη με πηγή διέγερσης laser ArF, αλλά και με τα αντίστοιχα συμπεράσματα που διεξήχθησαν με laser KrF, προκύπτει ότι η ένταση του φάσματος δεν μπορεί να αποτελέσει αξιόπιστη πληροφορία για την συσχέτιση της με την ενυδάτωση του κερατοειδούς σε αντίθεση με την μορφή του καταγεγραφόμενου φάσματος.

Μελέτη φάσματος εκπομπής από κερατοειδείς κουνελιών

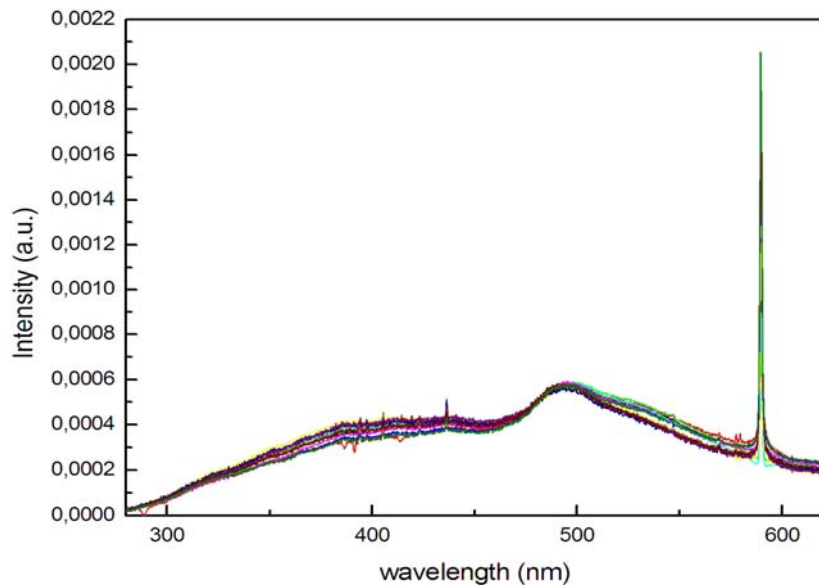
Μετά από την μελέτη της αλληλεπίδρασης του excimer laser με το PALM, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με κερατοειδείς από οφθαλμούς κουνελιών, τα οποία αφαιρέθηκαν αμέσως μετά την θανάτωση τους. Οι κερατοειδείς διατηρήθηκαν σε κατάλληλο υδατικό διάλυμα ώστε να διατηρηθεί η σύσταση και η ενυδάτωση τους μέχρι την ακτινοβολή τους .

Για να μελετηθεί αν παρατηρείται διαφοροποίηση στην μορφή και την ένταση του φάσματος εκπομπής κατά την ακτινοβολή πραγματικού κερατοειδή με excimer laser στα 193nm, ακτινοβολήθηκαν διαφορετικά σημεία του ίδιου κερατοειδή με την ίδια ένταση ενέργειας και μελετήθηκαν τα καταγεγραμμένα φάσματα εκπομπής. Η επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας που χρησιμοποιήθηκε ήταν 87 mJ/cm^2 , η οποία είναι πάνω από το ablation threshold αλλά κάτω από τις τιμές πυκνότητας ενέργειας που χρησιμοποιούνται στις διαθλαστικές επεμβάσεις. Τα φάσματα που καταγράφηκαν αναπαρίστανται παρακάτω:



Εικόνα 60: Φάσματα εκπομπής που καταγράφηκαν κατά την ακτινοβόληση διαφορετικών σημείων κερατοειδούς κουνελιού, με πυκνότητα ενέργειας 87 mJ/cm^2

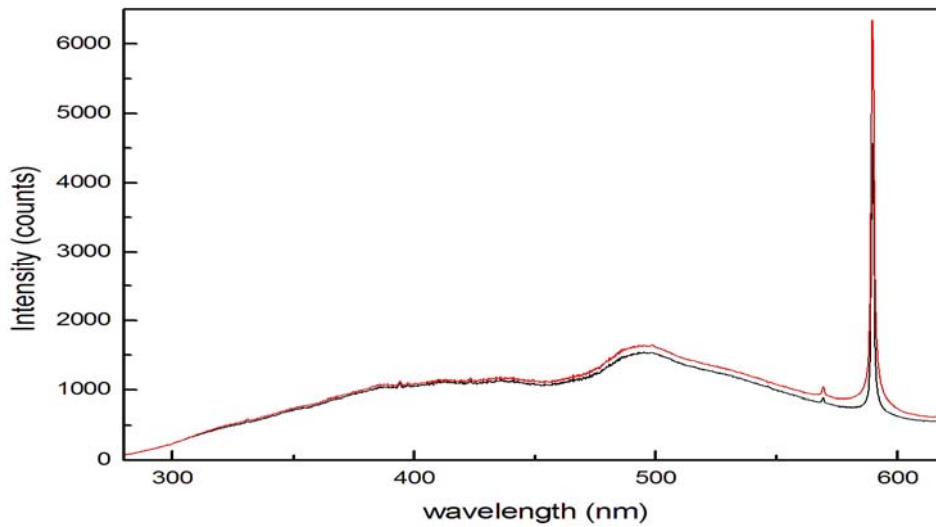
Και σε αυτή την περίπτωση παρατηρείται διαφοροποίηση στην ένταση του φάσματος εκπομπής, γεγονός που επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα που είχαν προέκυψαν κατά τις μετρήσεις με δείγματα PALM. Με κανονικοποίηση των φασμάτων ως προς το εμβαδόν τους προκύπτει σημαντική ομοιότητα:



Εικόνα 61: Κανονικοποιημένα φάσματα εικόνας 60

Αντικείμενο μεγάλης σπουδαιότητας αποτέλεσε η μελέτη του φάσματος εκπομπής του επιθηλίου σε σύγκριση με το φάσμα εκπομπής που καταγράφηκε από το στρώμα του κερατοειδή. Για πυκνότητες ενέργειας μέσα στις κλινικές τιμές ($F=245 \text{ mJ/cm}^2$) υπολογίστηκε η μέση τιμή από τα 5 καταγραφόμενα φάσματα εκπομπής από το επιθήλιο των 5 διαφορετικών κερατοειδών, και

συγκρίθηκε με την μέση τιμή από τα 5 κατεγγραφόμενα φάσματα εκπομπής από το στρώμα των κερατοειδών:



Εικόνα 62 : Σύγκριση μέσης τιμής φάσματος εκπομπής από το επιθήλιο (κόκκινο) και το στρώμα (μαύρο) 5 κουνελίσων κερατοειδών , με πυκνότητα ενέργειας 245 mJ/cm².

Δεν φαίνεται κάποια σημαντική διαφοροποίηση σε ότι αφορά την μορφή των φασμάτων από το επιθήλιο και το ενδοθήλιο, παρά μόνο μια διαφοροποίηση που παρατηρείται στην ένταση της κορυφής του νατρίου που παρουσιάζει διαφορετική τιμή στο επιθήλιο από ότι στο στρώμα με λόγο της έντασης των τιμών 1,388, με το επιθήλιο να παρουσιάζει μεγαλύτερη ένταση της κορυφής του νατρίου από ότι στο στρώμα. Από την μελέτη του παραπάνω διαγράμματος, δεν προκύπτει κάποια άλλη πληροφορία, η οποία θα μπορούσε να δώσει πληροφορίες σχετικά με την σύσταση των διαφορετικών δομικών στρωμάτων του κερατοειδή.

Το αποτέλεσμα από αυτή την σύγκριση έρχεται σε αντίθεση με μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί στο παρελθόν (Chuck et al.2002, Chuck et al., 2004, Cohen et al.,2001, Phillips et al., 1997, Tuft, et al.,1990) και κατά τις οποίες προκύπτουν διαφορετικά φάσματα φθορισμού από το επιθήλιο και το στρώμα. Ενδέχεται ότι κατά την παρούσα μελέτη δεν προκύπτουν διαφοροποιήσεις μεταξύ των δύο στοιβάδων του κερατοειδούς λόγω της μεγάλης επιφανειακής πυκνότητας που χρησιμοποιήθηκε για την διέγερση των δειγμάτων, με αποτέλεσμα στα κατεγγραφόμενα φάσματα να υπερισχύει η ύπαρξη πλάσματος σε σχέση με τον μοριακό φθορισμό που ενδεχομένως να είναι διαφορετικής μορφής για τις δύο διαφορετικές στοιβάδες (επιθήλιο-στρώμα).

Κεφάλαιο 5°

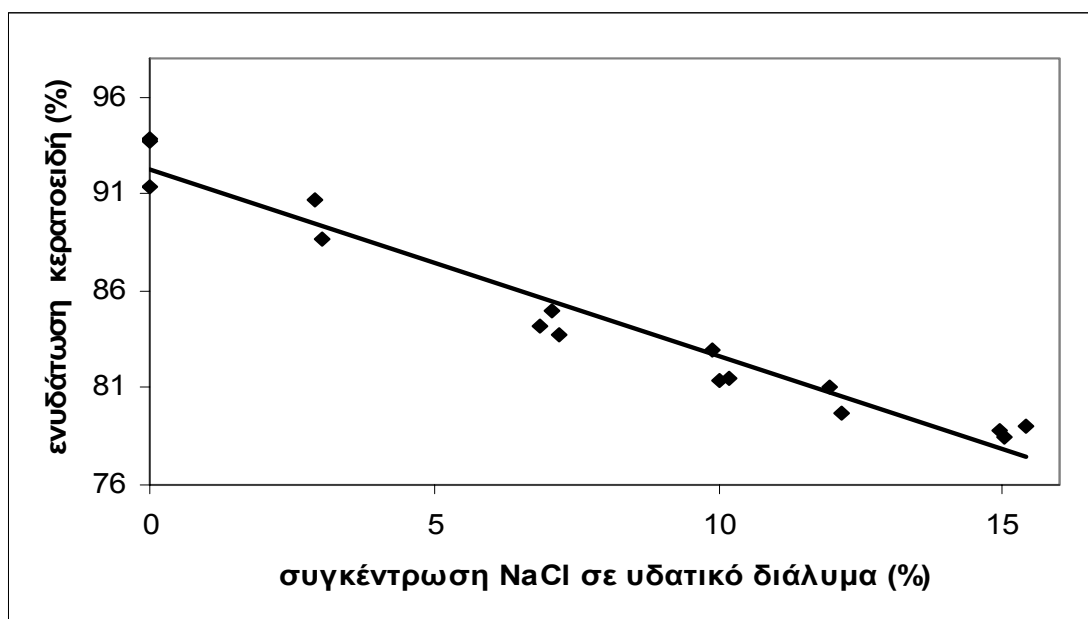
Φασματοσκοπική μελέτη της αποδόμησης ενυδατωμένου κερατοειδούς

Μεθοδολογία

Μετά από την πραγματοποίηση των αρχικών πειραμάτων που σκοπό τους είχαν την καταγραφή και μελέτη των φασμάτων που προκύπτουν κατά την αλληλεπίδραση του laser με τον κερατοειδή, ώστε να εκτιμηθούν τα δεδομένα που προκύπτουν και τα οποία μπορεί να δώσουν αξιόπιστες πληροφορίες, πραγματοποιήθηκαν πειράματα με κερατοειδείς γνωστής ενυδάτωσης.

Από έρευνες που έχουν πραγματοποιηθεί στα εργαστήρια του ΒΕΜΜΟ, έχει βρεθεί ότι είναι δυνατό να ρυθμιστεί η ενυδάτωση του κερατοειδούς κατά τον εμβαπτισμό του σε υδατικά διαλύματα συγκεκριμένης επί τοις % v/v περιεκτικότητας σε NaCl.

Με βάση δεδομένα που έχουν προκύψει από την έρευνα αυτή, προκύπτει η ύπαρξη γραμμικής συνάρτησης που προσεγγίζει την εξάρτηση της περιεκτικότητας επί τοις % v/v συγκέντρωσης υδατικού διαλύματος σε NaCl στο οποίο εμβαπτίζεται ο κερατοειδής με την επί τοις % w/w ενυδάτωση του.



Εικόνα 63: Διάγραμμα συσχέτισης της μετρούμενης ενυδάτωσης του κερατοειδή σε σχέση με την επί τοις % w/w συγκέντρωσης NaCl σε υδατικό διάλυμα.

Η γραμμική συνάρτηση που προσεγγίζει την παραπάνω σχέση είναι:

$$\text{Ενυδάτωση κερατοειδούς} = -0.9643 * (\% \text{ v/v συγκέντρωσης NaCl}) + 92,272$$

Με βάση τα δεδομένα της συγκεκριμένης έρευνας, ρυθμίστηκε η ενυδάτωση των κερατοειδών για την διεξαγωγή των πειραμάτων. Μετά από την αφαίρεση των κερατοειδών από τους βολβούς οφθαλμών από χοίρους, τοποθετούνταν σε υδατικά διαλύματα γνωστής επί τοις % v/v συγκέντρωσης σε NaCl , όπου αφέθηκαν για μισή ώρα ώστε να αποκτήσουν την επιθυμητή ενυδάτωση. Στην συνέχεια ακτινοβολήθηκαν με excimer laser ArF στα 193 nm, για την καταγραφή του φάσματος εκπομπής. Επιλέχθηκε να μελετηθούν 6 διαφορετικές καταστάσεις ενυδάτωσης, και για κάθε μία από τις 6 διαφορετικές καταστάσεις, παρασκευάστηκαν 4 δείγματα κερατοειδών και βρέθηκε ο μέσος όρος ενυδάτωσης τους για κάθε μία από τις επί μέρους 6 καταστάσεις ενυδάτωσης. Οι ενυδατώσεις των κερατοειδών που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση του πειράματος φαίνονται στο παρακάτω πίνακα:

Πίνακας 7: %w/w ενυδάτωση των κερατοειδών που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση του πειράματος

%w/v συγκέντρωση NaCl σε υδατικό διάλυμα	%w/w ενυδάτωση κερατοειδή
15,00	77,81
15,22	77,59
15,10	77,71
14,91	77,89
12,31	80,40
12,06	80,64
12,27	80,44
12,00	80,70
10,17	82,47
10,37	82,27
10,26	82,38
10,09	82,54
6,98	85,54
7,22	85,31
6,93	85,59
7,03	85,49
2,99	89,39
3,01	89,37
2,99	89,39
3,02	89,36
0,00	92,27
0,00	92,27
0,00	92,27
0,00	92,27

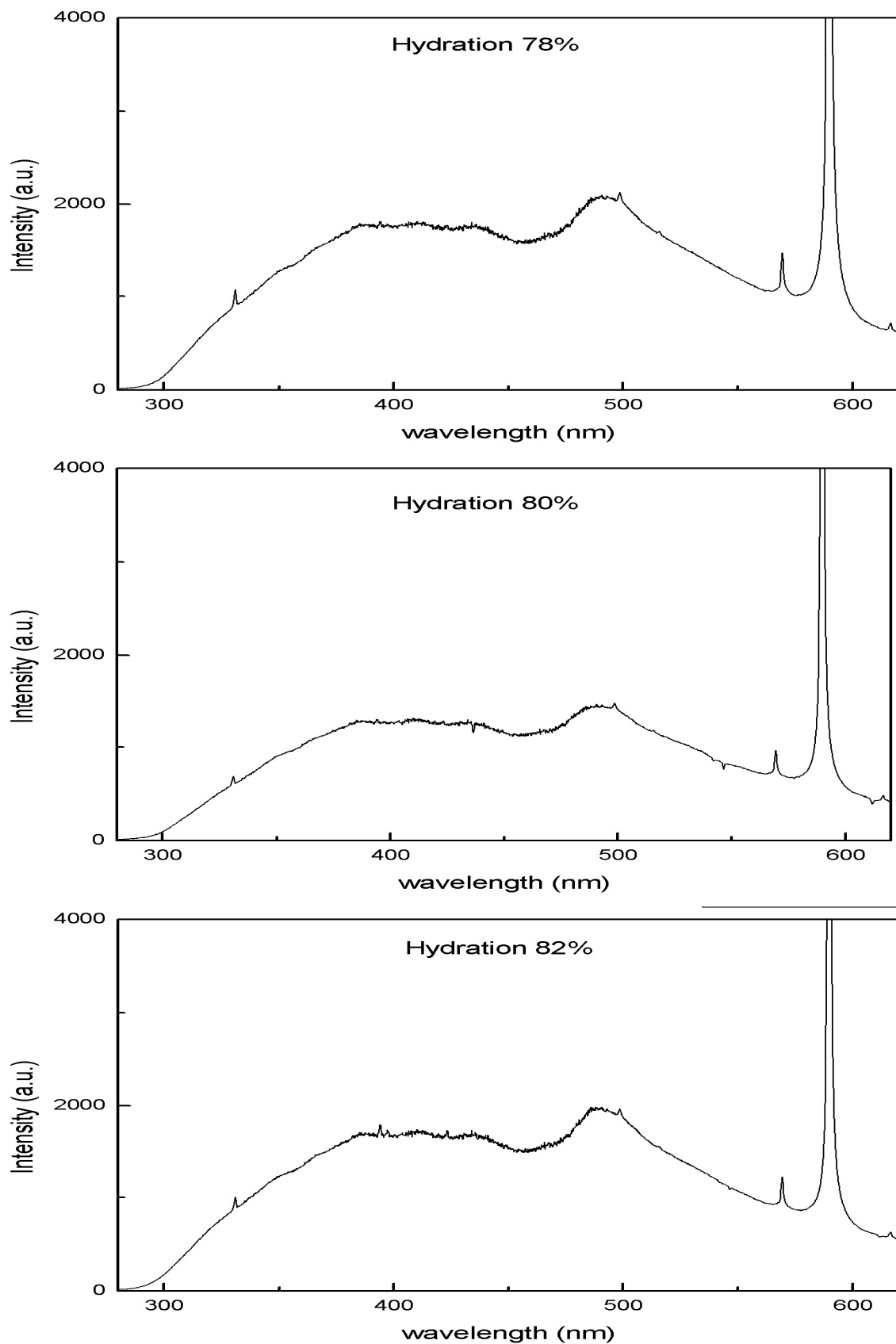
Για καλύτερη αντιμετώπιση των πειραματικών αποτελεσμάτων τα δείγματα των κερατοειδών χωρίστηκαν ανάλογα με την ενυδάτωση τους σε 6 ομάδες όπου η κάθε μία είχε μέσο όρο ενυδάτωσης:

Αριθμός ομάδας	Μέση ενυδάτωση (%)
1	78
2	80
3	82
4	85
5	89
6	92

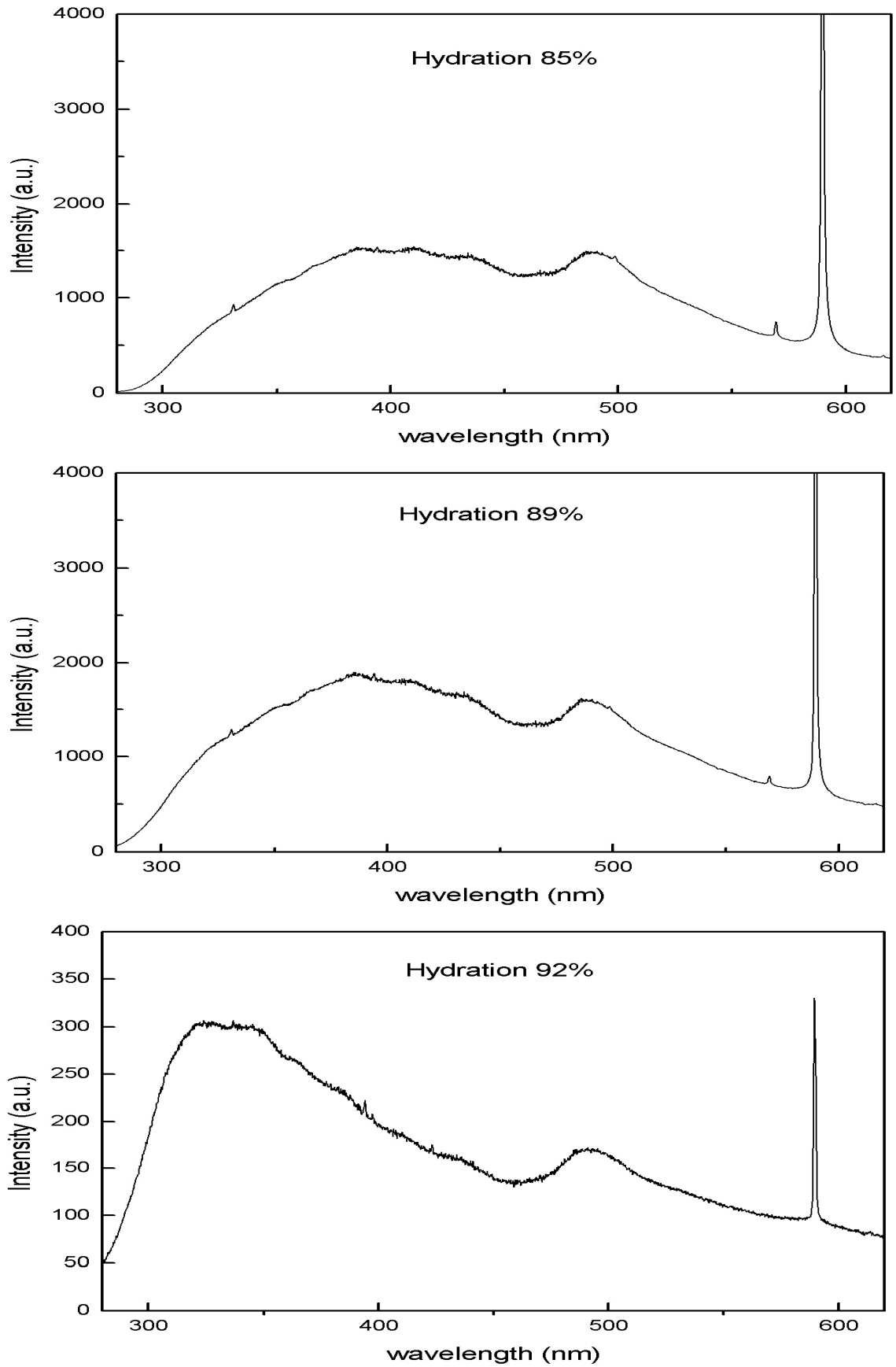
Το πείραμα για την καταγραφή του φάσματος εκπομπής κατά την ακτινοβόληση δειγμάτων κερατοειδών γνωστής ενυδάτωσης, σχεδιάστηκε έτσι ώστε να ανταποκρίνεται όσο το δυνατό περισσότερο σε πραγματικές κλινικές συνθήκες οι οποίες επικρατούν κατά την διάρκεια επέμβασης διαθλαστικής χειρουργικής. Κατά την διάρκεια του πειράματος, τα φώτα της αίθουσας στην οποία πραγματοποιήθηκε το πείραμα ήταν κλειστά, ώστε να μην καταγράφονται από τον φασματογράφο οι ατομικές γραμμές εκπομπής από τις λάμπες φθορισμού, ενώ η θερμοκρασία στην αίθουσα ήταν 21°C. Η ενέργεια ανά παλμό με την οποία ακτινοβολούταν το δείγμα ήταν 1,17 mJ ενώ το εμβαδό του spot της δέσμης μετρήθηκε ίσο με $d=0,6 \text{ mm}^2$. Επομένως η πυκνότητα ενέργειας με την οποία ακτινοβολούταν το δείγμα ήταν ίση με 193 mJ/cm^2 . Η τιμή αυτή της πυκνότητας ενέργειας είναι μέσα στο εύρος των τιμών πυκνοτήτων ενέργειας που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση διαθλαστικής χειρουργικής και τα οποία κυμαίνονται από 180-250 mJ/cm^2 . Ο ρυθμός επανάληψης (repetition rate) του laser επιλέχθηκε ίσος με 5Hz, δηλαδή το δείγμα δεχόταν παλμό από τον laser κάθε 0,2sec, ενώ επιλέχθηκε ο χρόνος ολοκλήρωσης του φασματογράφου να είναι ίσο με 800ms. Για την εξάλειψη του θορύβου από το καταγραφόμενο φάσμα, επιλέχθηκε ο μέσος όρος καταγεγραμμένων φασμάτων να είναι ίσος με 10. Στην οθόνη του υπολογιστή το κάθε φάσμα που εμφανιζόταν αποτελούσε τον μέσο όρο από 10 καταγεγραμμένα φάσματα, άρα κάθε φορά που εμφανιζόταν ένα νέο φάσμα στον υπολογιστή ήταν γνωστό, ότι το δείγμα είχε δεχτεί συνολικά 40 παλμούς. Για τις ανάγκες του παρόντος πειράματος αποθηκεύονταν το δεύτερο φάσμα που εμφανιζόταν στην οθόνη του υπολογιστή για μεγαλύτερη αξιοπιστία των μετρήσεων, με αποτέλεσμα να είναι γνωστό ότι για την καταγραφή του φάσματος εκπομπής το δείγμα είχε ακτινοβοληθεί συνολικά με 80 παλμούς.

Από όλα τα δείγματα κερατοειδών είχε αφαιρεθεί το επιθήλιο, ενώ είχαν τοποθετηθεί στα υδατικά διαλύματα NaCl, για περισσότερο από μισή ώρα ώστε να αποκτήσουν την επιθυμητή ενυδάτωση. Κατά την ακτινοβόληση τους, τοποθετούνταν σε μικρομετρική βάση στήριξης και αφού σκουπιζόταν η επιφάνεια τους με ειδικό όργανο, ώστε να απομακρύνεται ανεπιθύμητη υγρασία που θα μπορούσε να μεταβάλει τα αποτελέσματα, ακτινοβολούνταν με το excimer laser ArF. Από το κάθε κερατοειδή καταγράφηκαν 2 φάσματα εκπομπής από 2 διαφορετικά σημεία τους, ενώ η όλη διαδικασία διαρκούσε κατά μέσο όρο 3 λεπτά, ώστε να αποφεύγονται φαινόμενα αφυδάτωσης του κερατοειδούς κατά την έκθεση τους στον αέρα.

Αποτελέσματα



Εικόνα 64 : Μέσος όρος και τυπική απόκλιση, καταγραφόμενων φασμάτων εκπομπής κατά την ακτινοβολήση δείγματος χοιρινών κερατοειδών ενυδάτωσης 78%, 80%, 82%, με excimer laser ArF, και πυκνότητα ενέργειας $193\text{mJ}/\text{cm}^2$.

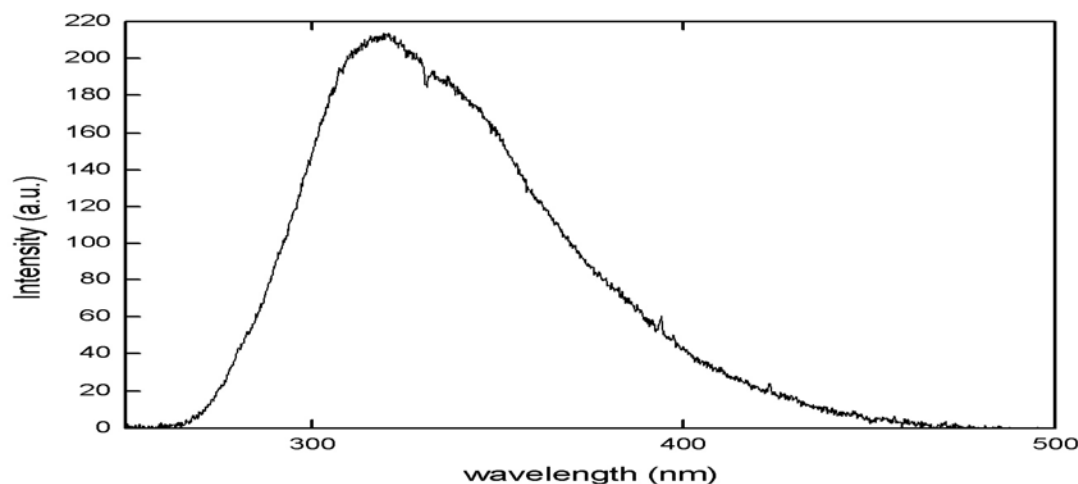


Εικόνα 65 : Μέσος όρος και τυπική απόκλιση, του καταγραφόμενου φάσματος εκπομπής κατά την ακτινοβολήση δείγματος χοιρινών κερατοειδών ενυδάτωσης 85%, 89%, 92%, με excimer laser ArF, και πυκνότητα ενέργειας 193 mJ/cm^2 .

Για την ομαδοποίηση και καλύτερη μελέτη των κατεγραφόμενων φασμάτων υπολογίστηκε ο μέσος όρος των φασμάτων που αντιστοιχούσαν στην ίδια ομάδα ενυδάτωσης των κερατοειδών. Τα κατεγραφόμενα φάσματα παρουσίαζαν σημαντικές ομοιότητες ως προς την μορφή τους με αυτά που είχαν καταγραφεί και μελετηθεί με δείγματα από PALM καθώς και από τους κερατοειδείς κουνελιών, ώστε να θεωρηθεί ότι και σε αυτή την περίπτωση να ισχύουν όλοι οι ισχυρισμοί και οι παρατηρήσεις που είχαν πραγματοποιηθεί κατά την αρχική μελέτη. Το σημαντικό σε αυτή την περίπτωση ήταν ότι ήταν γνωστή η ενυδάτωση των κερατοειδών που ακτινοβολούνταν.

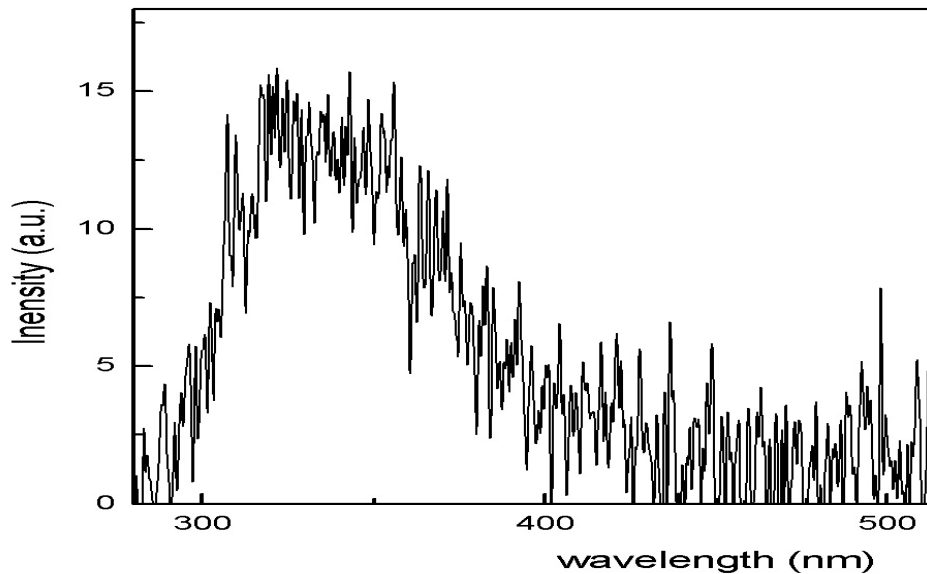
Η σημαντική διαφοροποίηση της μορφής του κατεγραφόμενου φάσματος, με τον βαθμό της ενυδάτωσης οφείλεται κατά κύριο λόγο στην ύπαρξη διαφορετικής συγκέντρωσης ύδατος στον κερατοειδή, το οποίο κατέχει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία εκτομής του ιστού. Όταν αυξάνεται η συγκέντρωση του νερού στον κερατοειδή, ουσιαστικά εμποδίζει την δημιουργία πλάσματος καθώς αποτελεί παράγοντα αποδυνάμωσης των μηχανισμών που λαμβάνουν μέρος κατά την αλληλεπίδραση laser- κερατοειδή, με αποτέλεσμα την μείωση του ρυθμού αποδόμησης.

Με κατάλληλη επεξεργασία των φασμάτων των δύο οριακών τιμών ενυδάτωσης (78% και 92%) , κατά την οποία πραγματοποιήθηκε κανονικοποίηση των φασμάτων και στην συνέχεια αφαίρεση τους, παρατηρήθηκε από το φάσμα που προέκυψε, αφαίρεση του υποστρώματος που οφείλεται στην ύπαρξη πλάσματος και επιβεβαιώθηκε η ύπαρξη μοριακού φθορισμού:



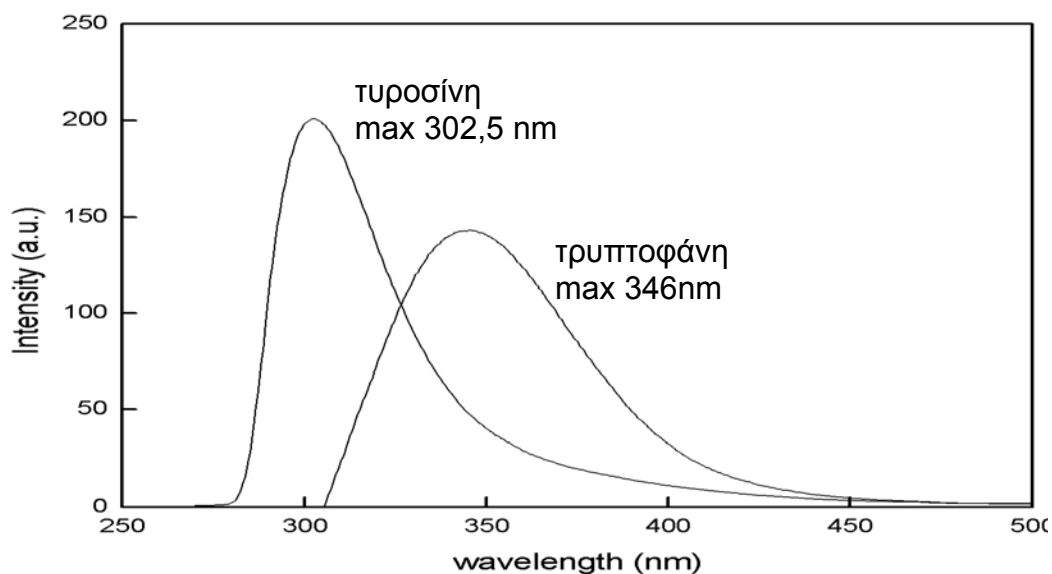
Εικόνα 66 : φάσμα μοριακού φθορισμού κερατοειδούς, που προκύπτει από κατάλληλη επεξεργασία των κατεγραφόμενων φασμάτων για ενυδατώσεις 78% και 92%. (F= 193 nm)

Ο μοριακός φθορισμός είχε καταγραφεί και κατά την ακτινοβολήση δείγματος κερατοειδή κουνελιού με επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας 34 mJ/cm^2 .Το κατώφλι φωτοεκτομής του κερατοειδούς με excimer laser στα 193 nm έχει βρεθεί στα 40 mJ/cm^2 (Aron- Rosa et al., 1986, Berns et al., 1999).



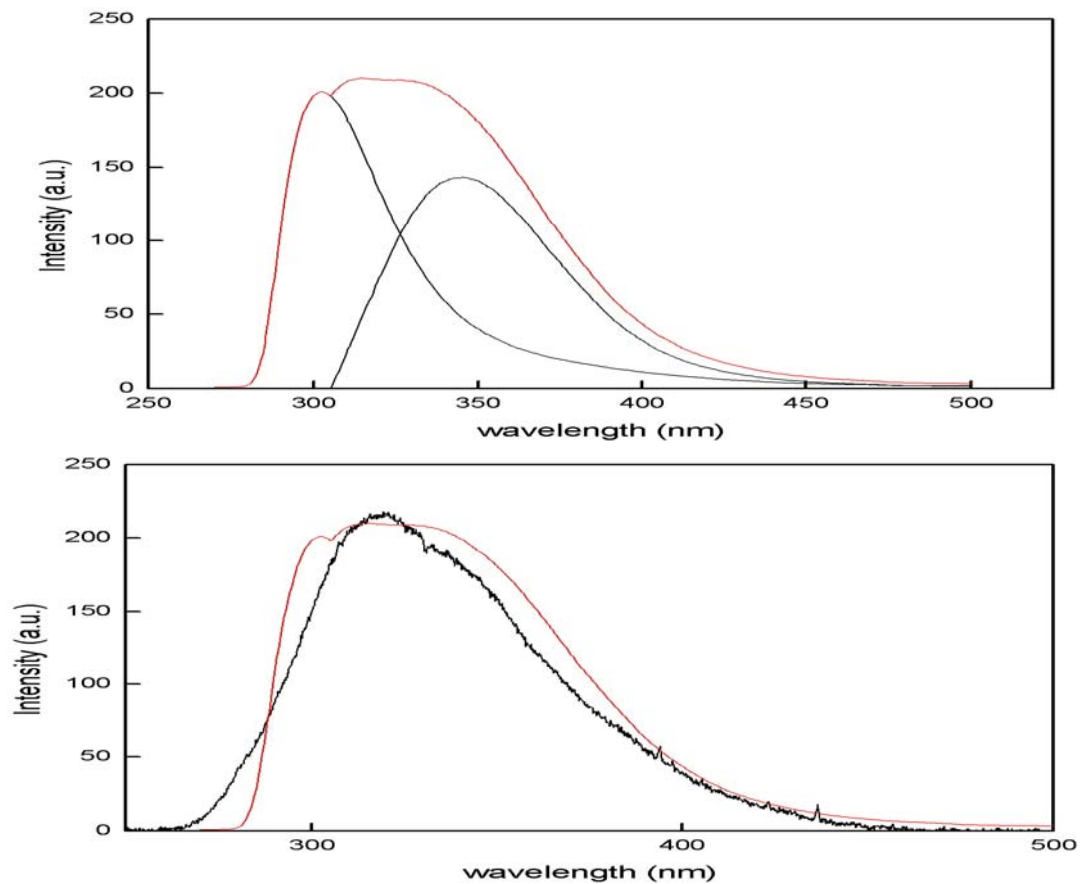
Εικόνα 67: Φάσμα μοριακού φθορισμού κερατοειδούς από κουνέλι. ($F= 34 \text{ mJ/cm}^2$)

Γνωρίζοντας τα φάσματα φθορισμού που έχουν καταγραφεί για την τυροσίνη (μέγιστο εκπομπής 302,5 nm) και την τρυπτοφάνη (μέγιστο εκπομπής 346nm) (Nevin et al., 2004) υποστηρίζεται ότι ο μοριακός φθορισμός που καταγράφεται σε καταστάσεις υψηλής ενυδάτωσης του κερατοειδούς αποτελεί προϊόν του φθορισμού αυτών των δύο αμινοξέων. Τόσο η τυροσίνη όσο και η τρυπτοφάνη αποτελούν αμινοξέα, τα οποία βρίσκονται στο κολλαγόνο του κερατοειδούς.



Εικόνα 68 : Φάσματα φθορισμού τυροσίνης και τρυπτοφάνης

Με κατάλληλη επεξεργασία των παραπάνω φασμάτων το φάσμα που προκύπτει προσομοιώνει σε μεγάλο βαθμό το φάσμα του μοριακού φθορισμού, που προκύπτει από τα φάσματα που καταγράφηκαν από τους κερατοειδείς χοιρινών για τους διαφορετικούς βαθμούς ενυδάτωσης.



Εικόνα 69 : Σύγκριση φάσματος φθορισμού από τυροσίνη και τρυπτοφάνη (κόκκινο) με φάσμα μοριακού φθορισμού κερατοειδούς.

Τα διαγράμματα που καταγράφηκαν για τους διαφορετικούς βαθμούς ενυδάτωσης του κερατοειδούς, όπως φαίνεται μετά από κατάλληλη επεξεργασία, περιέχουν περισσότερη πληροφορία από όση αρχικά μπορεί να παρατηρηθεί. Από μια πρώτη μελέτη, αμέσως γίνεται αντιληπτό ότι η ένταση αλλά και η μορφή του φάσματος εκπομπής του κερατοειδή μεταβάλλεται ανάλογα με την ενυδάτωση του. Όπως ήταν αναμενόμενο, με βάση τα θεωρητικά δεδομένα, οι υπερ-ενυδατωμένοι κερατοειδείς εμφάνιζαν σημαντικά μειωμένη ένταση του φάσματος εκπομπής, ενώ παράλληλα παρουσιαζόταν και μεταβολή στην μορφή του φάσματος. Έτσι οι υπερ-ενυδατωμένοι κερατοειδείς εμφάνιζαν σημαντικά μεγαλύτερη ένταση των κορυφών στα μικρά μήκη κύματος, σε σχέση με τους αφυδατωμένους κερατοειδείς όπου η αναλογία αυτή ήταν αντιστροφή, με την κορυφή στα μεγάλα μήκη κύματος να πλεονεκτεί αυτής στα μικρά μήκη κύματος.

Από προσεκτική μελέτη των φασμάτων εκπομπής των κερατοειδών προκύπτουν τα παρακάτω αποτελέσματα:

- 1) Κατά την ακτινοβολήση των κερατοειδών με πυκνότητα ενέργειας μέσα στα κλινικά όρια, στο καταγραφόμενο φάσμα εκπομπής είναι ευδιάκριτη η γραμμή εκπομπής του νατρίου στα 589,43nm, η ένταση της οποίας εξαρτάται άμεσα από τον βαθμό ενυδάτωσης του κερατοειδή. Ακόμη παρατηρείται και μία γραμμή εκπομπής στα 330,84nm, η οποία

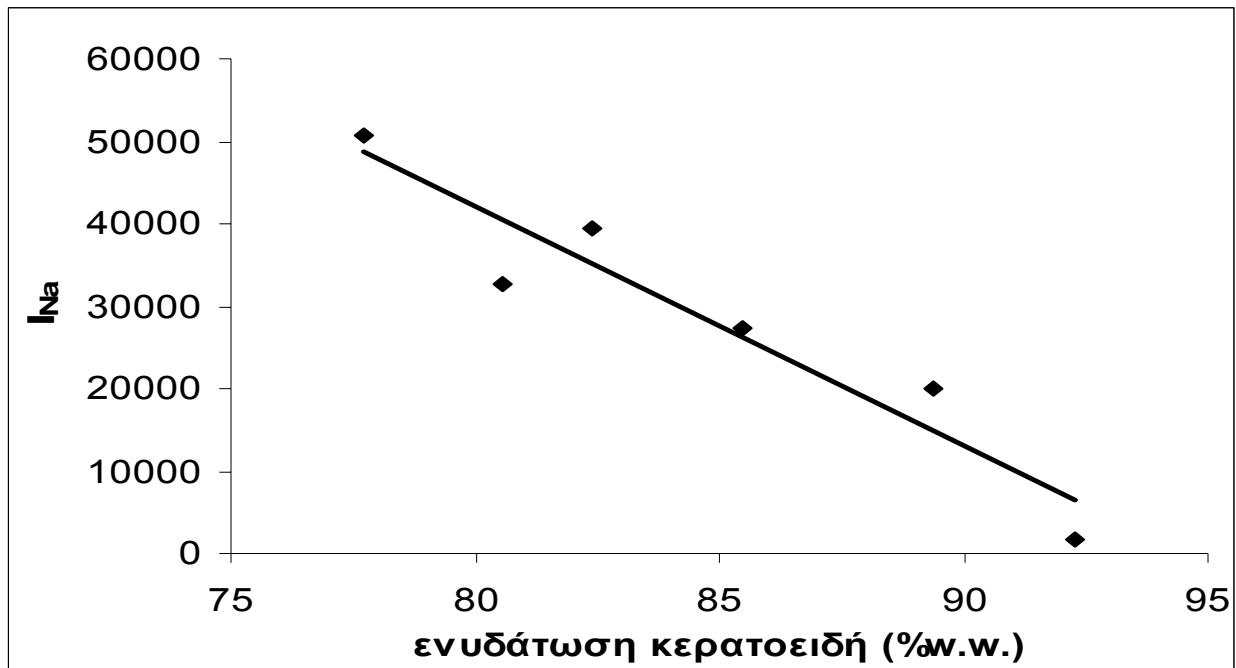
επίσης αποδίδεται στο Na. Η κορυφή αυτή όμως είναι αμυδρά αισθητή και δεν περιέχει κάποια σημαντική πληροφορία. Η ένταση της ατομικής γραμμής εκπομπής γραμμής του Na δεν αποτελεί αξιόπιστη πληροφορία για τον βαθμό ενυδάτωσης του κερατοειδούς, επειδή τα δείγματα που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση του πειράματος, είχαν τοποθετηθεί σε υδατικά διαλύματα NaCl με αποτέλεσμα να είναι πιθανή η προσρόφηση μορίων Na από τον κερατοειδή.

- 2) Ακόμη στα φάσματα εκπομπής , παρατηρούνται σε πολύ ασθενή βαθμό, η γραμμή εκπομπής του ασβεστίου στα 394,06nm, η διπλά ιονισμένη γραμμή του ασβεστίου στα 397,35nm και επίσης παρατηρείται γραμμή εκπομπής του ασβεστίου στα 569,27nm. Οι πραγματικές τιμές της γραμμής εκπομπής του Ca είναι 393,366 και 396,827, όμως η μετατόπιση των γραμμών οφείλεται όπως έχει ήδη αναφερθεί στο σφάλμα που παρουσιάζεται κατά την βαθμονόμηση του φασματογράφου (0,47 nm).
- 3) Η σημαντικότερη ίσως παρατήρηση σε ότι αφορά την μελέτη των φασμάτων εκπομπής, είναι η μεταβολή της έντασης των δύο πλατιών κορυφών που παρατηρούνται γύρω από τα 400nm και τα 490nm. Έτσι ενώ στα αφυδατωμένα δείγματα φαίνεται να υπερτερεί η κορυφή στα 490nm, έναντι αυτής στα 400nm για τα υπερ-ενυδατωμένα δείγματα η σχέση αυτή αντιστρέφεται.

Παρατηρήθηκε ότι η ένταση της γραμμής εκπομπής του Na εμφάνιζε εξάρτηση με το βαθμό ενυδάτωσης του κερατοειδή. Για να εξακριβωθεί αυτή η διαπίστωση υπολογίστηκε για κάθε μία από τις 6 διαφορετικές ενυδατώσεις , το ολοκλήρωμα της περιοχής που περιελάμβανε την γραμμή εκπομπής του Na:

$$I_{Na} = \int_{580}^{598} I(l) dl$$

Τα αποτελέσματα αυτής της επεξεργασίας είναι τα παρακάτω:



Εικόνα 70 : Διάγραμμα συσχέτισης ενυδάτωσης κερατοειδή με το εμβαδό της γραμμής εκπομπής Na.

Όπως φαίνεται από το παραπάνω διάγραμμα η εξάρτηση της έντασης της γραμμής εκπομπής του Na , είναι σχεδόν γραμμική (συντελεστής συσχέτισης: $R^2=0,9043$) με τον βαθμό ενυδάτωσης του κερατοειδή.

Η εξίσωση που δείχνει την εξάρτηση των δύο ποσοτήτων είναι:

$$\text{Εμβαδό γραμμής εκπομπής Na} = -2923,6 * (\% \text{ενυδάτωση}) + 276121$$

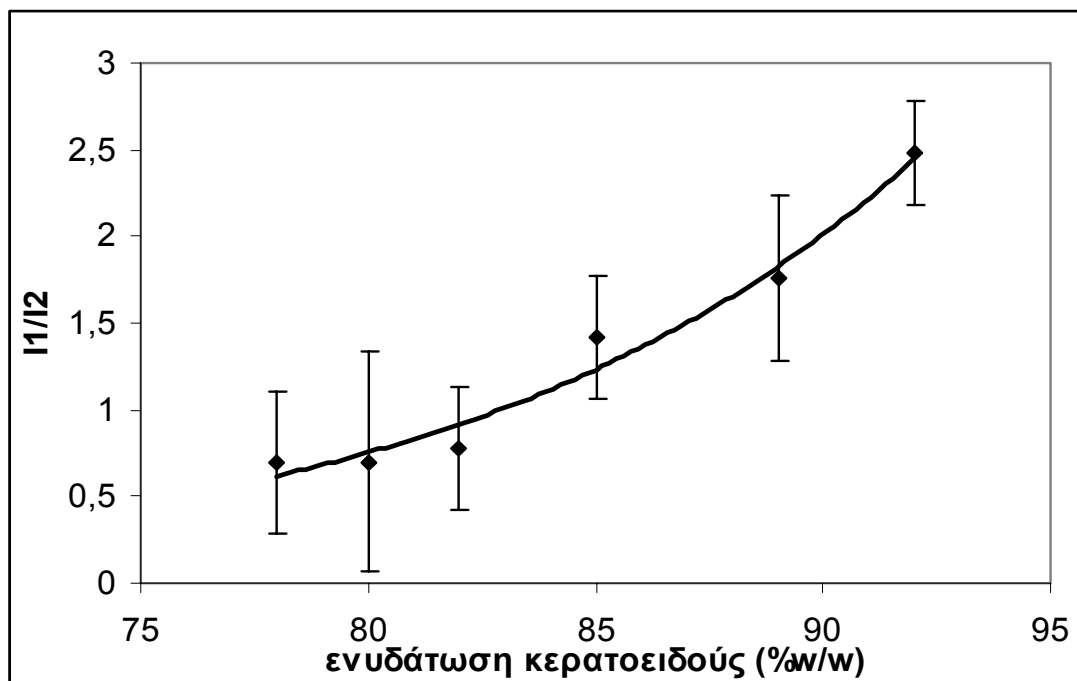
Τα αποτελέσματα από αυτή την επεξεργασία, εκ πρώτης άποψης, παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον. Ενδέχεται όμως, η αξιοπιστία των παραπάνω αποτελεσμάτων να είναι υπό αμφισβήτηση , αν ληφθεί υπ' όψη το γεγονός ότι τα δείγματα των κερατοειδών ήταν εμβαπτισμένα σε υδατικά διαλύματα NaCl, γεγονός που μπορεί να επηρέασε την συγκέντρωση Na στα δείγματα και κατ' επέκταση να αλλοίωσε τις μετρήσεις, που πραγματοποιήθηκαν.

Για το λόγο αυτό, το ενδιαφέρον της μελέτης στράφηκε στην αυτή καθ' αυτή μορφή του φάσματος. Από προσεκτική μελέτη των φασμάτων, παρατηρείται μια διαφοροποίηση στην αναλογία των κορυφών που εμφανίζονται στα κατεγραφόμενα φάσματα, ανάλογα με τον βαθμό ενυδάτωσης των δειγμάτων. Βασίζόμενοι σε αυτήν την παρατήρηση , υπολογίστηκε το εμβαδό των περιοχών που περικλείουν οι 2 κορυφές και εν συνεχεία υπολογίστηκε ο λόγος τους.

Υπολογίστηκαν τα εμβαδά των περιοχών: $I_1 = \int_{300}^{400} I(l)dl$ και $I_2 = \int_{450}^{550} I(l)dl$.

Στην συνέχεια κατασκευάστηκε γραφική παράσταση του λόγου: $I_1/I_2 = \frac{\int_{300}^{400} I(l)dl}{\int_{450}^{550} I(l)dl}$ συναρτήσει του

βαθμού ενυδάτωσης του κερατοειδή:



Εικόνα 71 : διάγραμμα συσχέτισης %w/w ενυδάτωση κερατοειδούς συναρτήσει του λόγου των εμβαδών των περιοχών από 300-400nm προς 450-550nm.

Από μαθηματική άποψη, τα παραπάνω δεδομένα προσεγγίζονται με μία εκθετική συνάρτηση της μορφής:

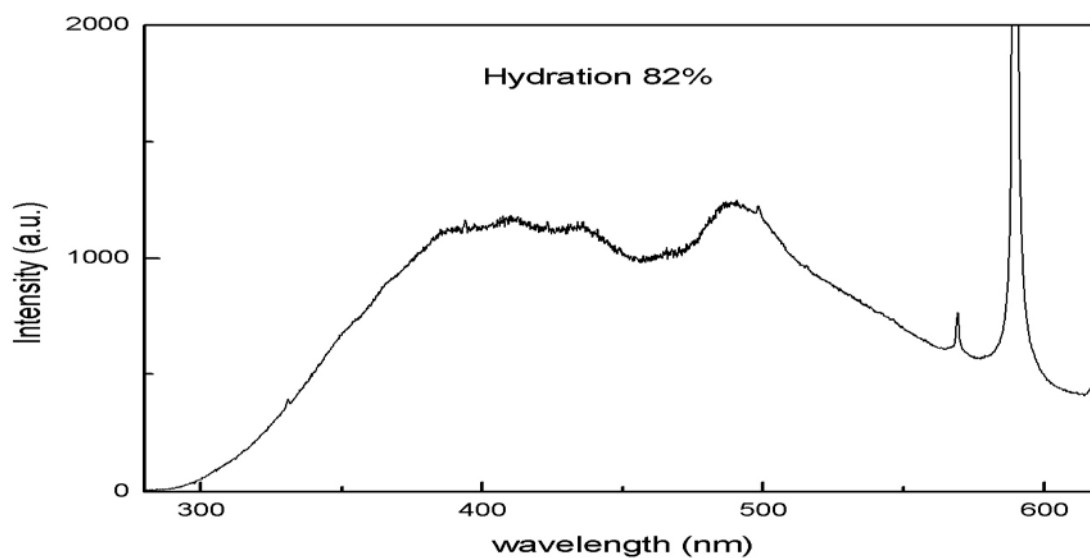
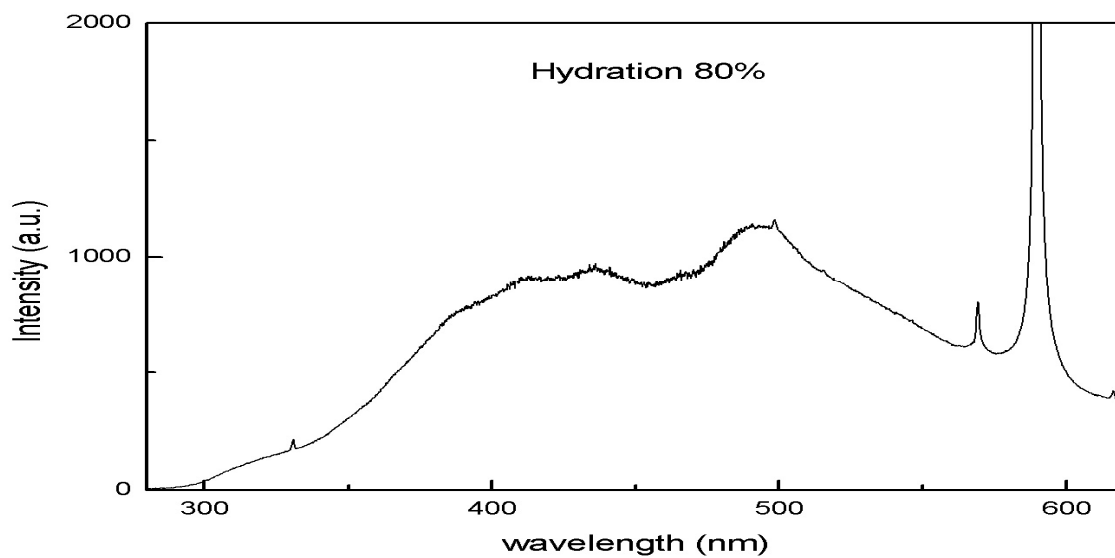
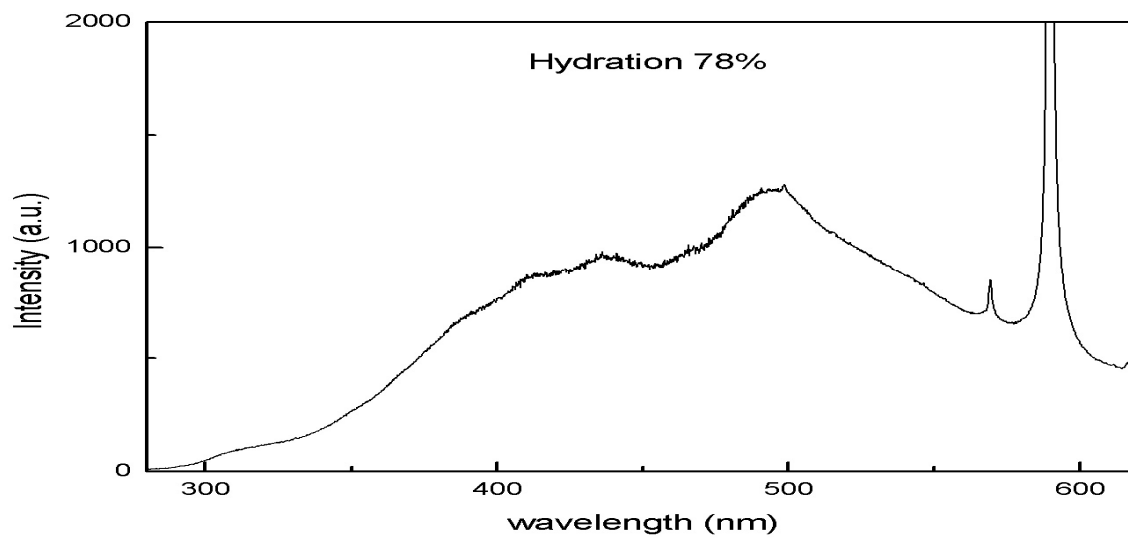
$$\frac{\int_{300}^{400} I(l)dl}{\int_{450}^{550} I(l)dl} = 0,0003e^{0,0982(\% \text{ w/w ενυδάτωση κερατοειδούς})}$$

με συντελεστή συσχέτισης $R^2=0,9543$. Από το παραπάνω διάγραμμα παρατηρείται σημαντική εξάρτηση εκθετικής μορφής του βαθμού ενυδάτωσης του κερατοειδούς με τον αδιάστατο λόγο των εμβαδών των δύο ευδιάκριτων κορυφών που εμφανίζονται στα κατεγραφόμενα φάσματα εκπομπής.

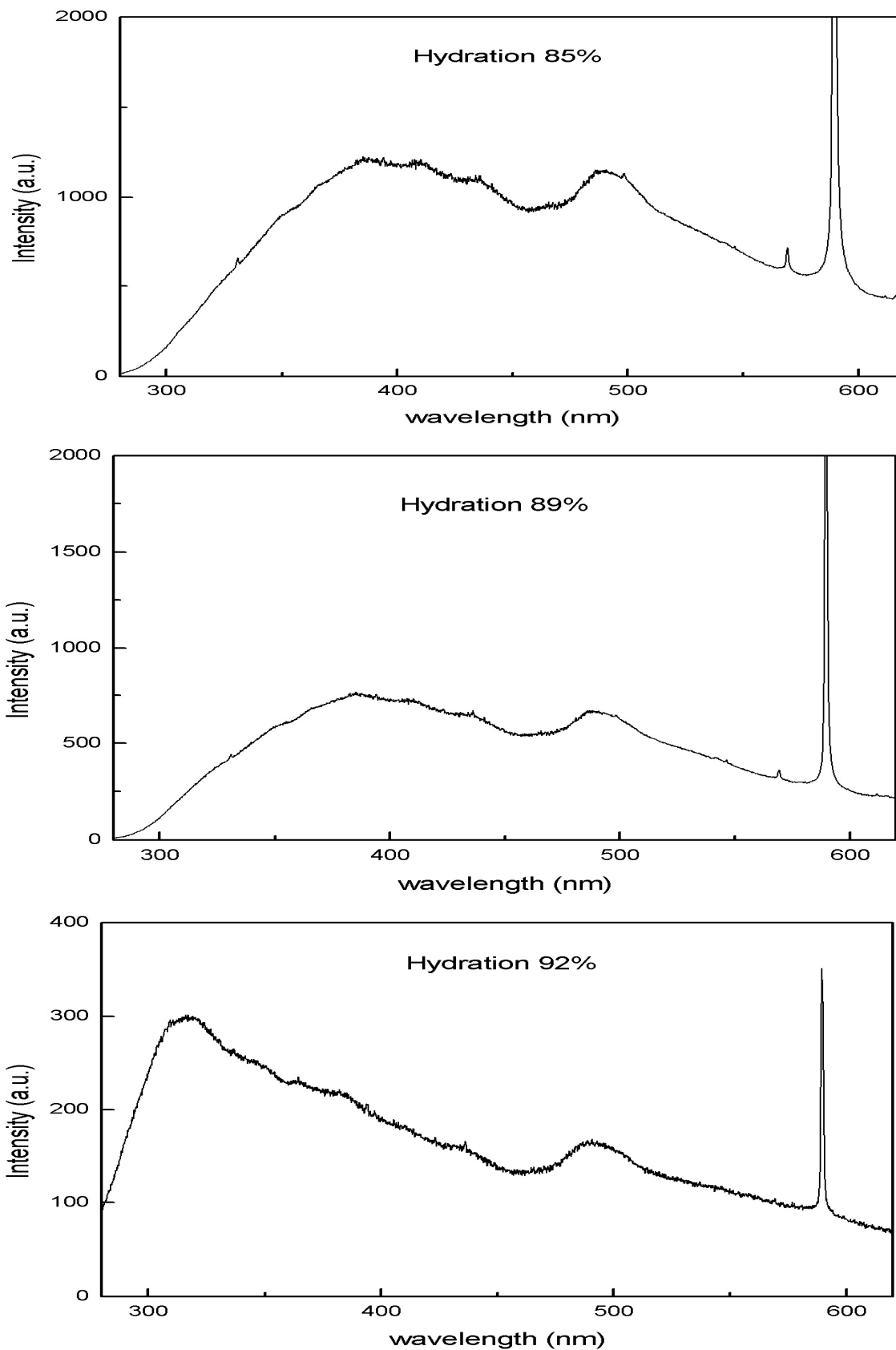
Για την επαλήθευση των αποτελεσμάτων και των συμπερασμάτων που διεξήχθησαν από το πρώτο πείραμα καθώς και για να μελετηθεί η εξάρτηση των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών με τον βαθμό ενυδάτωσης του κερατοειδούς σε συνάρτηση με την επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας ακτινοβολήσης, το πείραμα επαναλήφθηκε.

Η ενυδάτωση των δειγμάτων ρυθμίστηκε με την ίδια διαδικασία που πραγματοποιήθηκε κατά το πρώτο πείραμα και τα δείγματα χωρίστηκαν σε 6 ομάδες ενυδατώσεων 78%, 80%, 82%, 85%, 89% και 92%. Σε κάθε μία από τις 6 ομάδες ενυδάτωσης αντιστοιχούσαν τέσσερις κερατοειδείς χοιρινών. Η μόνη διαφοροποίηση από το αρχικό πείραμα ήταν η τιμή επιφανειακής πυκνότητας ενέργειας που χρησιμοποιήθηκε για την ακτινοβολήση των κερατοειδών ($F=250 \text{ mJ/cm}^2$). Και σε αυτή την περίπτωση η επιφανειακή πυκνότητα ενέργειας ακτινοβολήσης ήταν μέσα στα κλινικά όρια ($180\text{-}250 \text{ mJ/cm}^2$). Η τιμή αυτή επιλέχτηκε σκόπιμα να είναι μεγαλύτερη από την αντίστοιχη τιμή επιφανειακής πυκνότητας ενέργειας με την οποία πραγματοποιήθηκε το πρώτο πείραμα, ώστε να μελετηθεί αν η απόκριση της ενυδάτωσης του κερατοειδούς από τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά, εξαρτάται και από την τιμή επιφανειακής πυκνότητας ενέργειας ακτινοβολήσης. Η παράμετρος αυτή ήταν σημαντικό να μελετηθεί, γιατί οι τιμές επιφανειακής πυκνότητας ενέργειας με τις οποίες πραγματοποιούνται οι επεμβάσεις διαθλαστικής χειρουργικής κυμαίνονται από 180 έως 250 mJ/cm^2 , επομένως διαφορετικές τιμές επιφανειακής πυκνότητας ενέργειας κατά την ακτινοβολήση του κερατοειδούς μπορεί να διαφοροποιούσαν τα αποτελέσματα σε ότι αφορά τις εκτιμώμενες τιμές για την ενυδάτωση του κερατοειδούς.

Ο μέσος όρος των κατεγγραφομένων φασμάτων για κάθε μία από τις 6 διαφορετικές ενυδατώσεις καταγράφεται στην συνέχεια:



Εικόνα 72: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση, του καταγραφόμενου φάσματος εκπομπής κατά την ακτινοβόληση δείγματος χοιρινών κερατοειδών ενυδάτωσης 85%, 89%, 92%, με excimer laser ArF, και πυκνότητα ενέργειας 250 mJ/cm^2 .



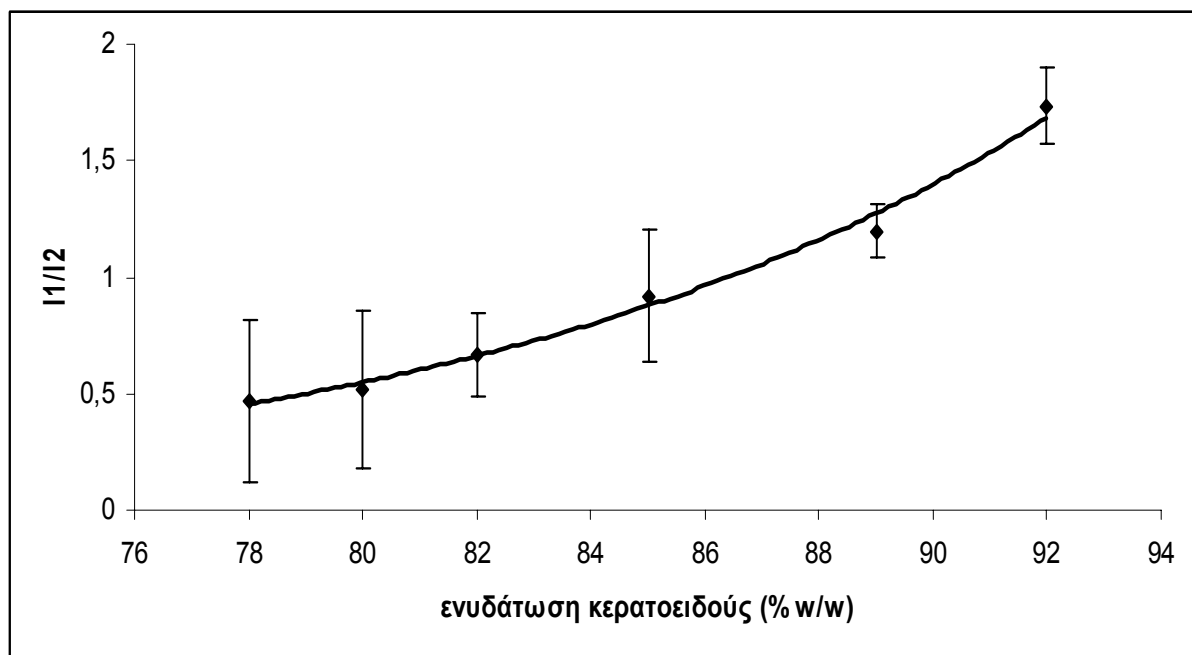
Εικόνα 73: Μέσος όρος και τυπική απόκλιση, του καταγραφόμενου φάσματος εκπομπής κατά την ακτινοβολία δείγματος χοιρινών κερατοειδών ενυδάτωσης 85%, 89%, 92%, με excimer laser ArF, και πυκνότητα ενέργειας 250 mJ/cm^2 .

Ως προς την μορφή τους τα φάσματα παρουσιάζουν σημαντική ομοιομορφία με τα φάσματα αντίστοιχης ενυδάτωσης που καταγράφηκαν κατά την ακτινοβόληση του κερατοειδούς με τιμές επιφανειακής πυκνότητας ενέργειας 193 mJ/cm². Κατά την σύγκριση των φασμάτων που καταγράφηκαν στις 2 περιπτώσεις, διαπιστώνεται ανάλογη συμπεριφορά, καθώς επίσης παρατηρείται σημαντική μείωση της έντασης των καταγεγραμμένων φασμάτων για μεγαλύτερους βαθμούς ενυδάτωσης του κερατοειδούς, όμοια με την συμπεριφορά που παρουσίαζαν φάσματα που καταγράφηκαν στο πρώτο πείραμα.

Εργαζόμενοι κατά τον ίδιο τρόπο με την πρώτη περίπτωση, υπολογίστηκε το εμβαδόν του λόγου των δύο εμφανιζόμενων κορυφών :

$$I_1/I_2 = \frac{\int_{300}^{400} I(l)dl}{\int_{450}^{550} I(l)dl}$$

για κάθε ένα από τα καταγεγραμμένα φάσματα της ίδιας ομάδας ενυδάτωσης και στην συνέχεια υπολογίστηκε ο μέσος όρος τους. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης αναπαρίστανται γραφικά συναρτήσει της επί τοις % w/w ενυδάτωσης του κερατοειδούς:

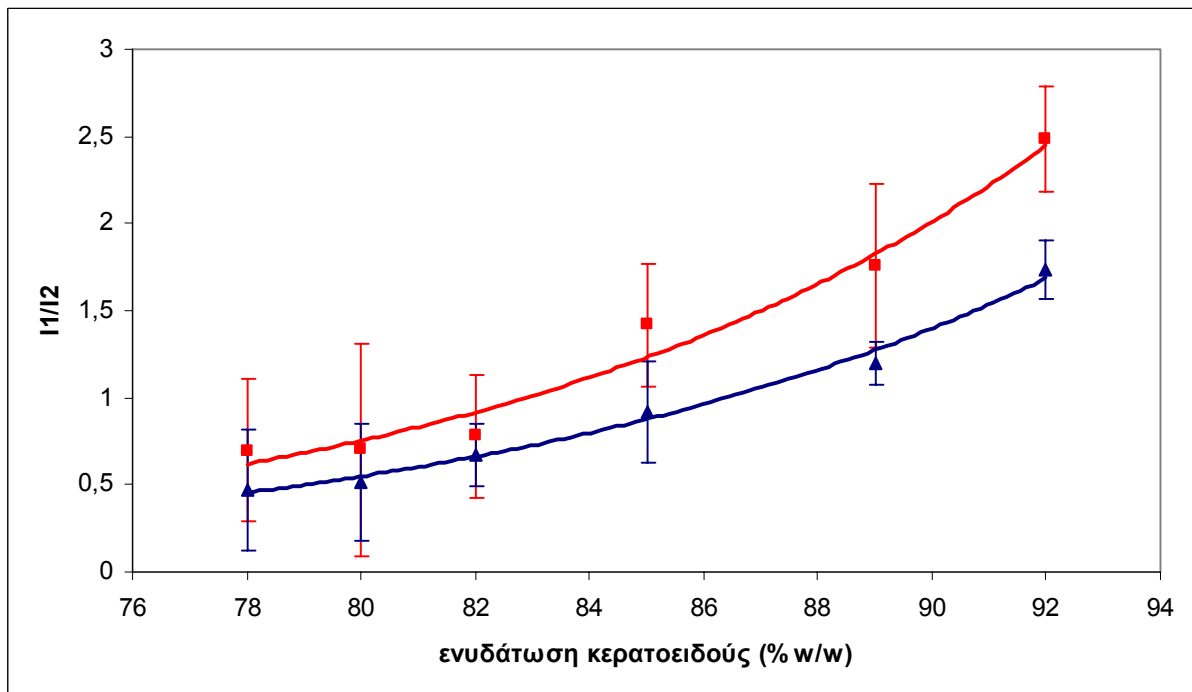


Εικόνα 74 : διάγραμμα συσχέτισης %w/w ενυδάτωση κερατοειδούς συναρτήσει του λόγου των εμβαδών των περιοχών από 300-400nm προς 450-550nm. (F=250 mJ/cm²)

Τα παραπάνω δεδομένα προσομοιώνονται σε αρκετά μεγάλο βαθμό (R²=0,991), από την εκθετική συνάρτηση:

$$\frac{\int_{300}^{400} I(\lambda) d\lambda}{\int_{450}^{550} I(\lambda) d\lambda} = 0,0003e^{0,0935(\% \text{ w/w ενυδάτωση κερατοειδούς})}$$

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα δύο πειράματα προκύπτει το εξής διάγραμμα:



Εικόνα 75: Συγκριτικό διάγραμμα συσχέτισης της επί τοις %w/w ενυδάτωση κερατοειδούς συναρτήσεως του λόγου των εμβαδών των περιοχών από 300-400nm προς 450-550nm για δύο διαφορετικές επιφανειακές πυκνότητες ενέργειας ακτινοβολήσεως -193 mJ/cm² (κόκκινο) και 250 mJ/cm² (μπλε).

Από το παραπάνω διάγραμμα προκύπτει ότι αν και στις δύο περιπτώσεις παρατηρείται εκθετική αύξηση του λόγου των δύο κορυφών συναρτήσεως του βαθμού ενυδάτωσης, η οποία υποδηλώνει την εντονότερη εκδήλωση μοριακού φθορισμού καθώς αυξάνει η ενυδάτωση του κερατοειδούς, η αύξηση αυτή είναι μικρότερη στην περίπτωση που ο κερατοειδής ακτινοβολείται με μεγαλύτερες τιμές επιφανειακής πυκνότητας ενέργειας.

Αυτή η παρατήρηση μπορεί να εξηγηθεί αν ληφθεί υπ'όψην το γεγονός ότι κατά την ακτινοβολήση του κερατοειδούς με μεγάλες τιμές επιφανειακής πυκνότητας ενέργειας ενδέχεται να είναι εντονότερη η ύπαρξη πλάσματος κατά την εκτομή του κερατοειδούς λόγω του επιθετικότερου χαρακτήρα της διαδικασίας ακτινοβολήσεως. Ενδέχεται η εντονότερη ακτινοβολία από την δημιουργία πλάσματος να υπερκαλύπτει σε μεγάλο βαθμό τον μοριακό φθορισμό που παρατηρείται στις περιπτώσεις υψηλής ενυδάτωσης του κερατοειδούς. Αντίθετα για μικρότερους βαθμούς ενυδάτωσης του κερατοειδούς η διαφοροποίηση των καταγεγραφόμενων τιμών δεν είναι

μεγάλη και μάλιστα οι υπολογιζόμενες τιμές βρίσκονται μέσα στα όρια των πειραματικών σφαλμάτων. Αυτό ήταν αναμενόμενο, αν ληφθεί υπ' όψη ότι στις χαμηλές τιμές ενυδάτωσης ο μοριακός φθορισμός είχε ελάχιστη συνεισφορά.

Ακόμη διαπιστώνεται ότι αν και για τις υψηλότερες τιμές ενυδάτωσης του κερατοειδούς εμφανίζεται μια ξεκάθαρη εξάρτηση του βαθμού ενυδάτωσης με τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά, στις χαμηλότερες τιμές ενυδάτωσης το σύστημα εμφανίζεται να έχει μικρότερη ευαισθησία. Οι τιμές των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών που υπολογίστηκαν για κάθε μία από τις χαμηλότερες ενυδατώσεις του κερατοειδούς, εμφανίζουν παραπλήσιες τιμές και αν ληφθούν υπόψη και τα αντίστοιχα σφάλματα παρατηρείται ότι οι τιμές αυτές υπερκαλύπτονται σε σημαντικό βαθμό. Ενδέχεται η μειωμένη ευαισθησία της συγκεκριμένης μεθόδου υπολογισμού του βαθμού ενυδάτωσης να οφείλεται και πάλι στον περιορισμένο χαρακτήρα του μοριακού φθορισμού στις χαμηλότερες ενυδατώσεις.

Καταλήγοντας, από την παραπάνω μελέτη και επεξεργασία προκύπτει ότι η καταγραφή του φάσματος εκπομπής κατά την ακτινοβολήση του κερατοειδούς σε πραγματικές κλινικές συνθήκες είναι υψηλής σημασίας. Το καταγραφόμενο φάσμα παρέχει σημαντικές πληροφορίες για τον βαθμό ενυδάτωσης του κερατοειδή, ο οποίος αποτελεί ένα παράγοντα μεγάλης σπουδαιότητας για την επιτυχή έκβαση της επέμβασης διαθλαστικής χειρουργικής.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6°

6.1) Συμπεράσματα

Κατά την διάρκεια της παρούσας μελέτης χρησιμοποιήθηκε κατάλληλη οπτική διάταξη σε συνδυασμό με φασματογράφο και ανιχνευτή CCD για την καταγραφή του φάσματος εκπομπής που παράγεται κατά την ακτινοβόληση του κερατοειδικού ιστού με excimer laser στα 248 nm και στα 193 nm.

Μετά από εκτεταμένη έρευνα που πραγματοποιήθηκε για να μελετηθούν όλες οι παράμετροι που θα μπορούσαν να εκμεταλλευτούν για την διεξαγωγή συμπερασμάτων, καταγράφηκαν φάσματα εκπομπής για διάφορες συνθήκες ενυδάτωσης του κερατοειδούς τα οποία μελετήθηκαν και αναλύθηκαν. Αποτέλεσμα της μελέτης αυτής ήταν διεξαγωγή σημαντικών συμπερασμάτων σε ότι αφορά την εκτίμηση της ενυδάτωσης του κερατοειδούς.

Κατά την διάρκεια της διαθλαστικής επέμβασης, όπου ο κερατοειδής ακτινοβολείται με πυκνότητες ενέργειας μεταξύ 180-250 mJ/cm², θεωρείται χρήσιμη η καταγραφή του φάσματος εκπομπής. Το φάσμα που καταγράφεται από την ακτινοβόληση του κερατοειδικού ιστού με τέτοιες πυκνότητες ενέργειας, αποτελεί προϊόν μιας σύνθετης διαδικασίας. Δεν θεωρείται ότι το καταγραφόμενο φάσμα απεικονίζει μόνο μοριακό φθορισμό που παράγεται κατά την ακτινοβόληση του υλικού, από την στιγμή που συντελείται εκτομή του ιστού. Στην πραγματικότητα το φάσμα εκπομπής που καταγράφεται αποτελεί προϊόν σύνθετης διαδικασίας. Όπως παρατηρήθηκε με αύξηση της ενέργειας καταγραφόταν αύξηση της έντασης του φάσματος όχι όμως και σημαντική διαφοροποίηση της μορφής του φάσματος σε σχέση με αυτό που καταγραφόταν κατά την ακτινοβόληση με χαμηλές επιφανειακές πυκνότητες ενέργειας. Η παρατήρηση αυτή υποδηλώνει την υπόθεση ότι κατά την ακτινοβόληση του κερατοειδούς με threshold και suprathreshold ενέργειες μέσα στο νέφος των εκπεμπόμενων σωματιδίων ανιχνεύεται η ύπαρξη πλάσματος. Κατά την ακτινοβόληση του κερατοειδούς και την συνεπαγόμενη εκπομπή ακτινοβολίας, εκτός από τις ενεργειακές μεταβάσεις σε υψηλότερες στάθμες, που έχουν ως απώτερο αποτέλεσμα τους την εκπομπή φθορισμού, υπάρχουν προϊόντα αποδόμησης τα οποία με την αλληλεπίδραση του με τα σωματίδια του αέρα οδηγούν στην δημιουργία πλάσματος. Υπάρχει μία πιθανότητα, στο καταγραφόμενο φάσμα εκπομπής να συμβάλει και η ύπαρξη ακτινοβολίας από το υπόστρωμα κάτω από την περιοχή ακτινοβόλησης στον κερατοειδή. Όσο αυξάνει η πυκνότητα ενέργειας, τόσο πιο έντονα είναι τα φαινόμενα που λαμβάνουν μέρος, με αποτέλεσμα να σπάνε περισσότεροι δεσμοί και το παρακείμενο στρώμα να υπόκεινται σε μεγαλύτερη καταπόνηση. Σε πολύ ψηλές πυκνότητες ενέργειας αρχίζουν να καταγράφονται και γραμμές εκπομπής που αποδίδονται σε μοριακούς δεσμούς του άνθρακα.

Τα προϊόντα που παράγονται κατά την αλληλεπίδραση του laser με τον κερατοειδή, καταγράφονται με το φάσμα εκπομπής το οποίο όπως παρατηρήθηκε μπορεί να δώσει χρήσιμες

πληροφορίες σε ότι αφορά την περιεκτικότητα του σε νερό, έναν παράγοντα που αποτελεί πολύ σημαντική παράμετρο κατά την διάρκεια μιας διαθλαστικής επέμβασης.

Η αρχική υποψία ότι μέσα στην ακτινοβολία που εκπέμπεται κατά την αλληλεπίδραση του laser με τον κερατοειδή, ενδεχομένως να υπάρχουν πληροφορίες που αφορούν την ενυδάτωση του εκτεμόμενου κερατοειδικού ιστού, μέσα από την παρούσα μελέτη επιβεβαιώθηκε σε αρκετά μεγάλο βαθμό.

Είναι γνωστό ότι το νερό δεν απορροφά σε μεγάλο βαθμό στα 193nm σε αντίθεση με το κολλαγόνο, το οποίο αποτελεί έναν πολύ καλό απορροφητή σε αυτά τα μήκη κύματος (Edige et al., 1993, Pettit et al., 1993, Vogel & Venugopalan, 2003). Για το λόγο αυτό, πιστεύεται ότι ένας κερατοειδής σχετικά αφυδατωμένος, που θα έχει δηλαδή μεγαλύτερη συγκέντρωση κολλαγόνου, θα δίνει διαφοροποιημένα φάσματα εκπομπής από έναν υπερευδατωμένο κερατοειδή λόγω των διαφοροποιημένων μηχανισμών που λαμβάνουν μέρος κατά την ακτινοβολία των ιστών.

Για την επαλήθευση αυτών των υποθέσεων πραγματοποιήθηκαν πειράματα πάνω σε κερατοειδείς χοιρινών, τα οποία είχαν υποστεί κατάλληλη επεξεργασία, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν διαφορετικούς βαθμούς ενυδάτωσης. Μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν για ακτινοβολία των κερατοειδών με excimer laser ArF (193 nm) και για δύο διαφορετικές τιμές επιφανειακής πυκνότητας ενέργειας ακτινοβολίας.

Τα αποτελέσματα από την συσχέτιση της μορφής και της έντασης των φασμάτων εκπομπής από κερατοειδείς διαφορετικής ενυδάτωσης, ήταν απόλυτα ενθαρρυντικά. Από την επεξεργασία των αποτελεσμάτων προέκυψε συσχέτιση, η οποία προσεγγίζεται εκθετικά, του λόγου των εμβαδών των 2 κορυφών που καταγράφονται στα φάσματα εκπομπής, συναρτήσεως του βαθμού ενυδάτωσης. Η συσχέτιση αυτή οφείλεται στην εκδήλωση μοριακού φθορισμού ο οποίος είναι εντονότερος σε καταστάσεις υψηλής ενυδάτωσης.

Ακόμη διαπιστώθηκε ότι η εξάρτηση της ενυδάτωσης του κερατοειδούς από τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά εξαρτάται και από την τιμή της επιφανειακής πυκνότητας ενέργειας με την οποία ακτινοβολείται ο κερατοειδικός ιστός. Και πάλι η εξάρτηση αυτή οφείλεται στην επικάλυψη του εκτεμόμενου μοριακού φθορισμού από την έντονη ακτινοβολία λόγω ύπαρξης ισχυρότερου πλάσματος κατά την ακτινοβολία του κερατοειδούς με μεγαλύτερες τιμές επιφανειακής πυκνότητας ενέργειας.

Το γενικότερο συμπέρασμα είναι ότι στην ακτινοβολία εκπομπής που προκύπτει κατά την ακτινοβολία του κερατοειδούς με excimer laser υπάρχουν πληροφορίες που αφορούν το βαθμό ενυδάτωσης του κερατοειδούς.

Τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από την παρούσα μελέτη ενθαρρύνουν την περαιτέρω έρευνα πάνω στην εφαρμογή φασματοσκοπικών τεχνικών κατά την αλληλεπίδραση laser - κερατοειδή, καθώς υπάρχουν προοπτικές δημιουργίας κατάλληλου οργάνου για την on line καταγραφή των φασμάτων εκπομπής, το οποίο θα μπορούσε να εκτιμά τον βαθμό ενυδάτωσης του κερατοειδή. Μία τέτοια πληροφορία θα μπορούσε να παρέχεται αυτόματα στο hardware του υπολογιστή που ελέγχει την ακτινοβολία του κερατοειδή κατά την διάρκεια της επέμβασης, για την όσο το

δυνατό καλύτερη διόρθωση του διαθλαστικού σφάλματος. Το κύριο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου εκτίμησης της ενυδάτωσης του κερατοειδούς είναι ότι βασίζεται στην πληροφορία που υπάρχει στην ακτινοβολία που εκπέμπεται κατά την ακτινοβόληση του κερατοειδούς. Δεν απαιτείται η χρήση άλλων πηγών διέγερσης (π.χ. ενός δεύτερου laser), οι οποίες θα επιβάρυναν άσκοπα των κερατοειδή, ενώ ο μοναδικός επιπλέον εξοπλισμός που απαιτείται είναι ένας φασματογράφος με κατάλληλο ανιχνευτή και το ανάλογο software για την εκτίμηση της ενυδάτωσης ανάλογα με τα κατεγραφόμενα δεδομένα.

6.2) Μελλοντική έρευνα

Αν και στην παρούσα μελέτη, μελετήθηκαν πολλές διαφορετικοί παράμετροι που συνεισφέρουν στην μορφή και στην ένταση του φάσματος, μπορούν να προταθούν κάποιοι ακόμη παράμετροι οι οποίοι μπορούν να βελτιστοποιήσουν τις συνθήκες κάτω από τις οποίες καταγράφονται τα φάσματα εκπομπής καθώς και κάποιες περαιτέρω έρευνες και μελέτες που μπορούν να πραγματοποιηθούν πάνω σε αυτό τον τομέα. Όλες οι προτεινόμενες μελλοντικές ενέργειες συνοψίζονται παρακάτω:

- 1) Κρίνεται σκόπιμη, για περαιτέρω πιο ολοκληρωμένη μελέτη, η χρήση φασματογράφου με ευαισθησία σε μεγαλύτερο φασματικό εύρος, από ότι ο φασματογράφος ocean optics που χρησιμοποιήθηκε κατά την παρούσα μελέτη, και ο οποίος εμφάνιζε ευαισθησία στην φασματική περιοχή 300nm-600nm. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει η περιοχή κάτω από το 300nm, στην οποία πιστεύεται ότι μπορεί να υπάρχει χρήσιμη πληροφορία σε ότι αφορά το φάσμα εκπομπής φθορισμού κατά την αλληλεπίδραση του ιστού με το excimer laser.
- 2) Μια πολύ ενδιαφέρουσα προοπτική, είναι η in – situ καταγραφή του φάσματος εκπομπής κατά την διάρκεια διαθλαστικής επέμβασης. Με κατάλληλο σχεδιασμό και προγραμματισμό, η in-situ καταγραφή του φάσματος εκπομπής θα ήταν εφικτή και μάλιστα χωρίς να παρουσιάζεται ο κίνδυνος δημιουργίας κάποιας επιπλοκής στον ασθενή. Τέτοιου είδους καταγραφή των φασμάτων θα ήταν εξαιρετικά ενδιαφέρουσα, γιατί θα κατέγραφε το φάσμα εκπομπής από τον κερατοειδή κάτω από πραγματικές κλινικές συνθήκες. Στην περίπτωση αυτή, θα μπορούσαν να μελετηθούν τα κατεγραφόμενα φάσματα και να συγκριθούν με τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από την παρούσα μελέτη. Με βάση αυτή την μελέτη θα μπορούσαν να διεξαχθούν

ασφαλέστερα συμπεράσματα για την καταλληλότητα και σκοπιμότητα της καταγραφής των φασμάτων εκπομπής κατά την διάρκεια των επεμβάσεων διαθλαστικής χειρουργικής.

- 3) Μία παράμετρος η οποία δεν μελετήθηκε στην παρούσα μελέτη, είναι η μορφή του φάσματος εκπομπής που προκύπτει από κερατοειδή που παρουσιάζει ουλές ή από κερατοειδή που καλύπτεται από μη υγιή ιστό. Με βάση την βιβλιογραφία (Chuck et al., 2002, Phillips et al., 1997) πιστεύεται ότι το φάσμα εκπομπής μη υγιούς ιστού ενδέχεται να είναι σημαντικά διαφοροποιημένο από αυτό του υγιούς. Αν, αυτή η υπόθεση επαληθευτεί, η καταγραφή του φάσματος εκπομπής κατά την διάρκεια επέμβασης PTK κρίνεται όχι μόνο ωφέλιμη αλλά και επιβεβλημένη για την καλύτερη αντιμετώπιση τέτοιων περιστατικών.
- 4) Ενδιαφέρον θα είχε και η καταγραφή των φασμάτων εκπομπής που προκύπτουν από δείγματα ανθρώπινων κερατοειδών, για να μελετηθούν και να συγκριθούν τα φάσματα εκπομπής με τα αποτελέσματα της παρούσα έρευνας.
- 5) Τέλος σκόπιμη θα ήταν η καταγραφή των φασμάτων εκπομπής για ένα ακόμη μεγαλύτερο εύρος ενυδατώσεων για να μελετηθεί με ακόμα μεγαλύτερη ακρίβεια η εξάρτηση του βαθμού ενυδάτωσης από τα χαρακτηριστικά του φάσματος εκπομπής.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Albagli, D., et al., *Photomechanical basis of laser ablation of biological tissue*. OPTICS LETTERS, 1994. **19**(21).
2. Aron- Rosa, D.S., et al., *Excimer laser surgery of the cornea: Qualitative and quantitative aspects of photoablation according to the energy density*. Journal of Cataract & Refractive surgery, 1986. **12**: p. 547-551.
3. Bauer, N.J., F. Hendrikse, and W.F. March, *In vivo confocal Raman spectroscopy of the human cornea*. Cornea, 1999. **18**(4): p. 483-8.
4. Bauer, N.J., et al., *Noninvasive assessment of the hydration gradient across the cornea using confocal Raman spectroscopy*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998. **39**(5): p. 831-5.
5. Berns, M.W., et al., *Human Corneal Ablation Threshold Using the 193-nm ArF Excimer Laser*. 5, 1999. **40**.
6. Bron, A.J., *The architecture of the corneal stroma*. Br J Ophthalmol, 2001. **85**(4): p. 379-81.
7. Campos, M., et al., *Ablation rates and surface ultrastructure of 193 nm excimer laser keratectomies*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1992. **34**: p. 2493-2500.
8. Chirila, T.V. and P.P. Van Saarloos, *Ablation of poly (2-hydroxyethyl methacrylate) by 193-nm excimer laser radiation*. Journal of Applied Polymer Science, 1992. **44**: p. 1355-1363.
9. Chuck, R.S., et al., *Fluorescence-guided laser removal of chemically damaged cornea*. J Cataract Refract Surg, 2002. **28**(10): p. 1847-52.
10. Chuck, R.S., et al., *193-nm excimer laser-induced fluorescence detection of fluoroquinolones in rabbit corneas*. Arch Ophthalmol, 2004. **122**(11): p. 1693-9.
11. Cohen, D., et al., *Ablation spectra of the human cornea*. J Biomed Opt, 2001. **6**(3): p. 339-43.
12. Costela, A., et al., *Ablation of poly (methyl methacrylate) and poly(2- hydroxyethyl methacrylate) by 308, 222 and 193 nm excimer-laser irradiation*. Applied Physics A-Material Science & Processing 1995. **60**: p. 261-270.
13. Dair, G.T., et al., *Investigation of corneal ablation efficiency using ultraviolet 213-nm solid state laser pulses*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999. **40**(11): p. 2752-6.
14. David L.Andrews, D.L., *Lasers in Chemistry*. second ed.
15. Dougherty, P.J., K.L. Wellish, and R.K. Maloney, *Excimer laser ablation rate and corneal hydration*. Am J Ophthalmol, 1994. **118**(2): p. 169-76.
16. Ediger, M.N., *Excimer – Laser – Induced Fluorescence of Rabbit Cornea: Radiometric Measurement Through the Cornea*. Lasers In Surgery and Medicine, 1991. **11**: p. 93-98.
17. Ediger, M.N., et al., *Transmission of corneal collagen during ArF excimer laser ablation*. Lasers Surg Med, 1993. **13**(2): p. 204-10.
18. Elmer, P., *An Introduction to Fluorescence Spectroscopy* 2000.
19. Fischbarg, J., *Mechanism of fluid transport across corneal endothelium and other epithelial layers: a possible explanation based on cyclic cell volume regulatory changes*. Br J Ophthalmol, 1997. **81**: p. 85-89.
20. Fisher, B.T., *Investigation of interactions between the 193nm ArF excimer laser and corneal tissue*. 2004, University of Florida.

21. Fisher, B.T. and D.W. Hahn, *Measurement of small-signal absorption coefficient and absorption cross section of collagen for 193-nm excimer laser light and the role of collagen in tissue ablation*. Appl Opt, 2004. **43**(29): p. 5443-51.
22. Fisher, B.T., et al., *Assessment of transient changes in corneal hydration using confocal Raman spectroscopy*. Cornea, 2003. **22**(4): p. 363-70.
23. Garrison, B.J. and R. Srinivasan, *Microscopic model for the ablative photodecomposition of polymers by far-ultraviolet radiation (193 nm)*. Applied Physics Letters 1984. **44**: p. 849-851.
24. Gatinel, D., T. Hoang-Xuan, and D.T. Azar, *Volume estimation of excimer laser tissue ablation for correction of spherical myopia and hyperopia*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(5): p. 1445-9.
25. Ginis, H.S., V.J. Katsanevaki, and I.G. Pallikaris, *Influence of ablation parameters on refractive changes after phototherapeutic keratectomy*. J Refract Surg, 2003. **19**(4): p. 443-8.
26. Hahn, D.W., M.N. Ediger, and G.H. Pettit, *Dynamics of ablation plume particles generated during excimer laser corneal ablation*. Lasers Surg Med, 1995. **16**(4): p. 384-9.
27. Hersh, P.S., et al., *Excimer laser phototherapeutic keratectomy. Surgical strategies and clinical outcomes*. Ophthalmology, 1996. **103**(8): p. 1210-22.
28. Hersh, P.S. and J.D. Carr, *Excimer Laser photorefractive Keratectomy*. Ophthalmic Practice 1995. **13**(4).
29. Hersh, P.S., K.L. Fry, and D.S. Bishop, *Incidence and Associations of Retreatment After LASIK* Peter S. Hersh, Kristen L. Fry, Douglas S. Bishop. Ophthalmology, 2003. **110**(4).
30. Hersh, P.S., et al., *Results of phase III excimer laser photorefractive keratectomy for myopia. The Summit PRK Study Group*. Ophthalmology, 1997. **104**(10): p. 1535-53.
31. Huebscher, H.J., U. Genth, and T. Seiler, *Determination of excimer laser ablation rate of the human cornea using in vivo Scheimpflug videography*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1996. **37**: p. 42-46.
32. Jalbert, I., et al., *In vivo confocal microscopy of the human cornea*. Br J Ophthalmol, 2003. **87**(2): p. 225-36.
33. Jongsma, F.H.M., et al., *Confocal Raman Spectroscopy system for noncontact scanning of ocular tissues: An in vitro study*. Optical Engineering, 1997. **36**: p. 3193-3199.
34. Katsanevaki, V.J., et al., *The PALM Technique: histological findings of masked phototherapeutic keratectomy on rabbit corneas*. BMC Ophthalmol, 2003. **3**: p. 4.
35. Kessel, L., et al., *Corneal fluorescence in relation to genetic and environmental factors: a twin study*. Acta Ophthalmol Scand, 2003. **81**(5): p. 508-13.
36. Kim, W.S. and J.M. Jo, *Corneal hydration affects ablation during laser in situ keratomileusis surgery*. Cornea, 2001. **20**(4): p. 394-7.
37. Kim, Y.L., et al., *Variation of corneal refractive index with hydration*. Phys Med Biol, 2004. **49**(5): p. 859-68.
38. Kolozsvari, L., et al., *UV absorbance of the human cornea in the 240- to 400-nm range*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2002. **43**(7): p. 2165-8.
39. Krueger, R.R., S.L. Trokel, and H.D. Schubert, *Interaction of ultraviolet laser light with the cornea*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1985. **26**: p. 1455-1464.
40. Kumar, A., et al., *Characterization of malignant tissue cells by laser-induced breakdown spectroscopy*. APPLIED OPTICS, 2004. **43**(28).
41. Liebovitch, L.S. and S. Weinbaum, *A model of Epithelial Water Transport. The Corneal Endothelium*. Biophysical Journal 1981. **35**.

42. Lin, J.T., *Critical review on refractive surgical lasers*. Optical Engineering, 1995. **34**(3).
43. March, W.F. and N.J. Bauer, *Non-invasive measurement of corneal hydration*. J Refract Surg, 2001. **17**(2 Suppl): p. S205-10.
44. Muller-Stolzenburg, N., et al., *[Fluorescence behavior of the cornea with 193 nm excimer laser irradiation]*. Fortschr Ophthalmol, 1990. **87**(6): p. 653-8.
45. Nevin, A., et al., *Analysis of protein-based binding media found in paintings using laser induced fluorescence spectroscopy*. Analytica Chimica Acta, 2006.
46. Oshika, T., et al., *Corneal hydration and central islands after excimer laser photorefractive keratectomy*. J Cataract Refract Surg, 1998. **24**(12): p. 1575-80.
47. Ousley, P.J. and M.A. Terry, *Hydration effects on corneal topography*. Arch Ophthalmol, 1996. **114**(2): p. 181-5.
48. Pallikaris, I.G., et al., *Corneal hydration monitored by laser-induced breakdown spectroscopy*. J Refract Surg, 1998. **14**(6): p. 655-60.
49. Patel, S., J.L. Alio, and J.J. Perez-Santonja, *Refractive index change in bovine and human corneal stroma before and after lasik: a study of untreated and re-treated corneas implicating stromal hydration*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004. **45**(10): p. 3523-30.
50. Pettit, G.H. and M.N. Ediger, *Corneal-tissue absorption coefficients for 193- and 213-nm ultraviolet radiatio*. Appl Opt, 1996. **35**(19).
51. Pettit, G.H. and M.N. Ediger, *Pump/probe transmission measurements of corneal tissue during excimer laser ablation*. Lasers Surg Med, 1993. **13**(3): p. 363-7.
52. Pettit, G.H., M.N. Ediger, and R.P. Weiblinger, *Dynamic optical properties of collagen-based tissue during ArF excimer laser ablation*. Appl Opt, 1993. **32**(4).
53. Pettit, G.H., M.N. Ediger, and R.P. Weiblinger, *Excimer laser ablation of the cornea*. Optical Engineering, 1995. **34**(3).
54. Phillips, A.F. and P.J. McDonnell, *Laser-induced fluorescence during photorefractive keratectomy: a method for controlling epithelial removal*. Am J Ophthalmol, 1997. **123**(1): p. 42-7.
55. Puliafito, C.A., et al., *High speed photograph of excimer laser ablation of the cornea*. Arch Ophthalmol, 1987a. **105**(1255-1259).
56. Ren, Q., et al., *Laser refractive surgery: review and current status*. Optical Engineering, 1995. **34**(3).
57. Seiler, T., *[Laser surgery of the cornea]*. Fortschr Ophthalmol, 1990. **87**(2): p. 111-4.
58. Seiler, T., et al., *Side effects in excimer corneal surgery. DNA damage as a result of 193 nm excimer laser radiation*. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol, 1988. **226**(3): p. 273-6.
59. Shori, R.K., et al., *Quantification and Modeling of the Dynamic Changes in the Absorption Coefficient of Water at $\lambda = 2.94 \mu\text{m}$* . Journal on Selected topics in Quantum Electronics, 2001. **7**(6).
60. Silbert, J.A., *The Art of LASIK*. Br J Ophthalmol, 2004. **84**.
61. Skoog, D.A., *Principles of Instrumental Analysis*. 3rd ed.
62. Srinivasan, R., *Ablation of polymethyl methacrylate films by pulsed (ns) ultraviolet and infrared (9,17 μm) laser. A comparative study by ultrafast imaging*. Journal of Applied Physics, 1993. **73**: p. 265-269.
63. Staveteig, P.T. and J.T. Walsh, *Dynamic 193-nm optical properties of water* Appl Opt, 1996. **35**: p. 3392-3403.

64. Svelto, O., *Principles of Lasers*. fourth ed: Plenum.
65. Telfair, W.B., et al., *Histological comparison of corneal ablation with Er:YAG laser, Nd:YAG optical parametric oscillator, and excimer laser*. J Refract Surg, 2000. **16**(1): p. 40-50.
66. Thomas Serway, T., *Σύγχρονη Φυσική*: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης
67. Trokel, S.L., R. Srinivasan, and B. Braren, *Excimer laser surgery of the cornea*. Am J Ophthalmol, 1983. **96**(6): p. 710-5.
68. Tuft, S., et al., *Characterization of the fluorescence spectra produced by excimer laser irradiation of the cornea*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1990. **31**(8): p. 1512-8.
69. Uma, L., D. Balasubramanian, and Y. Sharma, *In situ fluorescence spectroscopic studies on bovine cornea*. Photochem Photobiol, 1994. **59**(5): p. 557-61.
70. Van Saarloos, P.P. and I.J. Constable, *Bovine corneal stroma ablation rate with 193-nm excimer laser irradiation: Quantitative measurement*. Refractive & Corneal surgery, 1990. **6**: p. 424-429.
71. Van Schaik, H.J., et al., *Autofluorescence of the diabetic and healthy human cornea in vivo at different excitation wavelengths*. Exp Eye Res, 1999. **68**(1): p. 1-8.
72. Venugopalan, V., N.S. Nishioka, and B.B. Mikic, *The Thermodynamic Response of Soft Biological Tissues to Pulsed Ultraviolet Laser Irradiation*. Biophysical Journal, 1995 **69**: p. 1259-1271.
73. Vogel, A. and V. Venugopalan, *Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues*. Chem Rev, 2003. **103**(577-644).
74. Wehry, E.L., *Handbook for instrumental techniques for a analytical chemistry*.
75. Yablon, A.D., et al., *Measurement of tissue absorption coefficients by use of interferometric photothermal spectroscopy*. Appl Opt, 1999. **38**(7).
76. Zuclich, J.A., *Ultraviolet-induced photochemical damage in ocular tissues*. Health Phys, 1989. **56**(5): p. 671-82.
77. Ανδριτσάκης, Α., *Lasers και Οπτοηλεκτρονικές διατάξεις*: Λύχνος.
78. Γκίνης, Χ., *Excimer laser ,σημειώσεις του μεταπτυχιακού προγράμματος σπουδών «Οπτική και Όραση»*.
79. Κουκτζελά, Μ., *Επίδραση της συντήρησης σε υγρό άζωτο και φορμόλη στις μετρήσεις in – vitro του φθορισμού επαγόμενου από laser σε περιφερειακούς αρτηριακούς ιστούς*, διπλωματική εργασία τμήμα Φυσικής 1997, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
80. Κουνής, Γ., *Φασματοσκοπικός προσδιορισμός με LIBS τη ενυδάτωσης του κερατοειδούς του οφθαλμού σε πραγματικό χρόνο (in real time)*, διπλωματική εργασία, τμήμα Φυσικής. 1997, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
81. Σολωμίδου, Μ., *Η τεχνική LIF στη διαγνωστική έργων τέχνης*, διπλωματική εργασία, τμήμα Φυσικής. 1997, Πανεπιστήμιο Κρήτης.
82. Ψύλλας, Κ.Γ., *Εισαγωγή στην Οφθαλμολογία και στην Νευροοφθαλμολογία*: Επιστημονικών Βιβλίων και Περιοδικών.