Tümör Anjiyogenezin Moleküler Görüntülenmesi İçin Fotoakustik Mikroskop Geliştirilmesi

Program Kodu: 1001

Proje Kodu: 112T253

Proje Yürütücüsü:

Doç. Dr. MEHMET BURÇİN ÜNLÜ

Araştırmacılar:

Prof. Dr. YANİ İSKARLATOS

Prof. Dr. MEHMET NACİ İNCİ

Danışmanlar:

Prof. Dr. NESRİN ÖZÖREN

Doç. Dr. FATİH ÖMER İLDAY

Bursiyerler:

Esra AYTAÇ KİPERGİL

Aytaç DEMİRKIRAN

Nasire ULUÇ

Önsöz

Bu projede yüksek çözünürlüklü bir fotoakustik mikroskop ve *in silico* bir tümör modeli geliştirdik. Verdiği destekten dolayı TÜBİTAK'a teşekkür ediyoruz.

Ayrıca proje hakemine de proje süresince gösterdiği sabır, anlayış ve yardımlar için teşekkür ediyoruz.

Gelişmekte olan ülkelere bakıldığında hastalık tanı ve tedavisi üzerine yapılan araştırmalarda farklılıklar gözlenmektedir. Yenilikçi biyoteknoloji şirketleri ve klinik çalışmalar göz önüne alınarak gelişmekte olan ülkeler kıyaslandığında Türkiye'de ağırlık kardiyovaküler hastalıklarda ve kanserdedir. Güney Afrika haricinde diğer ülkelerde kanser çalışmaları önde gitmektedir. Türkiye ve Brezilya'da inovatif biyoteknoloji şirketi sayısı diğerlerine göre azdır. Türkiye'de kanser ve kardiyovasküler hastalıkların tedavisi üzerine çok sayıda yayın yapılmakla beraber, bu hastalıkların tanısı ve tedavisi için gerekli görüntüleme teknolojilerinin geliştirilmesi üzere yapılan araştırmalar yok denecek kadar azdır. Gelişmiş olan ülkelerden büyük paralar harcanarak bu teknolojiler satın alınmaktadır. Bu projenin katkılarından biri uzun vadede bu bağımlılığı azaltmak için bir adım atmak ve hastalıkların anlaşılmasında gösterdiğimiz akademik canlılığı yakalayabilecek güçte bir biyogörüntüleme atılımı başlatmaktır.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ iv
TABLO LİSTESİ vii
ÖZET viii
ABSTRACT ix
1. GİRİŞ 1
2. YÖNTEMLER 3
2.1 Teorik Çalışmalar 3
2.1.1 Genel Olarak Fotoakustik Dalga Denkleminin Elde Edilmesi 3
2.1.2. Fotoakustik Mikroskop Sisteminde Çözünürlük 4
2.1.2.1. Uzaysal Çözünürlük 5
2.1.2.1.1. Yanal Çözünürlük 5
2.1.2.1.2. Dikey Çözünürlük 6
2.1.2.2. Derinlik Çözünürlüğü 6
2.1.2.3. Kontrast Çözünürlüğü 7
2.1.2.4. Zamansal Çözünürlük 7
2.1.3 Yeni Bir Yaklaşım ile Fotoakustik Dalga Denkleminin Analitik Çözümü 8
2.1.4. Mikrobaloncuk üzerine etki eden Fotoakustik Radyasyon Kuvveti 15
2.2 Deneysel Çalışmalar 21
2.2.1 Fotoakustik Görüntüleme için Kullanılan Lazerlerin Özellikleri 21
2.2.2 Proje için yapılan fiber lazerin kurulumu 26
2.2.2.1. Osilatör 26
2.2.2.2 Ön Amplifikatör 27
2.2.2.3 Final Amplifikatör 29
2.2.2.4. Superkontinyum Üretilmesi 30
2.2.3 Görüntü Oluşturmada Kullanılan Yöntem ve Deneyler 33
2.2.3.1 Fotoakustik Mikroskop Çalışma Modları 33
2.2.3.2 Ultrason Sistemi 35
2.2.4.Fotoakustik Sistemi 38
2.2.5. Fantom Deneyler 38
2.2.5.1. ‘At kılı’ fantom deneyleri 39
2.2.5.2. ‘Farklı renklerde doldurulmuş mikrotüp’ fantomu deneyleri 40

2.2.5.3. USAF 1951 çözünürlük testi..... 42
..... 44
3.SONUÇLAR ve TARTIŞMA 51
5.PROJE ÇIKTILARI..... 64
Yayınlar..... 64
6. KAYNAKLAR 72

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1 Optik çözünürlüklü ve akustik çözünürlüklü fotoakustik mikroskop sistemlerinin şematiği [L.V. Wang et al. Progress In Electromagnetics Research, Vol. 147, 1-22, 2014].... 5
Şekil 2 Fotoakustik görüntülemede kullanılan çözünürlük kavramlarının şematikleri..... 7
Şekil 3 Normalize edilmiş fotoakustik dalganın $p(r,t)/p_0$ normalize zamana Vst/R göre değişimi a) r=2R b) r=4R c)r=6R iken ve $\boldsymbol{\tau R = 10}$ iken gösterimi.....10
Şekil 4 Normalize edilmiş fotoakustik dalganın $p(r,t)/p_0$ normalize zamana Vst/R göre değişimi a) r=2R b) r=4R c) r=6R iken ve$\boldsymbol{\tau R = 10}$ iken gösterimi.....11
Şekil 5 12
Şekil 6 13
Şekil 7 Normalize edilmiş fotoakustik dalganın $p(r,t)/p_0$ normalize zamana Vst/R göre r=2R, atım süresi τ= 5 ns ve R = 75 μm olduğunda demet genişliği (a) σ = 50 μm and (b) σ = 75 μm iken değişimi.....14
Şekil 8 Normalize edilmiş fotoakustik dalganın $p(r,t)/p_0$ lazerin atım süresine göre farklı demet genişlikleri için, σ = 25, 50, and 75 μm, r = 100 μm olduğunda değişimi.....15
Şekil 9 R yarıçaplı soğurucu ile merkezinden r uzaklıktaki, R_0 yarıçaplı mikrobalon.....16
Şekil 10 Sovonue, Albunex, andQuantison üzerindeki birincil akustik radyasyon kuvvetinin (a) 5 μm çapındaki resonans frekansları sırasıyla ω_0 = 2.2, 5.2, and 11.0 MHz olan mikrobaloncuklar için ve (b) 10 μm çapındaki resonans frekansları sırasıyla ω_0 = 0.9, 1.9, and 4.0 MHz olan mikrobaloncuklar için, atım süresi $\boldsymbol{\tau = 12\omega 0}$ kanın soğurma katsayısı μa, 6.9 cm−1, tekrar frekansı vPRF = 1 MHz, ve demet genişliği σ = 70 μm olduğunda, mikrobaloncukların pozisyonuna bağlı olarak değişimi. 18
Şekil 11 Sovonue, Albunex, and Quantison üzerindeki birincil akustik radyasyon kuvvetinin (a) 5 μm çapındaki rezonans frekansları sırasıyla ω_0 = 2.2, 5.2, and 11.0 MHz olan mikro baloncuklar için ve (b) 10 μm çapındaki rezonans frekansları sırasıyla ω_0 = 0.9, 1.9, and 4.0 MHz olan mikro baloncuklar için, atım süresi $\boldsymbol{\tau = 12\omega 0}$ kanın soğurma katsayısı μ_a, 44.8 cm−1, tekrar frekansı vPRF = 1 MHz, ve demet genişliği σ = 70 μm olduğunda, mikro baloncukların pozisyonuna bağlı olarak değişimi. 19
Şekil 12 Sovonue, Albunex, andQuantison üzerindeki birincil akustik radyasyon kuvvetinin (a) 5 μm çapındaki resonans frekansları sırasıyla ω_0 = 2.2, 5.2, and 11.0 MHz olan mikrobaloncuklar için ve (b) 10 μm çapındaki resonans frekansları sırasıyla ω_0 = 0.9, 1.9, and 4.0 MHz olan mikrobaloncuklar için, atım süresi $\boldsymbol{\tau = 12\omega 0}$kanın soğurma katsayısı μa,

268 cm−1, tekrar frekansı *v*PRF = 1 MHz, ve demet genişliği σ = 70 μm olduğunda, mikrobaloncukların pozisyonuna bağlı olarak değişimi. 20
Şekil 13 Birincil akustik radyasyon kuvvetinin, resonans frekansı ω_0 = 11 MHz ve çapı 5 μm olan mikrobaloncuk için, atım süresi $\boldsymbol{\tau = 12\omega 0}$, kanın soğurma katsayısı μa, 44.8 cm−1 olduğunda, farklı tekrar frekansları için, v_{PRF} = 250 kHz, 500 kHz, and 1 MHz, lazerin demet genişliğine bağlı olarak değişimi. 20
Şekil 14 Oksijenli hemoglobin ile de-oksijenli hemoglobinin 500 nm civarındaki soğurma katsayıları (Saka vd., 2010) 22
Şekil 15 Çeşitli doku kromoforları için soğurma spektrumu. Kırmızı çizgi: Oksijenli hemoglobin (HbO2), Mavi çizgi: Oksijensiz Hemoglobin (HHb), siyah çizgi: su, kahverengi çizgi: yağ (a), pembe çizgi : yağ(b), siyah aralıklı çizgi: melanin , yeşil çizgi: kolajen, sarı çizgi: elastin. (Beard vd., 2011) 26
Şekil 16 Osilatör kurulumunun şematiği. WDM: Dalgaboyu-bölmeli çoklayıcı (Wavelength-division multiplexer) 27
Şekil 17 Osilatör çıkışı optik spektrum analize edici ile elde edilen optik spektrum. 27
Şekil 18 Ön amplifikatör kurulumunun şematiği. 28
Şekil 19. FPGA (field programmable gate array) devresinin şematiği. 29
Şekil 20 Final amplifikatörün şematiği. 30
Şekil 21 Superkontinyum spektrumu. 31
Şekil 22. Üretilen supercontinuum ışık. 31
Şekil 23 Fiber lazer sisteminin fotoğrafı 32
Şekil 24 Fiber lazer sisteminin şematiği. 32
Şekil 25 İletim mod fotoakustik mikroskop sisteminin şematiği. 33
Şekil 26 Yansıma mod fotoakustik mikroskop sistemi. 34
Şekil 27 Deneylerde kullanılan iletim modu. 34
Şekil 28 Projede kullanılan farklı merkez frekanslarındaki ultrason problar 35
Şekil 29 Atım/yankı sinyalleri 36
Şekil 30 Osiloskop ile üretici/alıcı'nın atım/yankı modunda çalışmasını sağlayan kablo bağlantılar 36
Şekil 31 Üretici/alıcı (sağda) ile ön amplifikatörün fotoğrafı. 37
Şekil 32 Osiloskop ile üretici/alıcı ayarları. 37
Şekil 33 Veri toplama kartının fotoğrafı. 38
Şekil 34 Fotoakustik mikroskop sisteminin şematiği. 38
Şekil 35 At kılı fantom görüntüleri a) dijital fotoğraf makinesi ile b) fotoakustik mikroskop ile. 40

Şekil 36 Deneylerde kullanılan Bombay Hint boyaları (b) Bu boyalarla doldurulmuş poliamid tüpler; kırmızı (500 μm), siyah (250 μm), yeşil (127 μm). (Funke vd., 2009; Ninni & Martelli, 2010). 41
Şekil 37 Spektral ölçümler için kullanılan filtrelerin fotoğrafları. 41
Şekil 38 Farklı renklerde doldurulmuş tüplerin sırasıyla 1064 nm, 650 nm ve 590 nm dalgaboylarındaki fotoakustik görüntüleri. 42
Şekil 39 Fantom deneyleri için kurulan düzeneğin görüntüsü. 43
Şekil 40 USAF 1951 test hedefinin grup ve elementlerin konumları. 44
Şekil 41 Fotoakustik mikroskop sistemi ile elde edilen USAF 1951 çözünürlük test hedefi görüntüsü. 45
Şekil 42 Petri kabın içinde MeWo deri kanseri hücreleri. 46
Şekil 43 Melanin optik soğurma spekturmu. 47
Şekil 44 At kılı ve MeWo hücre fantomu. 47
Şekil 45 USAF 1951 test hedefin üzerindeki MeWo hücreleri 48
Şekil 46 R0 = 1 mm için ilaç konsantrasyonu 53
Şekil 47 R0 = 2 mm için ilaç konsantrasyonu 54
Şekil 48 R0 = 3 mm için ilaç konsantrasyonu 54
Şekil 49 R0 = 5 mm için ilaç konsantrasyonu 55
Şekil 50 R0 = 8 mm için ilaç konsantrasyonu 56
Şekil 51 R0 = 15 mm için ilaç konsantrasyonu 56
Şekil 52 MMPsiz ortamda tümör büyümesi ve basınç 58
Şekil 53 Şekil 50 MMPsiz ortamda tümör büyümesi ve basınç 59
Şekil 54 MMP bulunan ortamda tümör büyümesi ve basınç 60
Şekil 55 MMP bulunan ortamda tümör büyümesi ve basınç 61
Şekil 56 MMP ve MMP inhibitörü bir arada: (İnhibitör 10, 12, 14. Günlerde verildi.) 62
Şekil 57 MMP ve MMP inhibitörü bir arada: (İnhibitör 10, 12, 14. Günlerde verildi.) 63
Şekil 58 Parçacığın optik tuzak içerisinde olasılık dağılım fonksiyonu. 67
Şekil 59 Hesaplanmış tuzak sertlik değerleri. 68
Şekil 60 Optik cımbızla birleştirilmiş fotoakustik mikroskop sistemimiz. 69
Şekil 61 Optik cımbızla birleştirilmiş fotoakustik mikroskop sisteminin mikroskop gövdesi üzerindeki son kısmı. 70
Şekil 62 Fotoakustik hedef ile silica parçacıklarının birleştirildiği örnek. 71

TABLO LİSTESİ

Tablo 1 5 *µ*m çapındafarklı baloncuklara (Sovonue, Albunex, Quantison) ait rezonans frekansları ve olması gereken fotoakustik dalganın atım süresi. (Jong vd., 2002).....17

Tablo 2 10 *µ*m çapında farklı baloncuklara (Sovonue, Albunex, Quantison) ait rezonans frekansları ve olması gereken fotoakustik dalganın atım süresi. (Jong vd., 2002).....17

Tablo 3 Son yıllarda yapılan araştırmalarda kullanılan Q-anahtarlı lazerlerin karakteristiği ve bu çalışmalarda kullanılan ultrason probun merkez frekansları. (Krumholz vd., 2011; Zhang vd., 2012; Yeh vd., 2012; Saka vd., 2010; Favazza vd., 2011; Yao vd., 2011; Jo & Yang, 2011; Liu & Buma, 2010; Liao vd., 2010; Yang vd., 2012) 23

Tablo 4 Son yıllarda yapılan araştırmalarda kullanılan fiber lazerlerin karakteristiği ve bu çalışmalarda kullanılan ultrason probun merkez frekansları. (Shao vd., 2012; Shi vd., 2011; Wang vd. L. , 2011) 24

Tablo 5 Son yıllarda yapılan araştırmalarda kullanılan diyot lazerlerin karakteristiği ve bu çalışmalarda kullanılan ultrason probun merkez frekansları. (Allen vd., 2005; Zeng vd., 2012) 25

Tablo 6 USAF 1951 test hedefinin grup ve element numaralarına karşılık gelen çözünürlük değerleri 44

ÖZET

Anjiyogenez var olan mikrovaskülerden yeni kan damarlarının oluşmasıdır. Kanserde, tümör anjiyogeneze bağlı moleküler süreçlerin takibinde invasif olmayan görüntüleme tekniklerinin kullanılmasının büyük önemi vardır. Bunun temel sebepleri anjiyogenezi hedefleyen görüntüleme tekniklerinin erken teşhiste faydalı olma potansiyeline sahip olmasının yanı sıra antianjiyogenez ve proanjiyogenez terapilerin değerlendirilmesinde de rol oynama kapasitesine sahip olmasıdır. Matriks metalloproteinazlar (MMP) tümör anjiyogenezin görüntülenmesinde özel biyolojik hedefler olarak kullanılabilir. Çünkü MMP düzeyi her tür insan kanserinde artmaktadır ve tümör anjiyogenezin oluşumu için de gereklidir.

Buna rağmen, çoğu kanser türü için MMP'lerin hala tümör anjiyogeneze nasıl, ne zaman ve nerede dahil olduğu bilinmemektedir. Bundan dolayı yüksek çözünürlüklü, yüksek hassasiyetli moleküler görüntüleme tekniklerinin ve görüntüleme güdümlü *in silico* tümör modellerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Güdümlü tümör modelleri MMP enzimatik aktivasyonunun fiziksel yeri ve zaman içindeki değişimini belirlemekte paha biçilmez yardımda bulunabilir.

Biz bu projede yüksek çözünürlüklü bir fotoakustik mikroskop ve *in silico* bir tümör modeli geliştirdik. Geliştirdiğimiz mikroskobun çözünürlüğü 2.5 mikrometre oldu. Tümör modelimiz sayesinde de MMP aktivitesinin tümör büyümesini ve tümör içindeki sıvı basıncını nasıl etkilediğini test ettik. Sonuçlar şunu göstermektedir ki kullanılan ilaçların dozu ve zamanlaması bu ilaçların etkinliği üzerinde büyük öneme sahiptir. Bundan dolayı da sistematik çalışmalar için kişiye özel sanal tümör modellerine ihtiyaç büyüktür.

ABSTRACT

Angiogenesis is the process in which new blood vessels are formed from existing microvasculature. In cancer, non-invasive imaging techniques that monitor molecular processes associated with the tumor angiogenesis could have a central role in the evaluation of novel antiangiogenic and proangiogenic therapies as well as early detection of the disease. Matrix metalloproteinases (MMP) can serve as specific biological targets for imaging of angiogenesis since expression of MMPs is required for angiogenesis and has been found to be upregulated in every type of human cancer and correlates with stage, invasive, metastatic properties and poor prognosis.

However, for most cancers it is still unknown when, where and how MMPs are involved in the tumor angiogenesis. Therefore, development of high-resolution, high sensitivity imaging techniques in parallel with the development of imaging guided *in silico* tumor models could prove invaluable for assessing the physical location and the time frame of MMP enzymatic acitivity.

In this project, we developed a high resolution photoacoustic microscopy system with a spatial resolution of 2,5 microns. In addition, an *in silico* tumour model was developed. Our tumour simulator was capable of modeling the efftects of MMP activity on the tumour growth and the interstitial fluid pressure. Our results show that since the timing and the dose of cancer drugs are crucial to the success of the threapy, patient specific tumour models are higly needed.

1. GİRİŞ

Fotoakustik mikroskop araştırmaları anjiyogenez ve melanoma gibi deri altı kötü huylu tümör görüntülemesinde, diyabet, hipertansiyon gibi metabolik hastalıkların etkilerinin ortaya çıkarılmasında, tedavinin değerlendirilmesinde, yara iyileşmesinin takibinde, beyin görüntülemesinde ve haritalanmasında görüntülüme yöntemi olarak umut verici sonuçlar vadetmektedir. (Hu & Wang, 2010) Kötü huylu bir tümörde, var olan damarlardan yeni kan damarlarının oluşması ve anjiyogenez gibi sonuçların, mikro dolaşım görüntülemesinin fotoakustik görüntüleme aracı ile yapılmasının önemini arttırmıştır. (Geng vd., 2005)Klinik olarak, PAM bir teşhis veya tanı ve kısmen de olsa hastalıkların önlenmesi için bir araç olarak kullanılabilmektedir. Fotoakustik mikroskopta kullanılan lazerin, darbe suresi, enerjisi, atımların tekrar sıklığı gibi parametreleri fotoakustik sinyalin genliğini, kalitesini, veri edinme hızını ve dolaylı olarak uzaysal çözünürlüğünü etkilemektedir. Literatürde fotoakustik mikroskop araştırmalarında kullanılan lazerler sıklıkla Q-anahtarlı, düşük güçlü diyot lazerler ve son zamanlarda fiber lazerlerdir. (Krumholz vd., 2011; Zhang vd., 2012; Favazza vd., 2011; Shi vd., 2011) Fotoakustik görüntülemede kullanılan Q-anahtarlı lazer, düşük güçlü diot lazer veya fiber lazer gibi mevcut ticari lazerler ayarlanabilir özelliklere sahip değillerdir. Bu tür hazır lazerler, mevcut mikroskobik sistemlerde bazı sistematik sınırlamaları da beraberinde getirmektedirler. Data toplama süresi uzundur, dalga boyu ve enerjisi ayarlanabilir değildir. Mikrodolaşımsal ve hücresel görüntülemeler farklı özelliklerde lazerler gerektirmektedirler. Lazer parametreleri birbirinden bağımsız olarak ayarlanamamaktadır, fakat mikrodolaşım sistemi, hücresel görüntüleme, spektroskopik ölçümler farklı parametreler gerektirmektedir. Bu tür kısıtlamaları ortadan kaldırmak için, Bilkent Üniversitesi'nin Ultrafast Optics and Laser Group bölümü ile ortak olarak özellikle fotoakustik görüntülemede kullanılacak bir lazer geliştirilmiştir. Fotoakustik mikroskop için özel olarak geliştirilen bu özel lazer nanosaniyeler mertebesinde atımlar üreten, 600 nm ile 1300 nm arasındaki dalga boylarını yayabilen lazer üretilmiştir. Sistem, Yd katkılı salıngaç, iki yükselteç, akusto-optik değiştirimci ve sürekli dalga boyu üretimi icin fotonik-kristal fiberden oluşmaktadır. Dalgalar dizisi üzerindeki kontrol, akusto-optik degiştirimciye bağlanan programlanabilir mantık dizileri (FPGA) vasıtasıyla sağlanmaktadır. Tüm sistem fiber entegre olup mekanik etiklere karşı stabildir. Lazer önemli parametrelerinin, atım süresi (1-3 sn), enerji (10 microjoule'e kadar yükseltilebilir), atım sıklığı (50 kHz- 3 MHz) ayarlanabilir olması sebebiyle eşsizdir. Ultra geniş spektrum sayesinde farklı problar uyarlanabilir, yüksek atım sıklığı sayesinde gerçek zamanlı görüntüleme yapılabilir, FPGA devresi sayesinde atım enerjisi ayarlanabilir.

Anjiyogenez var olan mikrovasküllerden yeni kan damarlarının oluşmasıdır. Kanserde tümör

anjiyogenez bağlı moleküller süreçlerin takibinde invazif olmayan görüntüleme tekniklerinin kullanılmasının büyük önemi vardır. Anjiyogenez hedefleyen görüntüleme tekniklerinin erken teşhiste faydalı olma potansiyeline sahip olmasının yanı sıra antianjiogenez ve proanjiyogenez terapilerinin değerlendirilmesinde de rol oynama kapasitesine sahip olmasıdır. Matriks metalloproteinazlar (MMP) tümör anjiyogenezin görüntülenmesinde özel biyolojik hedefler olarak kullanılabilir. Çünkü MMP düzeyi her tür insan kanserinde artmaktadır ve tümör anjiyogenezin oluşumu için de gereklidir. Buna rağmen, çoğu kanser türü için MMP'lerin hala tümör anjiyogeneze nasıl, ne zaman ve nerede dahil olduğu bilinmemektedir. (Weinberg, 2007; Kessenbrock vd., 2010) Bundan dolayı _yüksek çözünürlüklü, yüksek hassasiyetli moleküler görüntüleme tekniklerinin ve görüntüleme güdümlü *in silico* tümör modellerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Güdümlü tümör modelleri MMP enzimatik aktivasyonunun fiziksel yeri ve zaman içindeki değişimini belirlemekte paha biçilmez yardımda bulunabilir. Geliştirdiğimiz yüksek çözünürlüklü, yüksek hassasiyetli fotoakustik görüntüleme sistemi MMP'lerin nasıl ne zaman ve nerede dahil olduğunu anlamakta yardımcı olacaktır.

2. YÖNTEMLER

2.1 Teorik Çalışmalar

2.1.1 Genel Olarak Fotoakustik Dalga Denkleminin Elde Edilmesi

Fotoakustik dalga denklemi ısıl genleşme ve lineer sürtünmesiz kuvvet denklemleri ile oluşturulabilir. Bu iki denklem aşağıdaki gibi tanımlanmaktadır. (Wang, 2007)

$$\rho\frac{\partial^2}{\partial t^2}\xi(r,t) = -p\nabla(r,t). \quad (1)$$

$$\nabla.\xi(r,t) = -\kappa p(\mathbf{r},t) + \beta T(\mathbf{r},t). \quad (2)$$

Birinci denklemin diverjansını alınıp, ikinci denklemde yerine konulduktan sonra ve

$$v_s = \frac{1}{\sqrt{\rho\kappa}} \qquad (3)$$

tanımlaması yapıldıktan sonra, genel fotoakustik dalga denklemi aşağıdaki gibi elde edilmiş olur.

$$\left(\nabla^2 - \frac{1}{v_s^2}\frac{\partial^2}{\partial t^2}\right)p(\mathbf{r},t) = -\frac{\beta}{\kappa v_s^2}\frac{\partial^2}{\partial t^2}T(\mathbf{r},t). \quad (4)$$

Dördüncü denklemin sol tarafı, fizikteki en genel dalga denkleminin ilerlemesini temsil ederken, sağ tarafı da fotoakustik dalgayı oluşturan kaynağı temsil etmektedir. Bu denklemlerde β hacim genişleme ısıl katsayısını, v_s ses hızını, r pozisyonu, t zamanı, T sıcaklık artışını, κ eşısılsıkıştırabilirlik katsayısını, ρ kütle yoğunluğunu temsil etmektedir. Fotoakustik görüntülemede kullanılan lazerin darbe süresi yeterince küçük olduğunda, ısıl ve gerginlik hapsi gerçekleştiğinde ısıl difüzyon oluşumu ihmal edilebilir (Kruger vd, 1995).

Isıl durulma zamanı ve gerginlik durulma zamanı sırasıyla aşağıdaki gibi ifade edilmektedir.

$$\tau_{th} = \frac{d_c^2}{\alpha_{th}} \text{ and } \tau_s = \frac{d_c}{v_s}. \qquad (5)$$

Denklemde d_c ısıtılan bölgenin karakteristik boyutunu,α_{th} ısıl yayılım sabitini (m/sn^2) ,v_s ses hızını temsil etmektedir. Lazer darbe uzunluğunun ısıl durulma zamanından çok küçük olması ısıl hapsinin, aynı şekilde lazerin darbe uzunluğunun gerginlik durulma zamanından küçük olması da gerginlik hapsinin meydana geleceğini ifade etmektedir.

Bu koşullar sağlandığında, sıcaklık değişimi ısıtma fonksiyonu cinsinden yazılabilir.

$$\rho C v\frac{\partial T(r,t)}{\partial t} = H(r,t). \qquad (6)$$

6. denklem 4. denkleme konulduğunda aşağıdaki denklem elde edilmiş olur.

$$\left(\nabla^2 - \frac{1}{v_s^2}\frac{\partial^2}{\partial t^2}\right)p(\mathbf{r},t) = -\frac{\beta}{C_p}\frac{\partial H(\mathbf{r},t)}{\partial t} \quad (7)$$

Bu denklemdeki her bir terimi tanımlayacak olursak; H hacim ve zaman başına düşen ışığın soğrulmasıyla oluşan ısı miktarını, Cp ve Cv sabit basınçtaki ve hacimdeki özgül ısıyı temsil etmektedir. (Wang vd. L. , 2004)

Lazer gönderiminden sonraki ilk basınç artışı için aşağıda belirtilen kesirsel hacim genişlemesi denkleminden faydalanılabilir.

$$\frac{dV}{V} = -\kappa p + \beta T \text{ . (8)}$$

Isıl ve gerginlik hapsi koşulları sağlandığında hacim artışı ihmal edilebilir ve lazer darbesinin oluşturduğu ilk basınç artışı aşağıdaki gibi yazılabilir.

$$p_0(r) = \frac{\beta T(r)}{\kappa} . \text{ (9)}$$

Denklemde eşısılsıkıştırabilirlik katsayısı κ yerine aşağıdaki ifade yazılır ve hapis

$$\kappa = \frac{Cp}{pv_s^2 Cv} \text{ (10)}$$

koşullarının sağlanması neticesinde sıcaklık artışının optik soğurma cinsinden karşılığı

$$T = \frac{Ae}{pCv} . \text{ (11)}$$

9. denklemde yerine konulursa ilk basınç artışı aşağıdaki gibi yazılabilir.

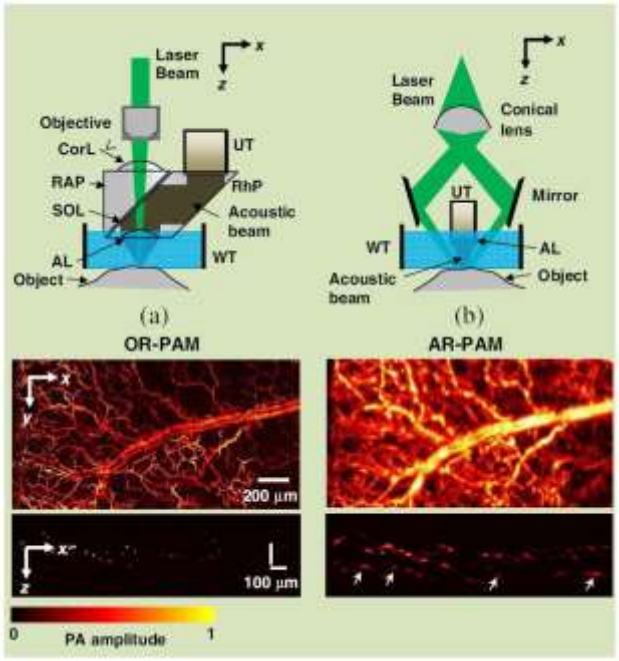
$$p_{0=} \Gamma \mu_a F. \text{ (12)}$$

Bu denklemde μ_aışık soğrulma sabitini, Γ boyutsuz Grüneisen paremetresini ve F optik fluence'i temsil etmektedir.

$$\Gamma = \frac{\beta}{\kappa pCv}. \text{ (13)}$$

2.1.2. Fotoakustik Mikroskop Sisteminde Çözünürlük

Fotoakustik görüntülemede, görüntülenecek hedefin seçimine göre, optik çözünürlüklü (OR) ve akustik çözünürlüklü (AR) olmak üzere iki farklı mikroskobik sistem kurulabilmektedir (Şekil). Bu iki sistemin uygulama alanları birbirlerinden farklıdır ve kendilerine ait özellikleri vardır. Şekilde gösterildiği gibi optik çözünürlüklü fotoakustik mikroskop sisteminde (OR-PAM) optik odaklanma akustik odaklanmaya kıyasla daha sıkıdır. Diğer yandan akustik çözünürlüklü fotoakustik mikroskop sisteminde (AR-PAM) ise akustik odaklanma optik odaklanmaya kıyasla daha sıkıdır. Doğal olarak bu iki farklı sistem için tahmini çözünürlük hesapları da farklı yapılmaktadır.



Şekil 1 Optik çözünürlüklü ve akustik çözünürlüklü fotoakustik mikroskop sistemlerinin şematiği [L.V. Wang et al. Progress In Electromagnetics Research, Vol. 147, 1-22, 2014].

2.1.2.1. Uzaysal Çözünürlük

Uzaysal çözünürlük, birbirlerinden ayırt edilebilen iki farklı noktanın aralarındaki minimum uzaklık olarak tanımlanır ve özellikle mikroskobik görüntüleme sistemleri için çok önemli bir kavramdır. Uzaysal çözünürlük yanal ve dikey çözünürlük olmak üzere ikiye ayrılır. Fotoakustik mikroskop sistemlerinde, ışık objektifler ile odaklandığı ve sinyal ölçme işlemi ultrason alıcılar ile yapıldığı için uzaysal çözünürlüğün belirlenmesi kurulan sistemin OR-PAM ve AR-PAM olmasına göre değişiklik göstermektedir.

2.1.2.1.1. Yanal Çözünürlük

Yanal çözünürlük, ultrason probun ölçüm yönüne dik olarak konumlanan yan yana iki farklı noktanın birbirlerinden ayırt edilebilme yetisidir. OR-PAM için yanal çözünürlük aşağıdaki bağıntı ile hesaplanmaktadır.

$$R_{L,OR} = 0.51\frac{\lambda_0}{NA_O} \qquad (14)$$

Burada λ_0 optik dalgaboyunu, NA_O ise optik objektifin nümerik açıklığını temsil etmektedir. Dikkat edilirse, OR-PAM için yüksek kalitede yanal çözünürlük elde etmek için nümerik açıklığı büyük olan objektifler kullanılmalıdır. Ayrıca, düşük dalga boylu ışıklar kullanıldığında da daha

iyi yanal çözünürlük değerleri elde edilebilmektedir fakat unutulmamalıdır ki dalga boyu azaldıkça derinlik çözünürlüğü de azalmaktadır.

Diğer yandan AR-PAM için yanal çözünürlük hesabı ise aşağıdaki iki bağıntı ile hesaplanmaktadır [Wang and Gao, *Annu. Rev. Biomed. Eng.,* 16:155–85, 2014] ve [Wang and Hu, *Science*, 335, 1458-1462, 2012]

$$R_{L,AR} = 0.71\lambda_0 \frac{l}{D/2}$$
$$R_{L,AR} = 0.71 \frac{v_s}{NA \cdot f_0} \quad (15)$$

Bu bağıntılarda λ_0 akustik dalgaboyunu, D ultrason probunun açıklık çapını, l ultrason probunun odak derinliğini, v_s sesin ortam içindeki hızını, f_0 ise fotoakustik merkez frekansı temsil etmektedir. Dikkat edilirse, AR-PAM için yanal çözünürlük değeri ultrason probun açıklık yarıçapı ile doğru, odak derinliği ile ters orantılıdır. Ayrıca fotoakustik merkez frekansı ile de ters orantılıdır.

2.1.2.1.2. Dikey Çözünürlük

Dikey çözünürlük, ultrason probun ölçüm yönüne paralel olarak konumlanan altalta iki farklı noktanın birbirlerinden ayırt edilebilme yetisidir. OR-PAM ve AR-PAM için dikey çözünürlük aşağıdaki benzer bağıntılarla hesaplanır [Wang and Hu, *Science*, 335, 1458-1462, 2012].

$$R_A = 0.88 \frac{v_s}{B}$$
$$R_A = 0.88 \frac{v_s}{\Delta f} \quad (16)$$

Burada B ultrason probunun bantgenişliğini, Δf ise fotoakustik bantgenişliğini temsil etmektedir ve bu iki değer büyüdükçe daha iyi dikey çözünürlükler elde edilebilmektedir.

2.1.2.2. Derinlik Çözünürlüğü

Derinlik çözünürlüğü, görüntülenen hedefin mümkün olan en derin yerinde konumlanan bir nesnenin ölçülebilme yetisidir. Derinlik çözünürlüğü doğal olarak uzaysal çözünürlüğe etki eden bir kavramdır. Derindeki bir nesnenin görüntülenebilmesi için, ışığın derinlere ulaşması sağlanmalıdır. Işığı hedefin derin bölgesine gönderebilmek için yüksek dalga boylu ışık kullanılmalıdır ve bu da uzaysal çözünürlüğün düşmesine sebep olmaktadır. Hem yüksek

derinlik çözünürlüğüne ve hem de uzaysal çözünürlüğe aynı anda ulaşabilmek için genellikle tomografik ölçümlere başvurulmaktadır.

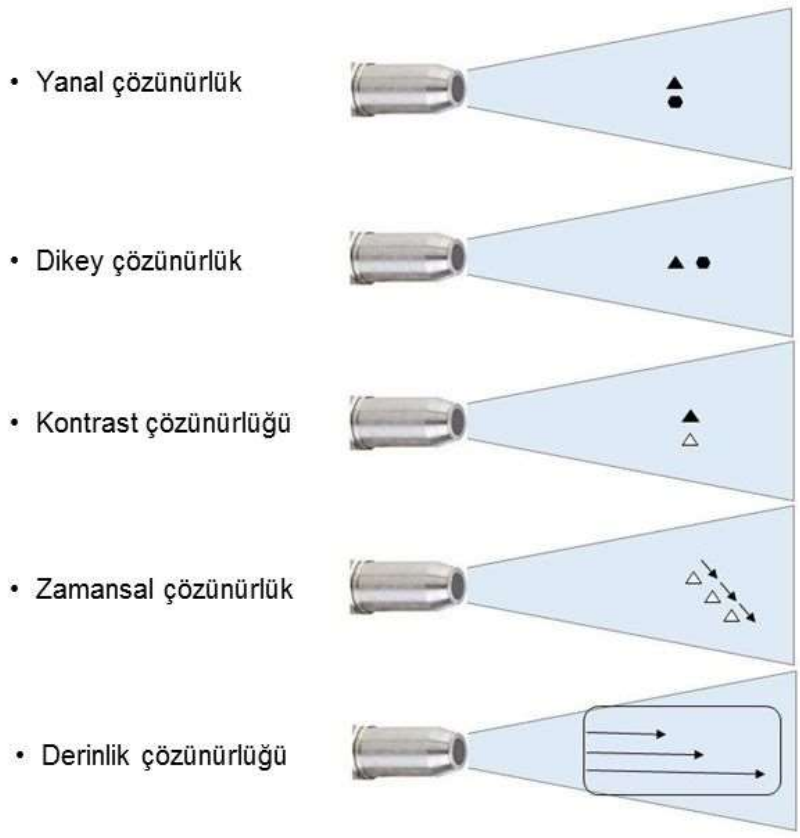
2.1.2.3. Kontrast Çözünürlüğü

Kontrast çözünürlük, görüntüdeki gri skaladaki küçük değişiklikleri algılayabilme ve bunları gürültüden ayırt edebilme yetisidir. Fotoakustik görüntülemede kontrastı belirleyen olgu optik soğurmadır. Doğal olarak, optik soğurmanın yüksek olduğu durumlarda, dolayısıyla fotoakustik sinyalin genliğinin gürültüye oranla yüksek olduğu durumlarda kontrast çözünürlük de yüksek olmaktadır.

2.1.2.4. Zamansal Çözünürlük

Zamansal çözünürlük, zaman içinde hareket eden bir nesnenin ölçülebilme yetisidir. Fotoakustik görüntülemede zamansal çözünürlük, genellikle fotoakustik Doppler flow metre uygulamalarında başvurulan bir büyüklüktür.

Aşağıdaki şekil yukarıda bahsedilen çözünürlük kavramlarını gösteren şematiklerdir.



Şekil 2 Fotoakustik görüntülemede kullanılan çözünürlük kavramlarının şematikleri.

2.1.3 Yeni Bir Yaklaşım ile Fotoakustik Dalga Denkleminin Analitik Çözümü

Fotoakustik dalga denklemi analitik olarak çözebilmek için öncelikle kaynak terimini belirlemek gerekmektedir. Fotoakustik görüntülemede bu kaynak terimi matematikte birçok kavramda karşımıza çıkan Dirac delta fonksiyonuyla tanımlanabilir. Yani kaynak noktasal kabul edilebilir. Bu tanımlama sonucunda denklemi çözmek için, ışığı göndermiş olduğumuz örneğin geometrik yapısını da düşünerek, Green fonksiyon hesaplamalarını kullanmış ve fotoakustik basıncı hesaplayabilmek için bir çözüm elde etmiştir. Literatürde lazer demeti Dirac delta fonksiyonu yerine Gaussian radyal dağılım olarak da benzetmeler yapılmış ve çözümler öne sürülmüştür. Literatürden farklı olarak kaynak terimi hem zamansal hem de uzaysal olarak Gaussian dağılım şeklinde olduğunu varsayılıp, lazer parametreleriyle ilişkilendirilmiştir. Böylece lazer parametrelerinin fotoakustik basınç üzerindeki etkisi araştırılmıştır. (Kneubühl, 1978; Young, 1982; G. J. Diebold, 1991; V. Kozhushko, 2004; Westervelt, 1988; I. G. Calasso, 2001; M. A. Anastasio, 2007)

Gaussian fonksiyonu şeklinde tanımlanmış olan lazer demetinin küresel bir örneğe gönderildiği varsayılarak; kaynak terimi ilk olarak aşağıdaki gibi zamansal olarak yazabilir.

$$H(t) = \frac{e^{\frac{-t^2}{2\tau_p^2}}}{\sqrt{2\pi\tau_p^2}}. \quad (14)$$

Bu denklemde τ_p laserin darbe sürüsini temsil etmektedir. Bu kaynak terimini kullanarak yeni ve kapsamlı olan çözüm öne sürülmüştür. Bu tür problemler literatürde “far field” yaklaşımı ile çözülürken, bu yaklaşımlara başvurmadan yeni bir analitik çözümü sunulmuştur. Bu şekilde herhangi bir yaklaşıma gerek duymadan analitik çözüm yapılması literatürde bir ilktir. Analitik çözüm kompleks integral tekniğine dayanan Fourier transform içerikli adımlardan oluşmaktadır. Bu adımlardan biri Gaussian raydal soğurma profilini aşağıdaki gibi ifade etmektir.

$$p_{0(r)=}\ p_0 \exp\left(-\frac{\mathrm{r}^2}{2\sigma^2}\right)\theta(\mathrm{r})\theta(-\mathrm{r}+\mathrm{R}). \quad (15)$$

Analitik çözüm sonrasında fotoakustik dalga denkleminin çözümünü değişik ve özel bir yolla elde edilmiştir. (Erkol vd., 2014)

$$p(r,t) = \frac{p_0 \sigma^2}{4r\left(\sigma^2+\tau^2 v_s^2\right)^{\frac{3}{2}}} \exp\left[-\frac{2R(r-v_s t)+2(r-v_s t)^2+R^2}{2\tau^2 v_s^2} - \frac{R^2}{2\sigma^2}\right] x \Bigg(\sqrt{2\pi}\,\sigma\,(r -$$

$$v_s t) \Bigg\{ \operatorname{erf}\left[\frac{\sigma^2(-r+R+v_s t)+R\tau^2 v_s^2}{\sqrt{2}\tau\sigma v_s \sqrt{\sigma^2+\tau^2 v_s^2}}\right] \exp\left[\frac{(r+R-v_s t)^2}{2\tau^2 v_s^2} + \frac{\sigma^2(r-v_s t)^2}{2\tau^2 v_s^2\left(\sigma^2+\tau^2 v_s^2\right)} + \frac{R^2}{2\sigma^2}\right] +$$

$$\operatorname{erf}\left[\frac{\sigma^2(r+R-v_s t)+R\tau^2 v_s^2}{\sqrt{2}\tau\sigma v_s \sqrt{\sigma^2+\tau^2 v_s^2}}\right] \exp\left\{\frac{\frac{\left|\sigma^2(r+R-v_s t)+R\tau^2 v_s^2\right|^2}{\sigma^2(\sigma^2+\tau^2 v_s^2)}+(r-v_s t)^2}{2\tau^2 v_s^2}\right\}\Bigg\} -$$

$$2\tau v_s \sqrt{\sigma^2+\tau^2 v_s^2} \exp\left[\frac{(r-v_s t)^2}{2\tau^2 v_s^2}\right]\left\{\exp\left[\frac{2R(r-v_s t)}{\tau^2 v_s^2}\right]-1\right\}\Bigg) \theta(r-|R-v_s t|)\theta(-r+R+v_s t). \quad (16)$$

Analitik çözüm sonrasında elde edilen denklemdeki parametrelerin nümerik değerleri kullanılarak farklı radyal uzaklıklar için normalize edilmiş fotoakustik basınç dalgası grafikleri elde edilmiş ve yorumlanmıştır. Bu grafikler literatürdeki sonuçlarla mükemmel bir uyum sağlamaktadır. Zamana bağlı Gaussian dağılımını kullanıp çözüm sunduktan sonra, daha realistik olan fotoakustik basıncı aşağıdaki gibi t=0 anında hem zamansal hem de uzaysal olarak tanımlanıp, zamana bağlı fotoakustik basıncı elde edilmiştir.

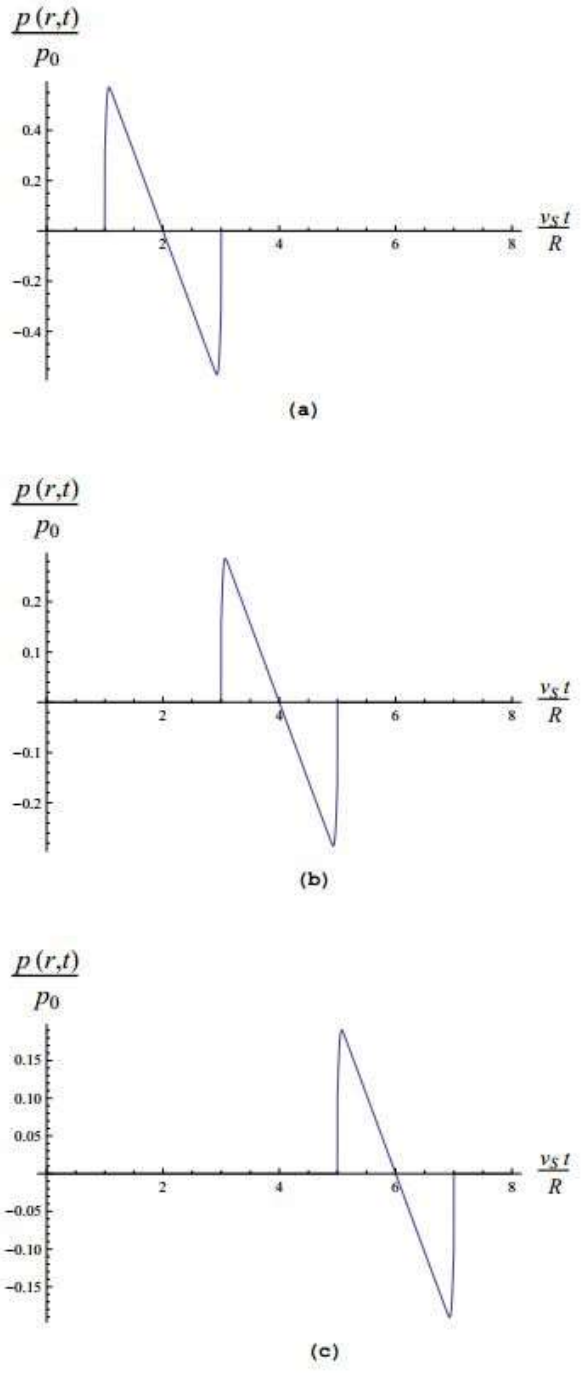
Bu çözüm sayesinde fotoakustik sinyal ile fotoakustik mikroskopta kullanılan lazerin darbe süresi, enerjisi, atımlıların tekrar sıklığı gibi parametreleri ilişkilendirilmiştir. Ayrıca fotoakustik basıncı küresel örnekle ilişkilendirmek için aşağıdaki denklem kullanılmıştır.

$$p_{0=}\ \Gamma \mu_a F.$$

Bu denklemde μ_a örneğin optik soğurma katsayısını, F optik flüansı ve Γ boyutsuz Grüneisen parametresini temsil etmektedir.

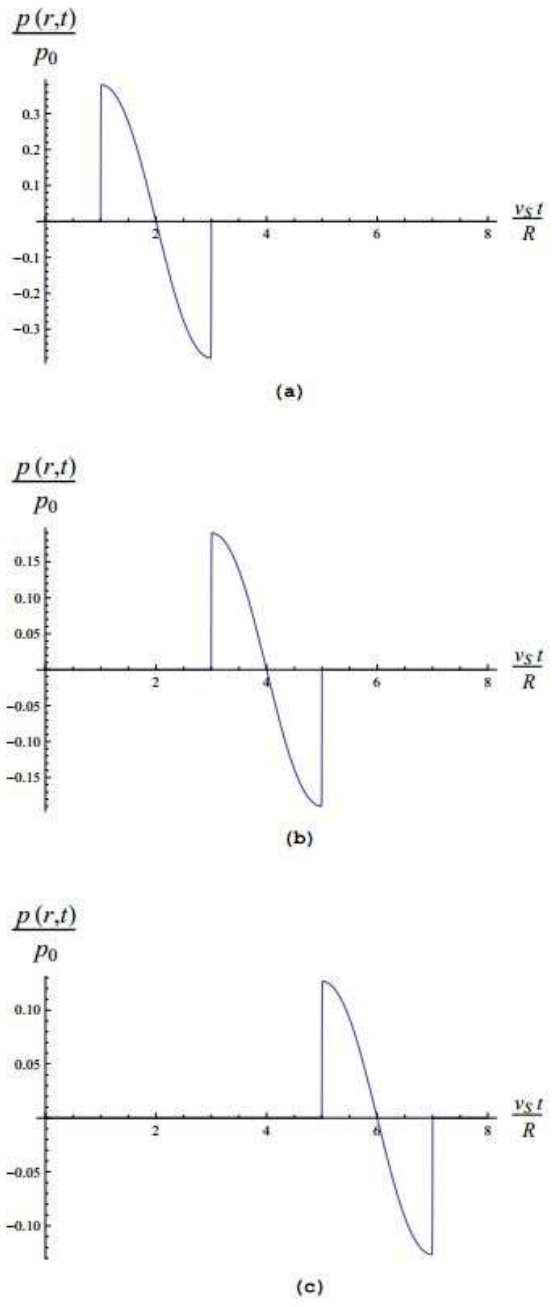
Biyomedikal uygulamalar için, doku içindeki ses dalgasının hızı, lazerin atım süresi ve optik soğurucunun yarıçapı, sırasıyla, 1480 m/s, τ = 5 ns, and R = 75 μm olarak alınmıştır. Şekil 1. normaliz edilmiş fotoakustik dalganın $p(r,t)/p_0$ normalize zamana Vst/R göre değişimini lazerin farklı demet genişlikleri için, σ = 50 and 75 μm, göstermektedir.

Şekil 1'de normalize edilmiş fotoakustik dalganın $p(r,t)/p_0$normalize zamana Vst/R göre değişimi farklı r/R oranları için gösterilmiştir. Bu grafikler için τ ve R oranı 10 alınmıştır.

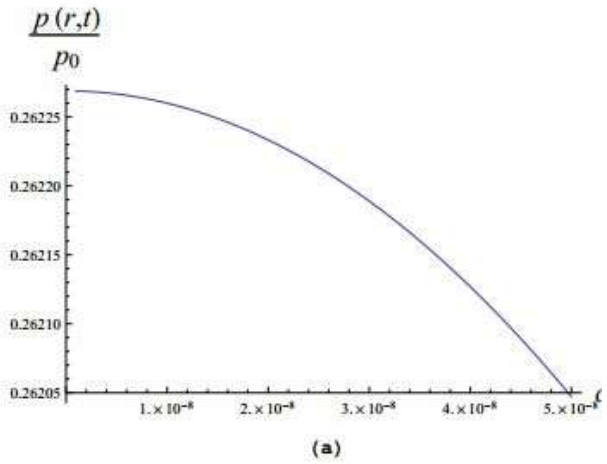


Şekil 3 Normalize edilmiş fotoakustik dalganın $p(r,t)/p_0$ normalize zamana Vst/R göre değişimi a) r=2R b) r=4R c)r=6R iken ve $\frac{\tau}{R} = 10$ iken gösterimi.

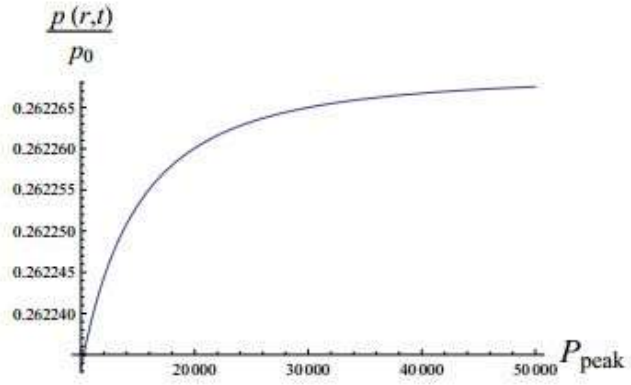
Şekil 2'de normalize edilmiş fotoakustik dalganın $p(r,t)/p_0$ normalize zamana Vst/R göre değişimi farklı r/R oranları için gösterilmiştir. Bu grafikler için τ ve R oranı 1 alınmıştır.



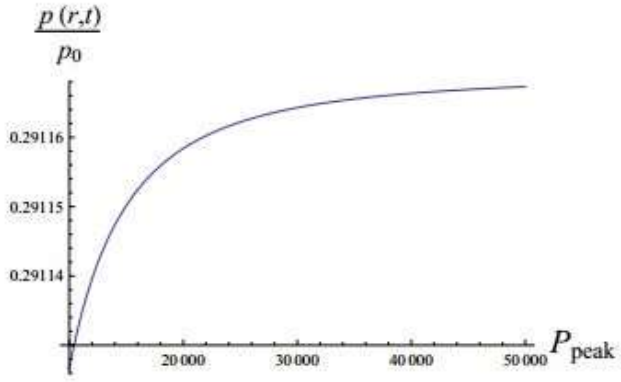
Şekil 4 Normalize edilmiş fotoakustik dalganın $p(r,t)/p_0$ normalize zamana Vst/R göre değişimi a) r=2R b) r=4R c) r=6R iken ve $\frac{\tau}{R} = 10$ iken gösterimi.


p (r,t)
p0
0.26225
0.26220
0.26215
0.26210
0.26205
1.×10⁻⁸
2.×10⁻⁸
3.×10⁻⁸
4.×10⁻⁸
5.×10⁻⁸
(a)
p (r,t)
p0
0.29115
0.29110
0.29105
0.29100
0.29095
0.29090
1.×10⁻⁸
2.×10⁻⁸
3.×10⁻⁸
4.×10⁻⁸
5.×10⁻⁸
(b)
p (r,t)
p0
0.292
0.291
0.290
0.289
0.288
0.287
0.286
0.285
1.×10⁻⁸
2.×10⁻⁸
3.×10⁻⁸
4.×10⁻⁸
5.×10⁻⁸
(c)

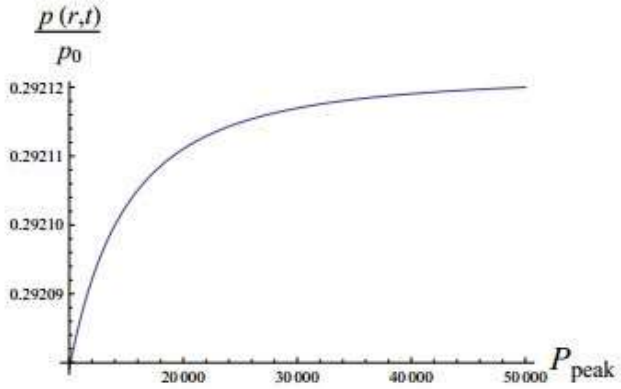
Şekil 5


p (r,t)
p0
0.262265
0.262260
0.262255
0.262250
0.262245
0.262240
20000
30000
40000
50000
P peak

(a)

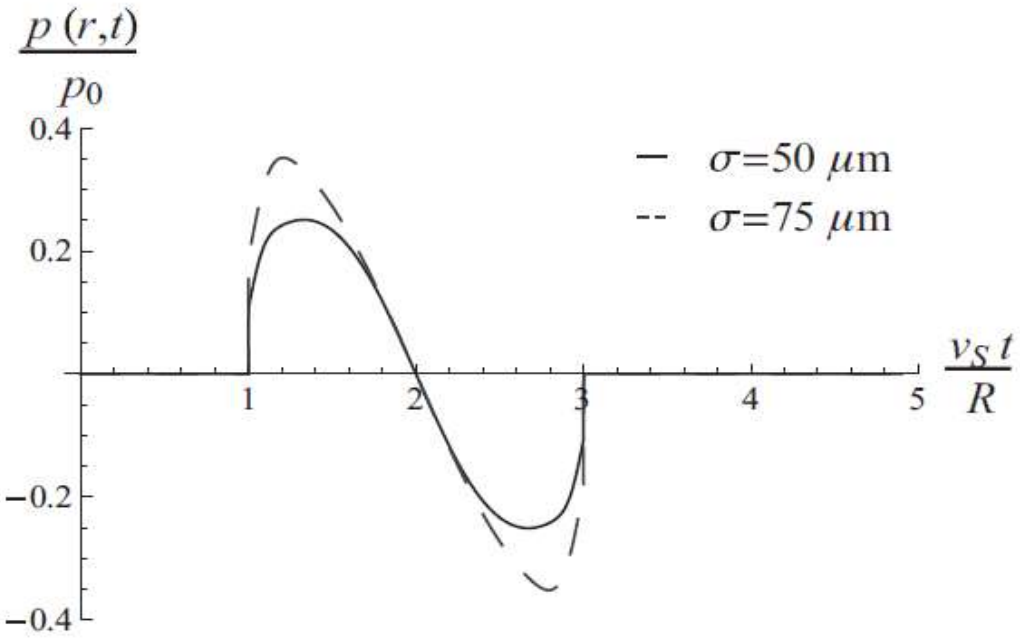

p (r,t)
p0
0.29116
0.29115
0.29114
20000
30000
40000
50000
P peak

(b)


p (r,t)
p0
0.29212
0.29211
0.29210
0.29209
20000
30000
40000
50000
P peak

(c)

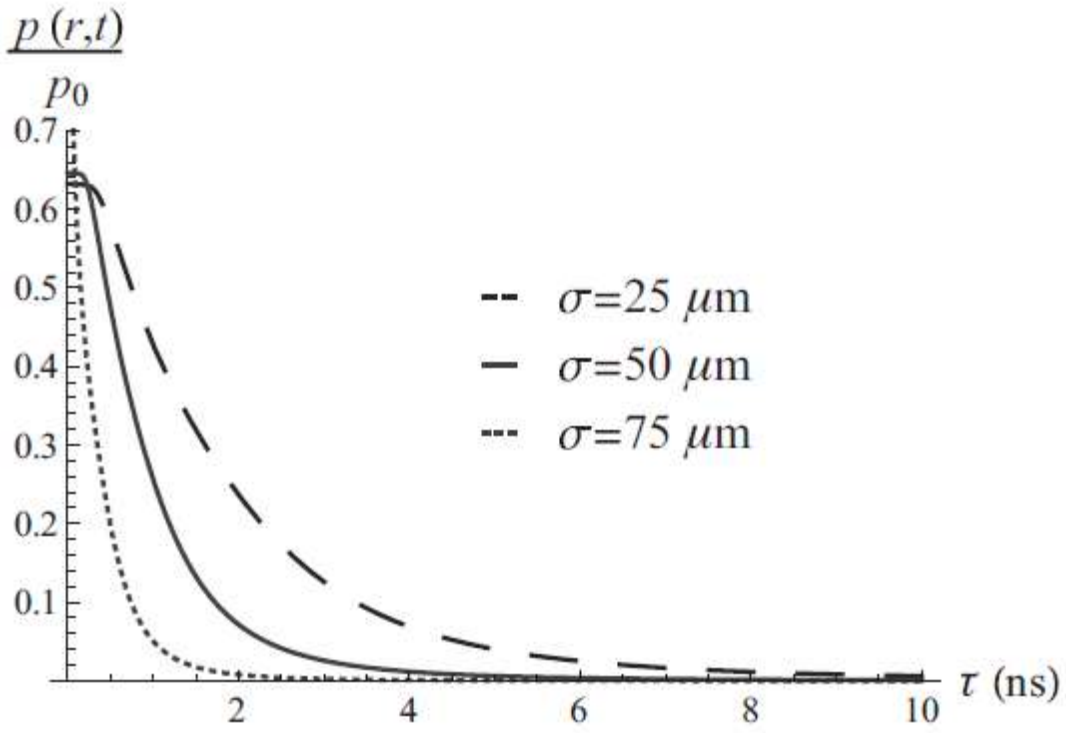
Şekil 6



Şekil 7 Normalize edilmiş fotoakustik dalganın $p(r,t)/p_0$ normalize zamana Vst/R göre r=2R, atım süresi τ= 5 ns ve R = 75 μm olduğunda demet genişliği (a) σ = 50 μm and (b) σ = 75 μm iken değişimi.

Şekil 5. 'de görüldüğü üzere lazerin demet genişliğinin artması, basıncın büyüklüğünü arttırmaktadır. Fakat, demet genişliğinin artması çözünürlüğün azalmasına sebep olmaktadır.

Şekil 6. Normalize edilmiş fotoakustik dalganın $p(r,t)/p_0$ lazerin atım süresine göre değişimini farklı demet genişlikleri için, σ= 25, 50, and 75 μm göstermektedir.



Şekil 8 Normalize edilmiş fotoakustik dalganın $p(r,t)/p_0$ lazerin atım süresine göre farklı demet genişlikleri için, σ = 25, 50, and 75 μm, r = 100 μm olduğunda değişimi.

Şekil 6.'de, lazerin demet genişliği azaldıkça, fotoakustik sinyal, radyal profilin delta fonksiyonuna yaklaşması sebebiyle biraz azalmaktadır. Bu sebeple lazer parametrelerine bağımlılık azalmaktadır. Çok geniş atım süreleri için ısıl ve gerginlik hapsi ihlal edilmektedir, bu sebeple sinyal büyüklüğü azalmaktadır.

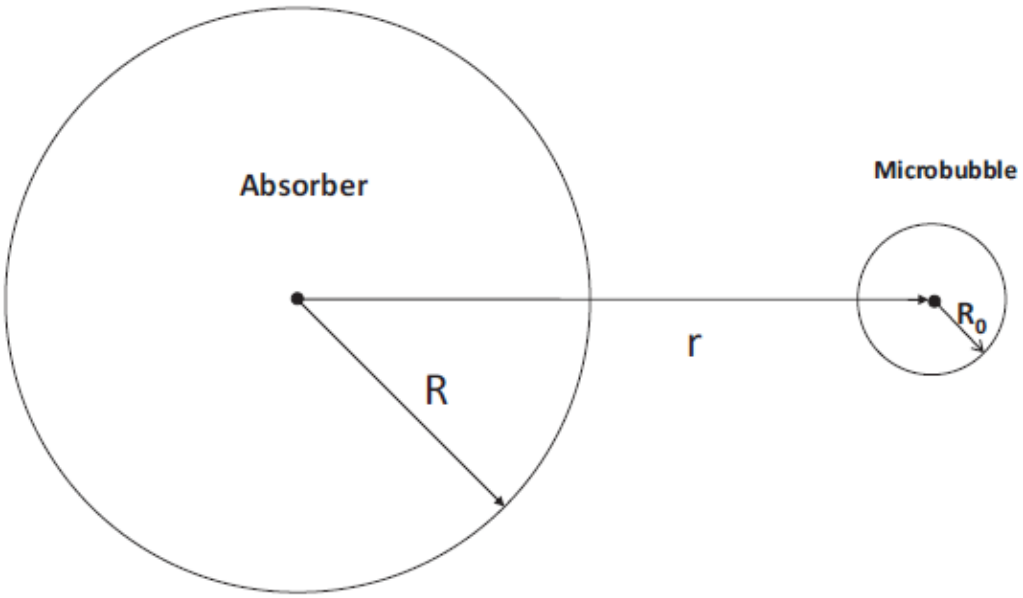
Bu çalışma sayesinde fotoakustik sinyal ile kullanılan lazerin darbe süresi, enerjisi, atımlıları tekrar sıklığı gibi parametreleri, kaynak teriminin yeni tanımlaması sayesinde ilişkilendirilmiştir.

2.1.4. Mikrobaloncuk üzerine etki eden Fotoakustik Radyasyon Kuvveti

Akustik kuvvetin mikrobalon üzerindeki etkisi lazer paremetrelerini de göz önünde bulundurularak hazırlanan, ayrıca ilaç iletiminde ve görüntüleme için kullanılan kontrast uygulamalarında da yaralı olabilecek çalışmamız makale olarak yayınlanmıştır.

Şekil 7.'te R yarıçaplı soğurucu ile merkezinden r uzaklıktaki, R_0 yarıçaplı mikrobalon görülmektedir.

.



Şekil 9 R yarıçaplı soğurucu ile merkezinden r uzaklıktaki, R_0 yarıçaplı mikrobalon.

Mikro balon üzerine etki eden akustik radyasyon kuvvet küresel mikro balonun hacimsel dalgalanımı ile akustik basıncın gradyanının çarpımı olarak ifade edilebilir. İkincil akustik radyasyon kuvvet birincil kuvvetin yanında ihmal edilebilir boyutlardadır. (Dayton vd., 1997; Leighton, 1994)

$$F_{birincil} = \langle V \nabla p(r,t) \rangle \qquad (17)$$

Resonans frekansı ω_0 olan bir mikro balon üzerindeki kuvvet aşağıdaki denklemdeki gibi ifade edilebilir.

$$F = \frac{2\pi P_A^2 \tau R_0 \nu_{PRF}}{\delta_{tot} \rho \nu_s \omega 0} \qquad (18)$$

Denklemde P_A basınç büyüklüğünü, τ laser darbe süresini, R_0 mikro boyutlarındaki baloncuğun yarıçapını, ν_{PRF} lazerin tekrarlama sıklığı frekansını, δ_{tot} toplam sönüm sabitini, ρ ortam yoğunluğunu, ve ν sesin hızını ve ω_0 baloncuğun resonans frekansını temsil etmektedir. Dayton'ın denklemi ile analitik olarak çözülen fotoakustik denklem birleştirilmiştir. Denklemde basınç büyüklüğü yerine fotoakustik dalga denkleminden elde edilen özel çözüm kullanılmıştır.

Fotoakustik soğurucudan dolayı oluşan akustik dalga mikron boyutlarındaki baloncuğa kuvvet uygulamaktadır. Denklem 18'in geçerli olabilmesi için baloncuğun rezonans frekansı ve akustik dalganın merkez frekansının yaklaşık olarak aynı olması gerekir. Literatürde yaygın olarak kullanılan farklı boyuttaki üç çeşit mikro boluncuğun özellikleri aşağıdaki tabloda özetlenmiştir.

Tablo 1.'de 5 μm çapında farklı baloncuklara ait rezonans frekansları ve olması gereken fotoakustik dalganın atım süresi gösterilmektedir. Tablo 2.'de 10 μm çapında baloncuklar için aynı parametreler gösterilmektedir.

Tablo 1 5 μm çapındafarklı baloncuklara (Sovonue, Albunex, Quantison) ait rezonans frekansları ve olması gereken fotoakustik dalganın atım süresi. (Jong vd., 2002)

Microbubble	Rezonans frekansı ω_0(MHz)	Atım Süresi $\tau = \frac{1}{2\omega_0}$ (ns)
Sovonue	2.2	227.3
Albunex	5.2	96.1
Quantison	11.0	45.4

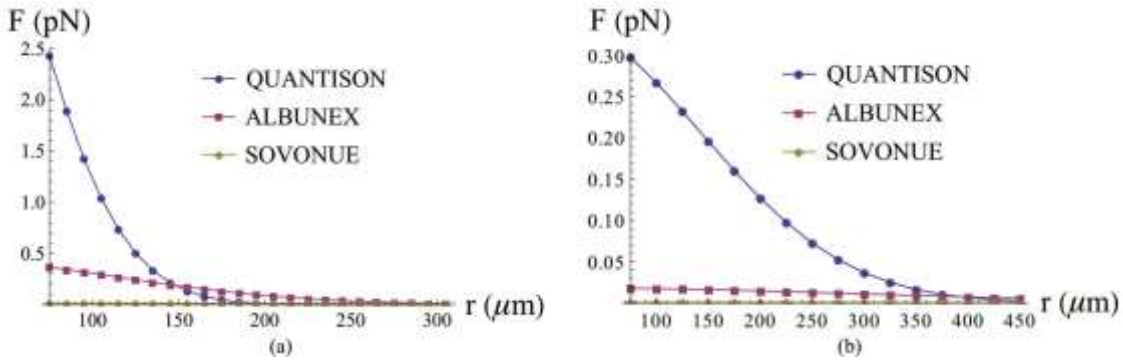
Tablo 2 10 μm çapında farklı baloncuklara (Sovonue, Albunex, Quantison) ait rezonans frekansları ve olması gereken fotoakustik dalganın atım süresi. (Jong vd., 2002)

Microbubble	Rezonans Frekansı ω_0(MHz)	Lazer Atım Süresi $\tau = \frac{1}{2\omega_0}$ (ns)
Sovonue	0.9	555.5
Albunex	1.9	263.1
Quantison	4.0	125.0

Simulasyonlar sonucu akustik radyasyon kuvveti hakkında yorumlar yapabilmesi için yukarıdaki tablodaki değişkenler göz önünde bulundurularak çeşitli grafikler elde edilmiştir.

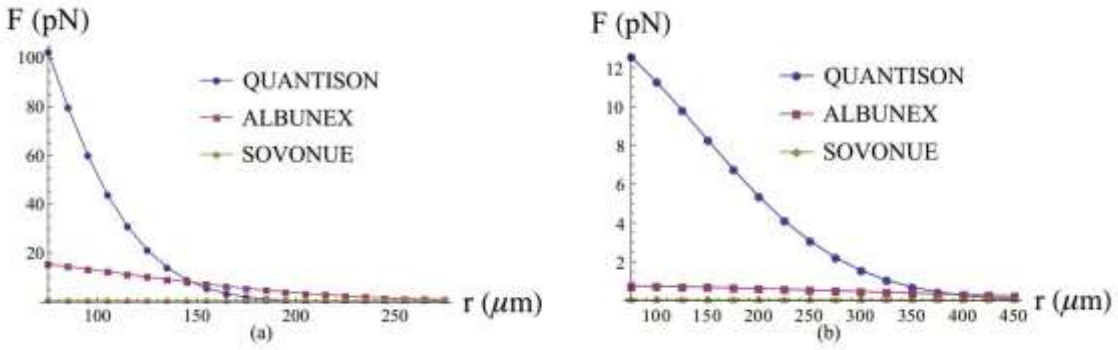
Hesaplarımızda toplam sönüm sabiti tüm mikro balonlar için δ_{tot} = 0.15 alınmıştır. (Jong vd., 2002)

Şekil 4.a.'da 5 μm çapındaki mikro baloncuklar üzerine 75 μm yarıçapındaki soğurucu tarafından uygulanan akustik radyasyon kuvvetinin mikro baloncuğun pozisyona bağlı olarak gösterilmektedir. Bahsi geçen mikrobaloncukların rezonans frekansları sırasıyla Tablo 1.'de özetlendiği üzere, 2.2, 5.2, and 11 MHz'dir. Şekil 4.b.'de 10 μm çapındaki mikro baloncuklar üzerine 75 μm yarıçapındaki soğurucu tarafından uygulanan akustik radyasyon kuvvetinin mikro baloncuğun pozisyona bağlı olarak gösterilmektedir. Bahsi geçen mikro baloncukların resonans frekansları sırasıyla Tablo 2.'de özetlendiği üzere, 0.9, 1.9, and 4 MHz'dir. Şekil 4 için kanın soğurma katsayısı μa, 6.9 cm−1 dir.



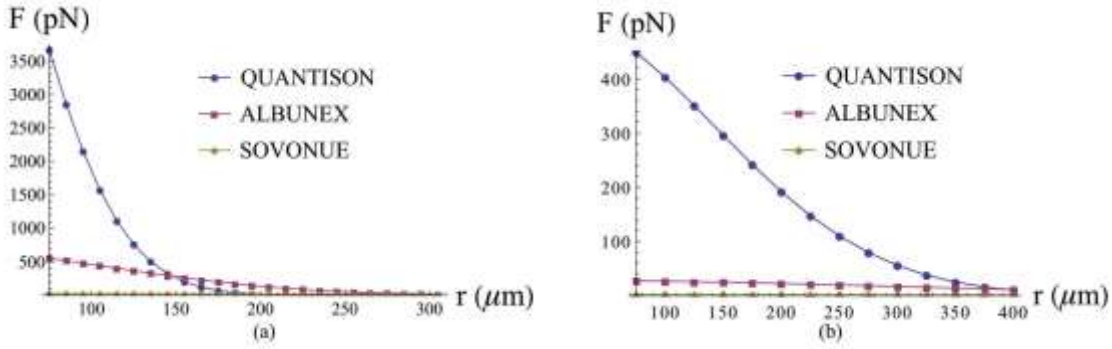
Şekil 10 Sovonue, Albunex, andQuantison üzerindeki birincil akustik radyasyon kuvvetinin (a) 5 μm çapındaki resonans frekansları sırasıyla ω_0 = 2.2, 5.2, and 11.0 MHz olan mikrobaloncuklar için ve (b) 10 μm çapındaki resonans frekansları sırasıyla ω_0 = 0.9, 1.9, and 4.0 MHz olan mikrobaloncuklar için, atım süresi $\tau = \frac{1}{2\omega_0}$ kanın soğurma katsayısı μa, 6.9 cm−1, tekrar frekansı vPRF = 1 MHz, ve demet genişliği σ = 70 μm olduğunda, mikrobaloncukların pozisyonuna bağlı olarak değişimi.

Şekil 9a.'da 5 μm çapındaki mikro baloncuklar üzerine 75 μm yarıçapındaki soğurucu tarafından uygulanan akustik radyasyon kuvvetinin mikro baloncuğun pozisyona bağlı olarak gösterilmektedir. Bahsi geçen mikro baloncukların resonans frekansları sırasıyla Tablo 1.'de özetlendiği üzere, 2.2, 5.2, and 11 MHz'dir. Şekil 5.b.'de 10μm çapındaki mikro baloncuklar üzerine 75 μm yarıçapındaki soğurucu tarafından uygulanan akustik radyasyon kuvvetinin mikro baloncuğun pozisyona bağlı olarak gösterilmektedir. Bahsi geçen mikro baloncukların resonans frekansları sırasıyla Tablo 2.'de özetlendiği üzere, 0.9, 1.9, and 4 MHz'dir. Şekil 5 için kanın soğurma katsayısı μa, 44.8 cm^{-1} dir.



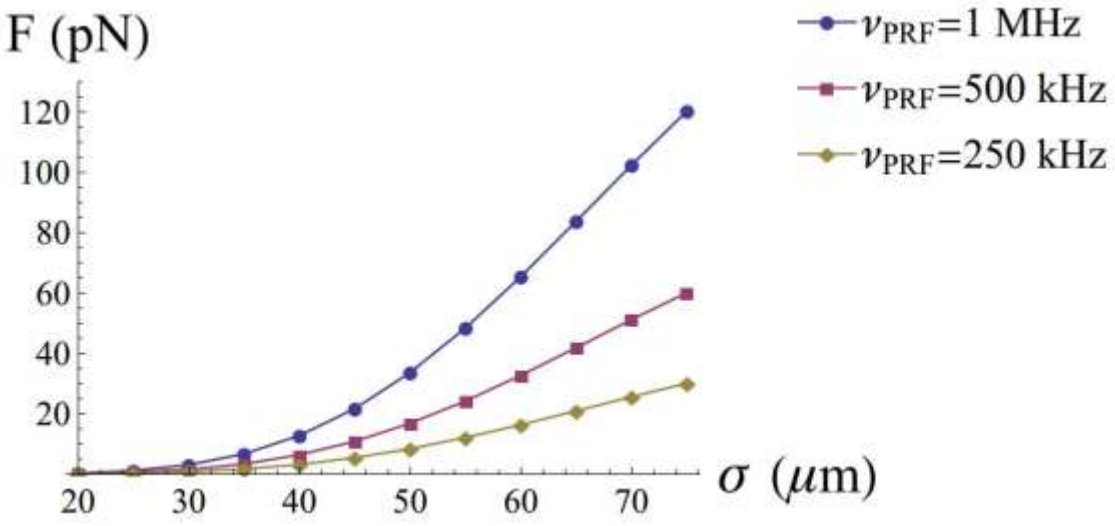
Şekil 11 Sovonue, Albunex, and Quantison üzerindeki birincil akustik radyasyon kuvvetinin (a) 5 μm çapındaki rezonans frekansları sırasıyla ω_0 = 2.2, 5.2, and 11.0 MHz olan mikro baloncuklar için ve (b) 10 μm çapındaki rezonans frekansları sırasıyla ω_0 = 0.9, 1.9, and 4.0 MHz olan mikro baloncuklar için, atım süresi $\tau = \frac{1}{2\omega_0}$ kanın soğurma katsayısı μ_a, 44.8 cm−1, tekrar frekansı *v*PRF = 1 MHz, ve demet genişliği σ = 70 μm olduğunda, mikro baloncukların pozisyonuna bağlı olarak değişimi.

Şekil 10.a.'da 5 μm çapındaki mikro baloncuklar üzerine 75 μm yarıçapındaki soğurucu tarafından uygulanan akustik radyasyon kuvvetinin mikro baloncuğun pozisyona bağlı olarak gösterilmektedir. Bahsi geçen mikro baloncukların rezonans frekansları sırasıyla Tablo 1.'de özetlendiği üzere, 2.2, 5.2, and 11 MHz'dir. Şekil 6.b.'de 10μm çapındaki mikro baloncuklar üzerine 75 μm yarıçapındaki soğurucu tarafından uygulanan akustik radyasyon kuvvetinin mikro baloncuğun pozisyona bağlı olarak gösterilmektedir. Bahsi geçen mikro baloncukların resonans frekansları sırasıyla Tablo 2.'de özetlendiği üzere, 0.9, 1.9, and 4 MHz'dir. Şekil 5 için kanın soğurma katsayısı μa, 268 cm^{-1} dir.



Şekil 12 Sovonue, Albunex, andQuantison üzerindeki birincil akustik radyasyon kuvvetinin (a) 5 *μ*m çapındaki resonans frekansları sırasıyla ω_0 = 2.2, 5.2, and 11.0 MHz olan mikrobaloncuklar için ve (b) 10 *μ*m çapındaki resonans frekansları sırasıyla ω_0 = 0.9, 1.9, and 4.0 MHz olan mikrobaloncuklar için, atım süresi $\tau = \frac{1}{2\omega_0}$kanın soğurma katsayısı *μa*, 268 cm−1, tekrar frekansı *v*PRF = 1 MHz, ve demet genişliği *σ* = 70 *μ*m olduğunda, mikrobaloncukların pozisyonuna bağlı olarak değişimi.

Şekil 11'de lazer demet genişliğinin akustik radyasyon kuvvet üzerindeki etkisi analiz edilmiştir. Bu analiz 5 *μ*m çapındaki mikro baloncuk için *r* = 75*μ*m olduğunda ve farklı tekrar frekansları v_{PRF} = 250 kHz, 500 kHz, and 1 MHz için yapılmıştır. Lazerin atım süresi 45.4 ns alınmıştır bu da 11 MHz'likresonans frekansına tekabül etmektedir.



Şekil 13 Birincil akustik radyasyon kuvvetinin, resonans frekansı ω_0 = 11 MHz ve çapı 5 *μ*m olan mikrobaloncuk için, atım süresi $\tau = \frac{1}{2\omega_0}$, kanın soğurma katsayısı *μa*, 44.8 cm−1 olduğunda, farklı tekrar frekansları için, v_{PRF} = 250 kHz, 500 kHz, and 1 MHz, lazerin demet genişliğine bağlı olarak değişimi.

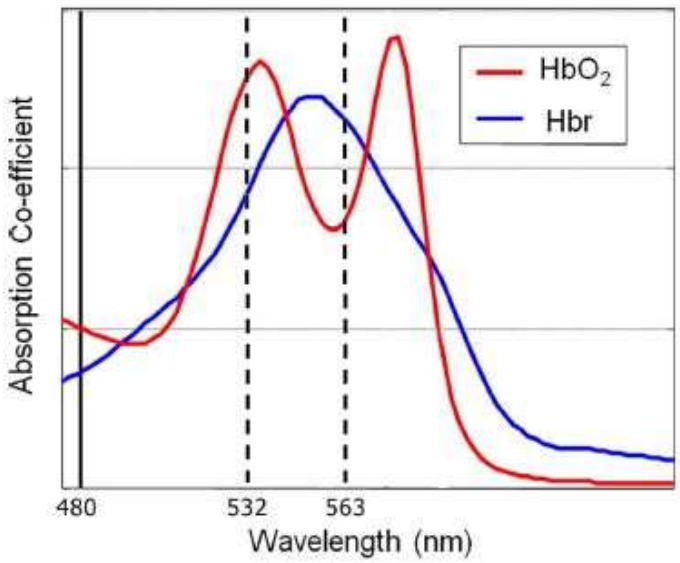
2.2 Deneysel Çalışmalar

2.2.1 Fotoakustik Görüntüleme için Kullanılan Lazerlerin Özellikleri

Fotoakustik görüntüleme çok yeni bir konsept değildir ve 2000 yılından beri bu görüntüleme sisteminde kullanılan bir çok farklı lazer çeşidi vardır. Fakat fotoakustik görüntüleme için fiber lazer kullanmak ise büyük ölçüde yeni bir girişimdir ve literatürde sadece bir kaç fotoakustik görüntüleme çalışmasında fiber lazer kullanılmıştır. Fiber lazerlerin atım sıklığı diode lazerlere göre daha yüksektir bu da gerçek zamanlı görüntüleme yapılmasına olanak sağlamaktadır.

2012'de, Zhang vd. (Zhang vd., 2012) bir farenin miyokard tabaka haritasını çıkarmak için iki farklı lazer kullanmışlardır. Spektral ölçümler için 210 nm ile 2600 nm arasında ayarlanabilir dalgaboyuna sahip diyot-pompa ile entegre Q-anahtarlı Nd:YAG lazer kullanmışlardır. Fakat, bu lazerin tekrar sıklığı 1kHz'dir ve bu değer hızlı görüntüleme için yeterli değildir. Bu sebeple, 532 nm sabit dalgaboyunda ve 50 kHz atım sıklığına sahip ışık üreten Nd:YVO4 lazer de kullanmışlardır. Hızlı atım sıklığı ve ayarlanabilir dalgaboyu daha iyi ve hızlı görüntülemeler için önemli bir gerekliliktir. Bu araştırmacılar fotoakustik mikroskop sistemi ile literatürdeki diğer değerlere kıyasla düşük olan 50 nJ ve 80 nJ atım enerjisi ile bir farenin farklı spesifik bölgelerini görüntülemişlerdir. Teorik kısımda açıkça gösterildiği gibi atım enerjisi arttıkça sinyalin genliği de artmaktadır ve bu da görüntü kalitesini iyileştirmektedir.

2012'deki bir diğer çalışmada, Yeh vd. (Yeh vd., 2012) kan nabız dalgasını görüntülemek için biri sabit dalga boylu katı hal lazeri diğeri dalga boyu ayarlanabilir lazer olmak üzere iki farklı lazer kullanmışlardır. Bu çalışmada, atardamarların ve toplardamarların kalp atışlarına olan diferansiyel tepkilerini incelemek için, bir farenin kulağı katı hal lazeri ile 532 nm dalga boyunda, ve dalga boyu ayarlanabilir lazer ile 532 nm de ışıtılarak görüntülenmiştir. Oksijenli hemoglobin atardamarlarda baskınken, de-oksijenli hemoglobin toplardamarlarda baskındır. Bu iki maddenin ışık soğurma katsayılarının pik değerleri birbirinden farklıdır ve doğal olarak bu durum atardamarın ve toplardamarın aynı anda farklı dalga boylarında ışıtılmasını ve görüntülenmesini gerektirmektedir. Aşağıdaki grafik oksijenli hemoglobin ile de-oksijenli hemoglobinin 500 nm civarındaki soğurma katsayılarını göstermektedir..



Şekil 14 Oksijenli hemoglobin ile de-oksijenli hemoglobinin 500 nm civarındaki soğurma katsayıları (Saka vd., 2010)

2011'de, Krumholzvd (Krumholz, 2011), Nd:YLF pompalı boya lazeri kullarak, biri ex vivo diğeri in vivo olan iki deney gerçekleştirmişlerdir ve melanin ile kanı spektral olarak ayırt edebilmişlerdir. Bu çalışmada, oksijenli kan, melanin hücreleri, ve embriyonik böbrek hücreleri 584, 590 ve 600 nm değerlerindeki üç farklı dalga boylarında aynı anda ışıtılarak görüntü edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre, dalga boyu arttıkça ışığın melanine kıyasla kan tarafından soğrulması önemli ölçüde azalmaktadır. Bu fark melanin ile kanın ayırt edilmesi için yeterli seviyededir. Fakat belirtmek gerekir ki, bu çalışmada kullanılan lazerin atım enerjisi 100 nJ civarındadır ve atım sıklığı gerçek zamanlı görüntü elde etmek için yeterli büyüklükte değildir.

2011'de, Favazzavd (Favazza vd., 2011), insan derisindeki mikro damarları 561 nm ve 570 nm olmak üzere iki farklı dalga boyunda ışıtarak fonksiyonel görüntüleme elde etmişlerdir. 561 nm dalga boyu, de-oksijenli hemoglobin için lokal maksimum soğurma noktasıdır. Diğer yandan 570 nm dalga boyu ise oksijenli ve de-oksijenli hemoglobin için aynı soğurma katsayısı değerine sahiptir. Öyle ki, bu belirli dalga boylarında toplanan maksimum genlik projeksiyonundaki değişiklikler, de-oksijenli hemoglobin konsantrasyonunda göreceli artış veya azalış gösterebilmektedir. Tablo 3.'de son yıllarda yapılan araştırmalarda kullanılan Q-anahtarlı lazerlerin karakteristik özellikleri gösterilmektedir.

Tablo 3 Son yıllarda yapılan araştırmalarda kullanılan Q-anahtarlı lazerlerin karakteristiği ve bu çalışmalarda kullanılan ultrason probun merkez frekansları. (Krumholz vd., 2011; Zhang vd., 2012; Yeh vd., 2012; Saka vd., 2010; Favazza vd., 2011; Yao vd., 2011; Jo & Yang, 2011; Liu & Buma, 2010; Liao vd., 2010; Yang vd., 2012)

	Laser	τ_p (ns)	Fluence/ Energy	PRF	Wavelength (nm)	CF(MHz)
Yang et al.(2012)	Nd:YAG	8-10	40 nj	10 Hz	532,680-960	22
Zhang *et al.* (2012)	Nd:YAG Nd:YVO 4	N/A	80 nJ	1 kHz 50 kHz	210 to 2600 532	40
Yeh *et al.* (2012)	Nd:YAG Nd:YAG	N/A	80 nJ	N/A	532,563	50
Krumhloz *et al. (2011)*	Nd:YLF	N/A	0.1 µJ	N/A	584, 590, 600	75
Favazza *et al. (2011)*	Nd:YLF	5	$2\ mJ/cm^2$	1kHz	561, 570	20
Yao *et al. (2011)*	Nd:YLF	N/A	0.1 µJ	N/A	523	N/A
J.Jo and X. Yang (2011)	Nd:YAG	N/A	$20\ mJ/cm^2$	N/A	680,797	5
M.Liu and T. Buma (2010)	Nd:YAG	0.6	8 µJ	6.6 kHz	570-930	25
L.D Liao and M.L.Li (2010)	Nd:YAG	4	$6\ mJ/cm^2$	10 Hz	570,570,600	25
Staley *et al.* (2010)	Nd:YAG	N/A	N/A	10 Hz	764	25

2011'de, Wang vd. (Wang vd. L. , 2011), ., bir başka lazer çeşidi olarak, melanoma hücre ölçümleri için 1064 nm dalga boyunda ışık üreten fiber lazer kullanmışlardır. Bu çalışmada kullanılan lazer 10 ns atım süresi ve 50 kHz atım sıklığına sahiptir. Melaninin geniş bantlı bir soğurucu olasından ötürü bu lazer melanoma ölçümleri için kullanılabilir fakat hemoglobinin 1064 nm'deki optik soğurması görece düşük olduğundan bu lazer hemoglobin, oksijenli hemoglobin ve de-oksijenli hemoglobin için iyi görüntüler elde etmeye yaramamaktadır.

2011'deki bir başka çalışmada, Shi vd. (Shi vd., 2011), fotoakustik mikroskop çalışmalarında 600 kHz'e kadar çıkabilen atım süresine sahip diyot-pompa nanosaniye atımlı Yb-katkılı 532 nm fiber lazer kullanmışlardır. Yüksek atım süreli bu lazer ile hemen hemen gerçek zamanlı görüntü elde etmişlerdir. Ayrıca, hemoglobinin 532 nm dalga boyundaki soğurma katsayısı da yüksektir. Bu sistem diğer katı hal lazerlere kıyaslandığında daha ileri seviyededir çünkü uzamsal çözünürlükten ödün vermeden konvansiyonel sistemlerin çoğundan iki kata kadar daha hızlıdır. Bu sistemin temel dezavantajı sabit dalga boylu olmasıdır çünkü daha önce de

bahsettiğimiz gibi spektral ölçümler ve fonksiyonel görüntülemeler için farklı dalga boylarında çalışmak gerekmektedir. Tablo 4.'de son yıllarda yapılan araştırmalarda kullanılan fiber lazerlerin karakteristik özelliklerini gösterilmektedir.

Tablo 4 Son yıllarda yapılan araştırmalarda kullanılan fiber lazerlerin karakteristiği ve bu çalışmalarda kullanılan ultrason probun merkez frekansları. (Shao vd., 2012; Shi vd., 2011; Wang vd. L. , 2011)

	Laser	τ_p (ns)	Fluence/ Energy	PRF	Wavelength (nm)	CF(MHz)
Shao et al.(2012)	Yd-Doped Mode-Locked	1	20 µj	Upto 600 kHz	532	3.5
Wang et al. (2011)	N/A	10	0.92 µj	50 kHz	1064	40
Shi *et al.* (2011)	Yd-Doped Mode-Locked	1	20 µj	Upto 600 kHz	532	50

Eski bir çalışma olarak, 2005'te, Allen vd. (Allen vd., 2005), fotoakustik görüntüleme çalışmalarında diyot lazer kullanmışlardır ve sonuçları göstermiştir ki kan oksijenlenmesini ve hacmini görüntülemek için yüzeysel damarlarda ölçülebilen sinyaller üretilebilmektedir. Bu çalışmada ayrıca, lazerin atım süresinin fotoakustik sinyaller üzerindeki etkisini incelemek için, diyot lazerlerin ayarlanabilir atım süresi özelliğinden yararlanarak 10 ns ile 200 ns arasındaki farklı atım sürelerini kullanmışlardır. Fakat diyot lazerlerin enerjileri tipik Q-anahtarlı lazerlere kıyasla düşüktür ve bu sebeple diyot lazerlerden elde edilen sinyaller yüksek sayıda sinyal ortalaması gerektirmektedir. Sonuçlar göstermiştir ki sinyal ortalaması alındığında, 10 mJ Q-anahtarlı lazer atımları ile elde edilen sinyal-gürültü oranı diyot lazerlerden elde edilenlere kıyasla 22.3 kat daha büyük olabilmektedir. Fakat 12 diyot lazerin birleştirilmesiyle aynı Q-anahtarlı lazerden elde edilen sonuçlara denk sinyal-gürültü oranları elde edilebilmiştir. Bu da demek oluyor ki yeterli sayıda diyot lazer kullanılarak yakın kızılötesi bölgesindeki spektroskopik fotoakustik uygulamalar için yeterli oranda sinyal-gürültü oranları elde

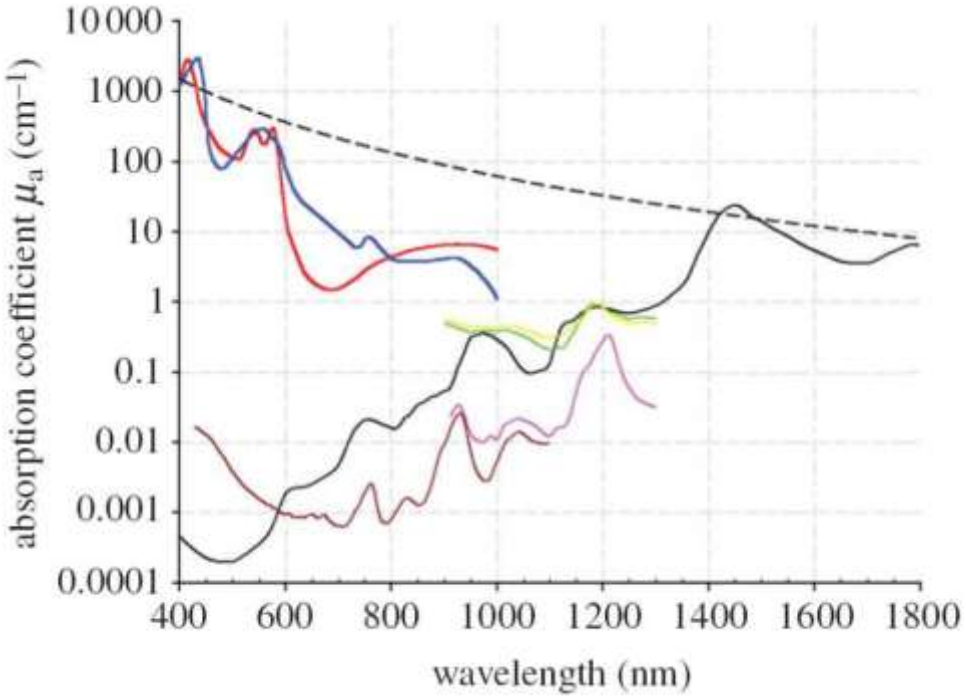
edilebilmektedir. Aşağıdaki tabloda son yıllarda yapılan araştırmalarda kullanılan diyot lazerlerin karakteristik özelliklerini göstermektedir.

Tablo 5 Son yıllarda yapılan araştırmalarda kullanılan diyot lazerlerin karakteristiği ve bu çalışmalarda kullanılan ultrason probun merkez frekansları. (Allen vd., 2005; Zeng vd., 2012)

	Laser	τ_p (ns)	Fluence/ Energy	PRF	Wavelength (nm)	CF(MHz)
Zeng et al. (2012)	Laser Diode	100	5.6 µj	0.8 kHz	905	10
Allen et al. (2005)	Pulsed Laser Diode	10 to 200	N/A	N/A	940	N/A

Bu tablolara baktıldığı zaman lazerin tekrarlama sıklığının en yüksek 600 kHz lerde olduğu görülmektedir. Ayrıca kullanılan lazerler tek dalga boyu çıkışlı olduğu için uygulama açısından düşünüldüğünde çok fazla alternatif söz konusu olmamaktadır. Fotoakustik görüntülemede kullanılan lazerler düşünüldüğünde proje kapsamındaki çalışmalar için yeni ve özel yapım bir lazer yapılmıştır.

Bu lazerin tamamı fiberlerden oluşmaktadır ve istenilen çalışmaya göre bazı parametreleri değiştirebilmektedir. Örneğin lazerin atılım sıklığı istenilen şekilde 50 kHz 'den 3 MHz aralığında özel olarak geliştirilmiş programlanabilen elektronik bir sistem sayesinde değiştirilebilir. Literatürdeki lazerlerle kıyaslandığı zaman atılım sıklığının 3 MHz'e kadar çıkabilmesi gerçek zamanlı bir görüntü alınabilmesi için imkan sunmaktadır. Bu özelliğinin yanısıra iterbiyum fiberden oluşan bu lazerin çıkışına 3.5 meter fotonik kristal fiber eklenerek oldukça geniş dalga boyu aralığı elde edilmiştir (600-1100 nm). Fotonik kristal fiber sayesinde çeşitli optik filtreler kullanılarak istenilen çalışmaya uygun dalga boyu seçme şansı elde edilmiştir. Dalga boyu seçimi fotoakustik görüntülemdde çok büyük önem taşımaktadır. Örneğin çok yaygın olarak bilinen ve kanser tanısında büyük önem taşıyan oksijenli, oksijensiz hemoglobin ve melanin pigmentlerinin kendilerine has gösteren soğurma spektrumu mevcuttur. Şekil 9.'a bakılarak hemoglobinin ve melaninin soğurma katsayılarının hangi dalga boyunda en fazla olduğunu görülebilir.

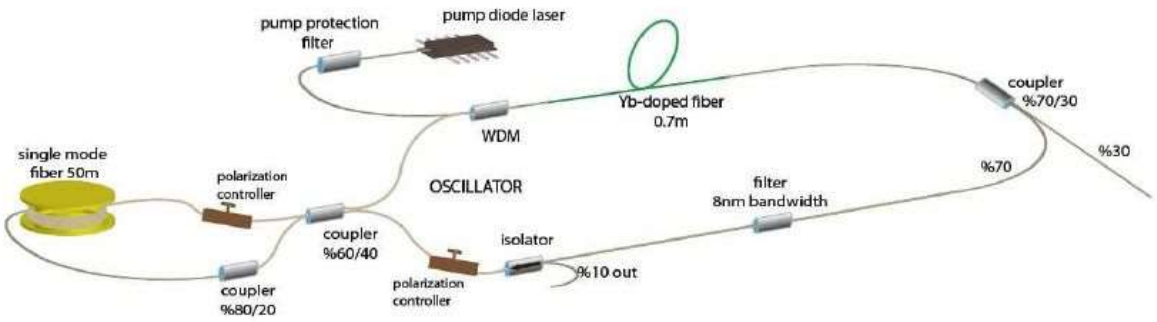


Şekil 15 Çeşitli doku kromoforları için soğurma spektrumu. Kırmızı çizgi: Oksijenli hemoglobin (HbO2), Mavi çizgi: Oksijensiz Hemoglobin (HHb), siyah çizgi: su, kahverengi çizgi: yağ (a), pembe çizgi : yağ(b), siyah aralıklı çizgi: melanin , yeşil çizgi: kolajen, sarı çizgi: elastin. (Beard vd., 2011)

2.2.2 Proje için yapılan fiber lazerin kurulumu

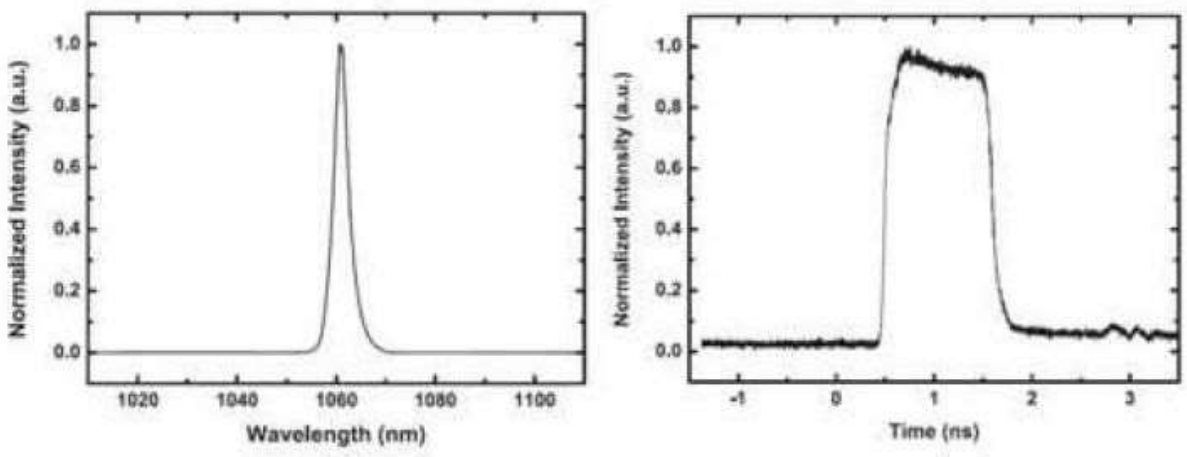
2.2.2.1. Osilatör

Osilatör kısmı 0.7 m uzunluğunda Yb-katkılı fiberden, devamında bir %70 çiftleştirici, 8nm bant geçiren filtre, tek yönlü çalışmayı sağlamak için bir sıralı izolatör, bir %10 çıkış çiftleştiricisi, iki polarizasyon kontrolcüsü, Sagnac döngüsü için 50m uzunluğunda HI-1060 tek modlu fiber ve NOLM (nonlinear optical loop mirror) için 2x2 %40 çiftleştiriciden oluşmaktadır. Osilatör kısmı bir bant geçirici filtre olmaksızın çalışabilmesine rağmen, merkezi dalgaboyunu ayarlayabilmekte ve hatta bu şekilde kararlı bir şekilde çalışmasını sağlamaktadır. Pompa kaynak olarak, 650 mW maksimum güç verebilen fiber-bağlantılı tek modlu 980nm diot lazer kullanılmıştır. Bir pompa koruma filtresi fiber içinde geri yönde yayılan istenmeyen ışığı engellemek için kullanılmaktadır, aksi halde, geri yönde gelen bu güç diyot lazerin bozulmasına sebep olacaktır. Kavite'nin ana tekrar sıklığı 3.1 MHz dir. Polarizasyon kontrolcüleri genel itibariyle lazerin mode-kilitli çalışmasını ayarlamak için kullanılmaktadır. Çıkış kısmı 24 mW güç ve 8 nJ enerji salınımları ile amplifikasyon aşamasını besleyen %10 fiber ile ikiye ayrılmıştır. Şekil 10. osilatör kurulumunun şematiğini göstermektedir.



Şekil 16 Osilatör kurulumunun şematiği. WDM: Dalgaboyu-bölmeli çoklayıcı (Wavelength-division multiplexer)

Osilatör çıkışı spektrum, optik spektrum analize edici ile ölçüldüğünde lazer atım süresi 1 ns olarak ölçülmüştür, bu değerler Şekil 11.'de gösterilmiştir.

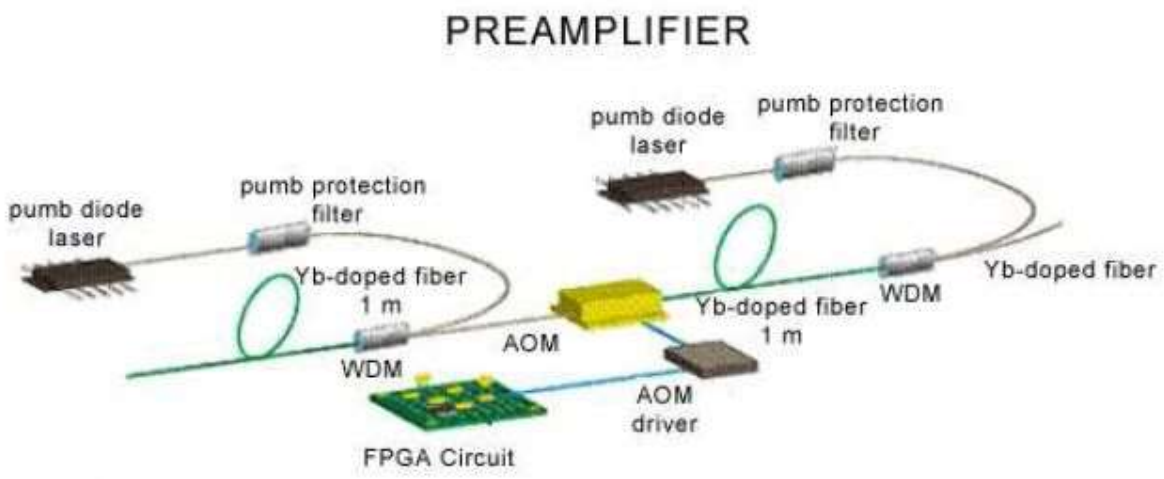


Şekil 17 Osilatör çıkışı optik spektrum analize edici ile elde edilen optik spektrum.

2.2.2.2 Ön Amplifikatör

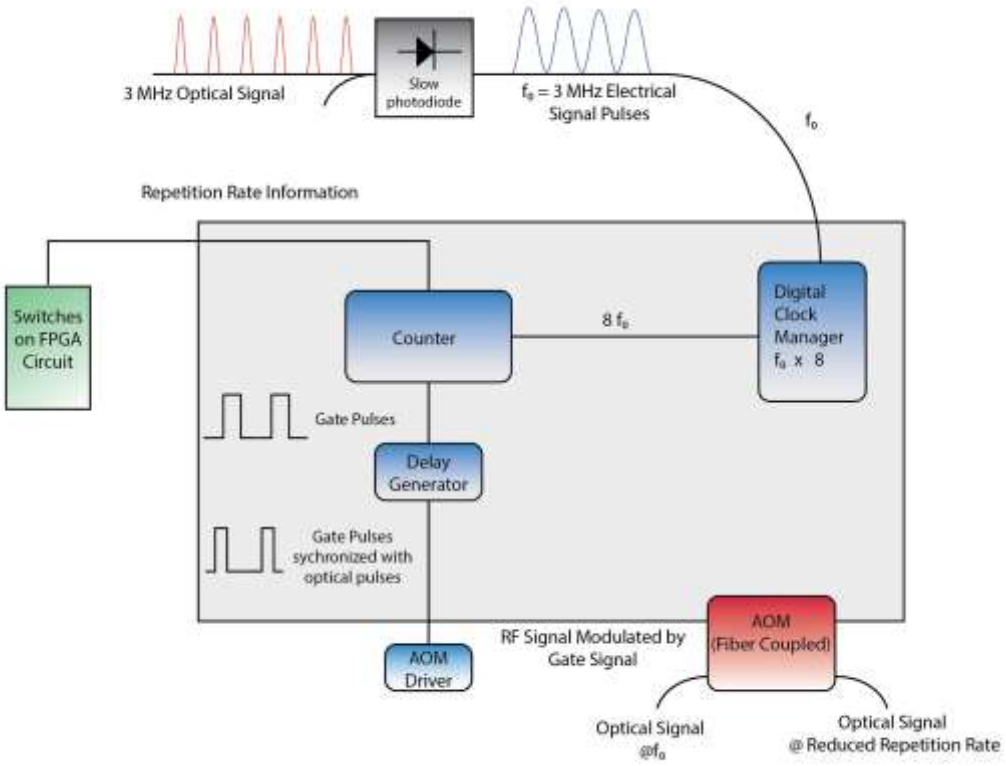
Ön Amplifikatör 1m uzunluğunda Yd-katkılı fiber, devamında bir FPGA (field programmable gate array) devresine bağlı olan fiber bağlantılı akusto-optik modülatörden (AOM) oluşmaktadır. 650 mW maksimum güç verebilen fiber-bağlantılı tek modlu 980nm diot lazer pompa lazer olarak kullanılmıştır. Akusto optik modülatör, frekans, şiddet ve lazer demetinin yönünü değiştirmeye yaramaktadır. Bir piezoelektrik transducer ışığa geçirgen bir cam parçasına takılıdır. Işık, kristal içinden geçen ses dalgası ile üretilen kırılma indisi ızgarasından

(refractive index grating) dolayı Bragg kırınımına uğrayacaktır. Saçılan demetin frekansı ve yönü ses dalgasının frekansı aracılığıyla kontrol edilebilmektedir; ve böylece, istenilen atım patlama modu (pulse burst mode) üretilebilmektedir. Optik güç ayrıca akustik güç ile de kontrol edilebilir. Akustik güç yeteri kadar güçlü olduğu sürece, optik gücün %50'den fazlası ve bazı durumlarda %95'den fazlası kırınıma uğrayabilmektedir. Amplifikatör sinyali 300mW güç ve 100 nJ enerjiye kadar çıkarabilmektedir. Tekrar sıklığı AOM aracılığıyla 100 kHz'e düşürülmekte ve böylece optik gücün kaybolmasına sebep olmaktadır. İçerisinde düzgün olmayan dizileri de içeren atım dizisi üzerindeki tam kontrol, özel geliştirilen FPGA sayesinde ve AOM ile sağlanmaktadır. 650 mW maksimum güç verebilen 980nm diot lazer ve 1m uzunluğunda Yd-katkılı fiberden oluşan bir diğer amplifikatör de düşen optik gücü ve ortalama gücü telafi etmek için yapılmıştır ve böylece 150 mW güç ve 1.5 µJ atım enerjisi sağlanmaktadır. Şekil 12 ön amplifikatörün şematiğini göstermektedir.



Şekil 18 Ön amplifikatör kurulumunun şematiği.

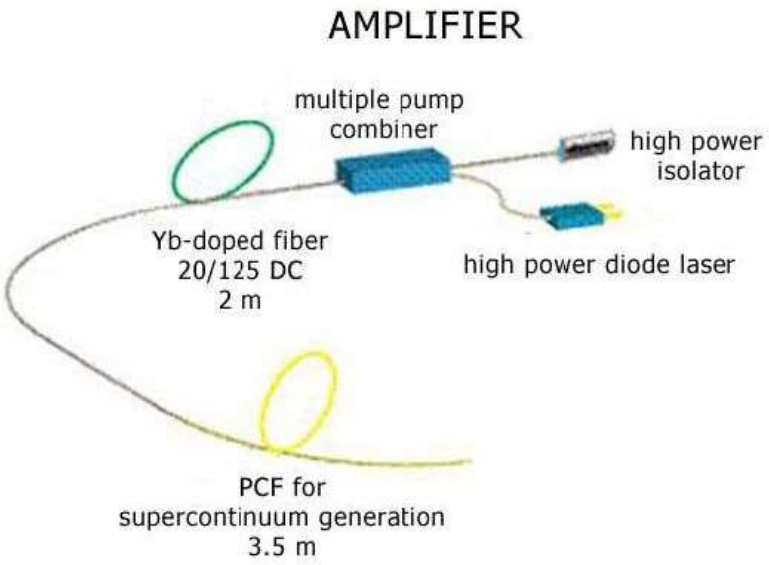
Lazerin tekrar sıklığı FPGA devresi yardımı ile 50 kHz'den 3.1 MHz'e ayarlanabilmektedir. Devrenin programlanması bizim tarafımızdan yapılmış ve devrenin şematiği ve mantığı Şekil 12'de gösterilmiştir.



Şekil 19. FPGA (field programmable gate array) devresinin şematiği.

2.2.2.3 Final Amplifikatör

10 W maksimum güç üretebilen 976 nm diyot lazer ile bağlı 105 µmiç çaplı çokmodlu fiber pompa kaynak olarak kullanılmıştır. Amplifikatör ayrıca 2 m uzunluğunda ve 20 µm iç çaplı ve 0.07 nümerik açıklığı olan geniş bant çift-kaplı Yb-katkılı fiberden oluşmuştur. Güç amplifikatörünün sekizgen şeklinde kaplanmış fiberi 125µm iç çapa ve 0.46 nümerik açıklığa sahiptir. Şekil 13. final amplifikatörünün şematiğini göstermektedir.

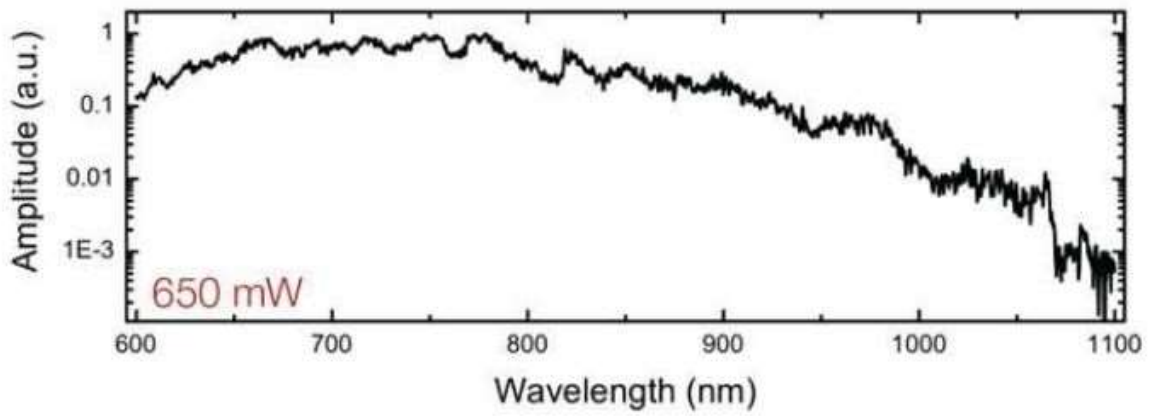


Şekil 20 Final amplifikatörün şematiği.

Optik güç 1.8 W seviyesine kadar arttırılabilmektedir ve ön amplifikatörün korunması yüksek-güçlü izolatör ile sağlanmaktadır.

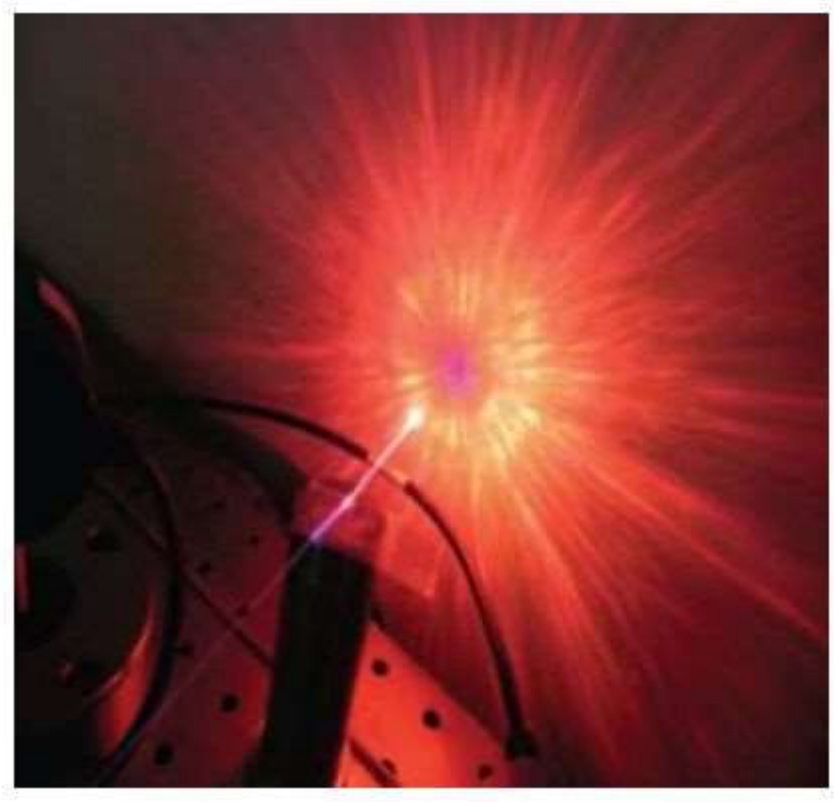
2.2.2.4. Superkontinyum Üretilmesi

Superkontinuum üretilmesi için final amplifikatörün çift-katlı Yb-katkılı fiberin ucuna 3.5 metre uzunluklu fotonik kristal fiber eklenmiştir. Geniş bantlı fiber ile fotonik kristal fiber arasındaki güç dağılımı %35 civarındadır; böylelikle, çıkış gücü yaklaşık 6 mikroJ'e karşılık gelen 600 mW civarındadır. Lineer olmayan optik yayılım PCF içinden geçerken, PCF'in hava silika balpeteği şeklindeki mikro yapısı sayesinde önemli ölçüde artmaktadır. PCF'in sıfır dispersiyon dalgaboyu 1040 nm'dir. Lineer olmayan etkilerin bir sonucu olarak, spektrum genişlemektedir ve 600 nm ile 1100 nm arasında superkontinyum üretilmektedir. Şekil 14 superkontinyum spektrumunu göstermektedir.



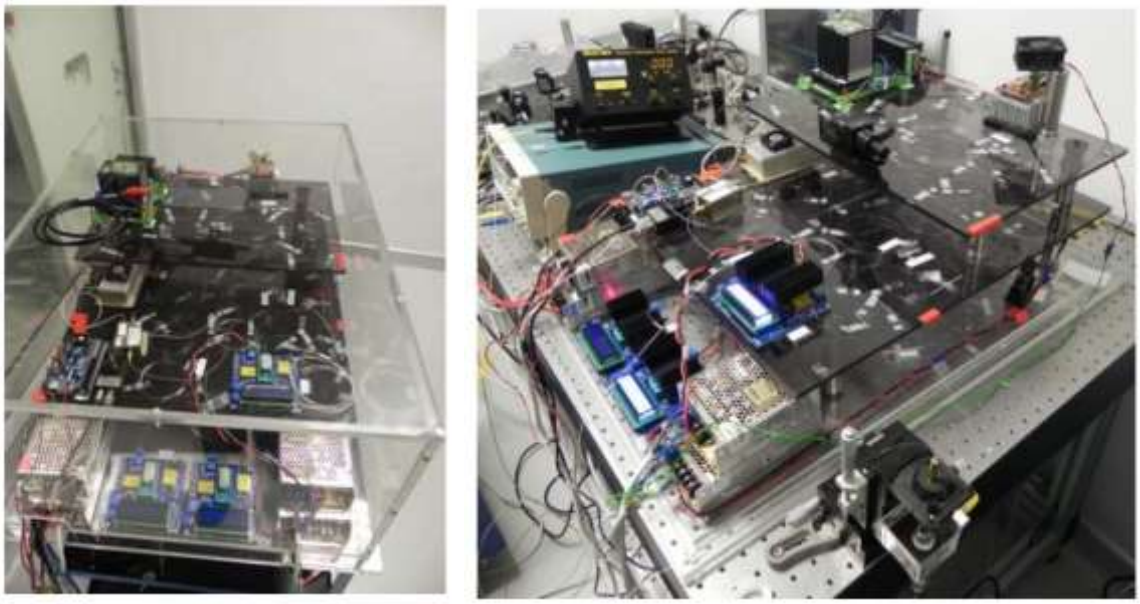
Şekil 21 Superkontinyum spektrumu.

Şekil 20. hem görünür hem de görünür olmayan superkontinuum spektrumundaki, elektromanyetik spektrumun görünür kısmındaki renklere karşılık gelen baskın olarak kırmızı ve sarı ışığı göstermektedir.



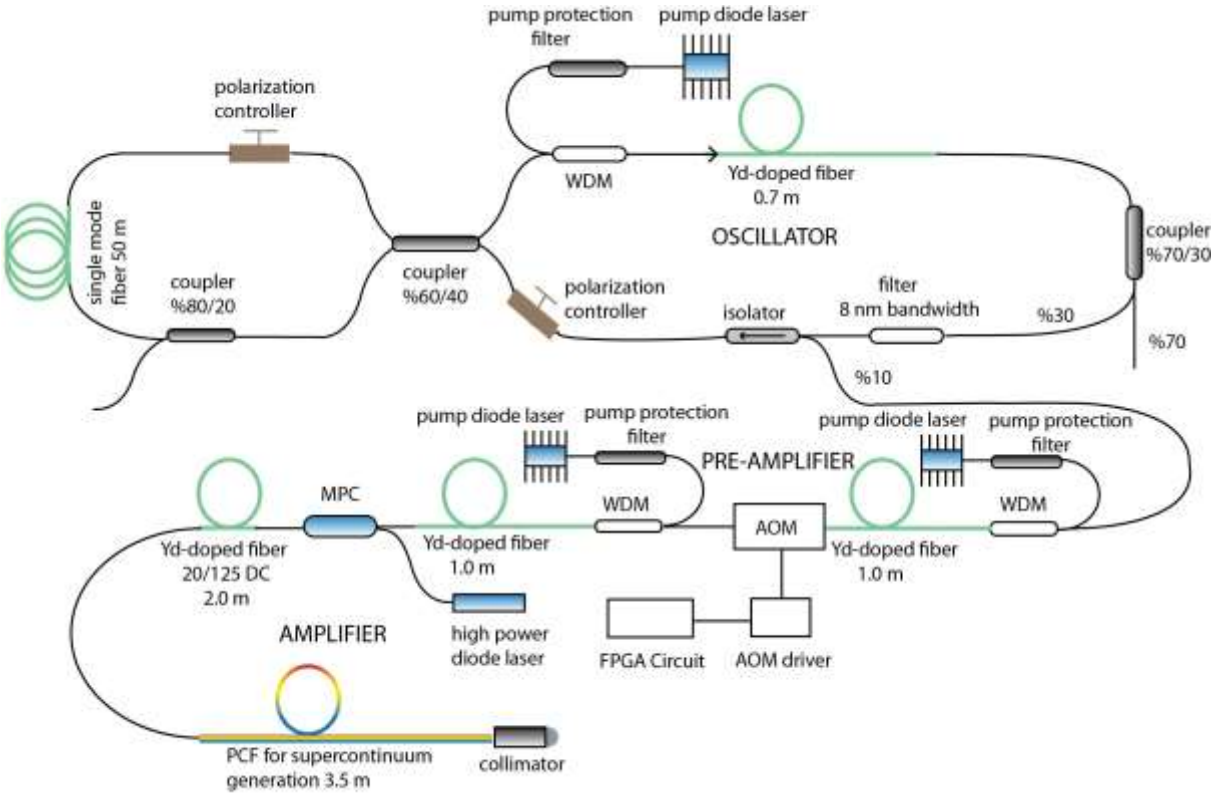
Şekil 22. Üretilen supercontinuum ışık.

Şekil 20, deney sırasında stabiliteyi sağlamak için pleksiglas içine konulmuş lazer sistemini göstermektedir.



Şekil 23 Fiber lazer sisteminin fotoğrafı

Tamamı fiberlerden oluşan lazer sisteminin şematiği Şekil 22'de gösterilmektedir.



Şekil 24 Fiber lazer sisteminin şematiği.

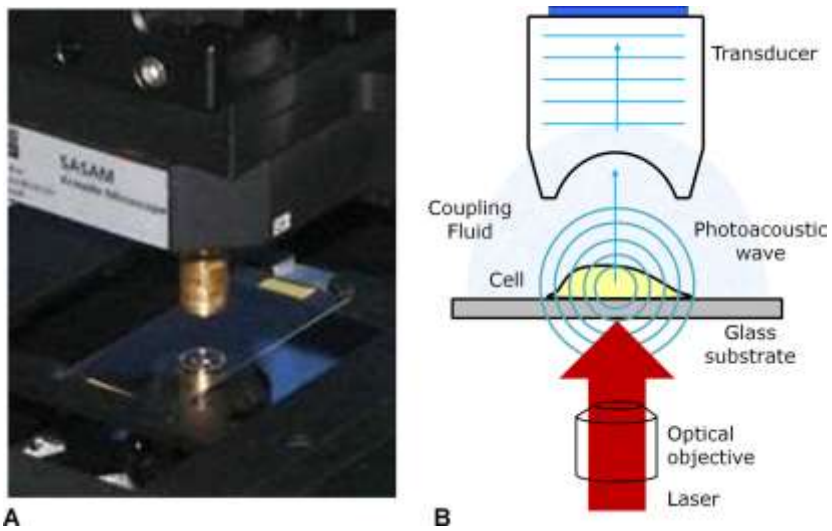
Hemoglobin, oksijenli hemoglobin, melanin vb. gibi farklı kromoforları görüntülemek için superkontinyum ışığın filtrelenmesi gerekmektedir. Merkezi dalgaboyunu ayarlamak için, akusto optik modilatör bant filtre olarak kullanılabilmektedir. İstenilen dalgaboyunun filtrelenmesi ayrıca farklı dalgaboyları için üretilen optik filtreler ile de yapılabilir. Optik filtreler kullanılarak, görüntülenecek maddeler farklı dalgaboylarına maruz bırakılarak çok dalgaboylu data elde edilebilir. Görüntü, akusto optik modülatör veya optik filtrelerin çıkışında galvo-tarayıcı ile veyamotorize tabla ile örneğin taranması ile oluşturulabilmektedir.

2.2.3 Görüntü Oluşturmada Kullanılan Yöntem ve Deneyler

2.2.3.1 Fotoakustik Mikroskop Çalışma Modları

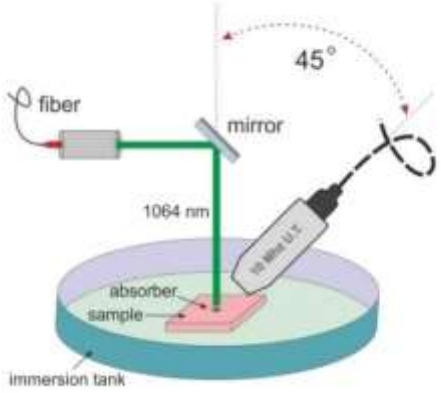
Fotoakustik görüntülemenin kalitesini belirleyen iki önemli kavram mevcuttur. Bunlardan bir tanesi uzaysal çözünürlük, diğeri ise konrast çözünürlüktür. Uzaysal çözünürlük, yanal ve dikey çözünürlük olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Yanal ve eksen çözünürlük sadece ultrason dalgasına bağlı kalınırsa derinlik arttıkça kısıtlanmaktadır. Fakat fotoakustik görüntülemede optik odaklama söz konusu olduğu için bu kısıtlamanın önüne geçilebilir. Diğer optik mikroskoplarda da bu derinlik söz konusu olabilir. Fotoakustik görüntülemede dokudaki hücresel yapıların optik soğurma özelliklerine hassaslığı söz konusudur.

Fotoakustik görüntülemede deneysel kurulum sisteminin iki modu söz konusudur. Literatürde bu modlar *iletim* ve *yansıma* olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. İletim odda çalışırken, fotoakustik örneğe gönderilen ışık ve akustik basınç dalgasını elektrik sinyaline dönüştüren ultason prob (transducer) zıt yönlerdedir. ÖrneğinŞekil 23'de, ışık görüntülenecek hedefin alt tarafından gönderilirken, ultrason prob örneğin üst tarafında yer almaktadır. Bunun tam ters konumlanması da iletim mod için bir örnektir.



Şekil 25 İletim mod fotoakustik mikroskop sisteminin şematiği.

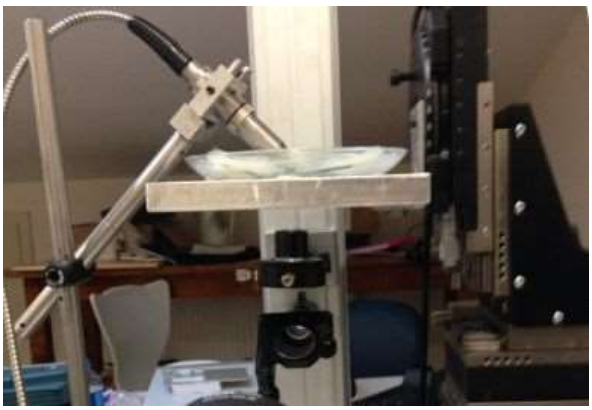
Yansıma modundaçalışırkense, görüntülenecek olan hedefe gönderilen ışık ve fotoakustik sinyali ölçen ultrason prob aynı yönlerde yer almaktadır. Örneğin, aşağıdaki şekilde ışık ile ultrason prob hedefin üst tarafında yer almaktadır. Benzer şekilde, bunun tam ters konumlanması da yansıma moduna örnektir.



Şekil 26 Yansıma mod fotoakustik mikroskop sistemi.

Yansıma modunda çalışırken, görüntülenecek olan hedefe gönderilen ışık ve fotoakustik sinyali ölçen ultrason prob aynı yönlerde yer almaktadır. Örneğin, Şekil 24'da ışık ile ultrason prob hedefin üst tarafında yer almaktadır. Benzer şekilde, bunun tam ters konumlanması da yansıma moduna örnektir.

Bu projede, her iki modda çalışmak üzere fotoakustik mikroskop sistem kurulmuştur. Fakat deneylerde daha çok iletim modu kullanılmıştır. İletim modunda çalışmak yansıma modunda çalışmaya göre kıyaslandığında mekanik olarak daha kolay uygulanabilir olduğu ve görece daha iyi sonuçlar verdiği gözlemlenmiştir. Özellikle hücre görüntüleme deneylerinde kullanılan ultrason probun boyutu büyük olduğundan iletim modunda çalışmanın deney sonuçlarının doğruluğu açısından daha uygun olduğu görülmüştür. Deneylerde kullanılan iletim modu Şekil 25'deki gibidir.



Şekil 27 Deneylerde kullanılan iletim modu.

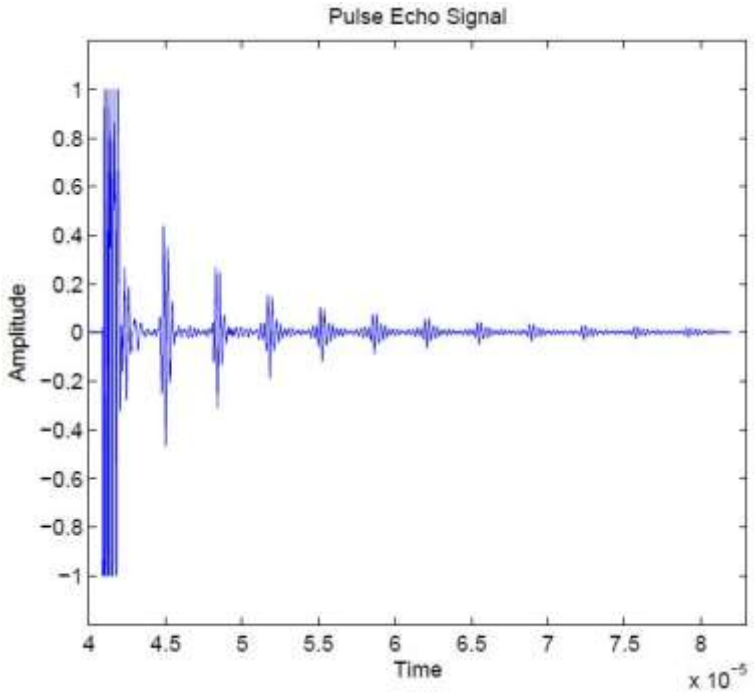
2.2.3.2 Ultrason Sistemi

Fotoakustik sinyalleri ölçmek için merkez frekansları farklı olan çeşitli ultrason problar kullanılmıştır. Bu projede kullanılan ultrason probların fotoğrafı aşağıdaki şekilde gösterilmiştir. Farklı boyutlardaki hedeflerden elde edilen fotoakustik dalgaların ölçülmesi söz konusu olduğunda ultrason probun merkez frekansı önemli hale gelmektedir. Boyutu küçük olan bir hedeften oluşan fotoakustik dalganın frekansı, boyutu büyük olan hedeflerden oluşan fotoakustik dalgalarınkine kıyasla daha yüksektir. Doğal olarak, boyutları çok küçük olan hücrelerin görüntülenmesinde yüksek merkez frekanslı ultrasond probların kullanılması ölçülen sinyalin genliğini arttırıcı özelliğe sahip olmaktadır. Şekil 26'de projede kullandığımız merkez frekansı farklı olan ultrason probları gösterilmektedir.



Şekil 28 Projede kullanılan farklı merkez frekanslarındaki ultrason problar

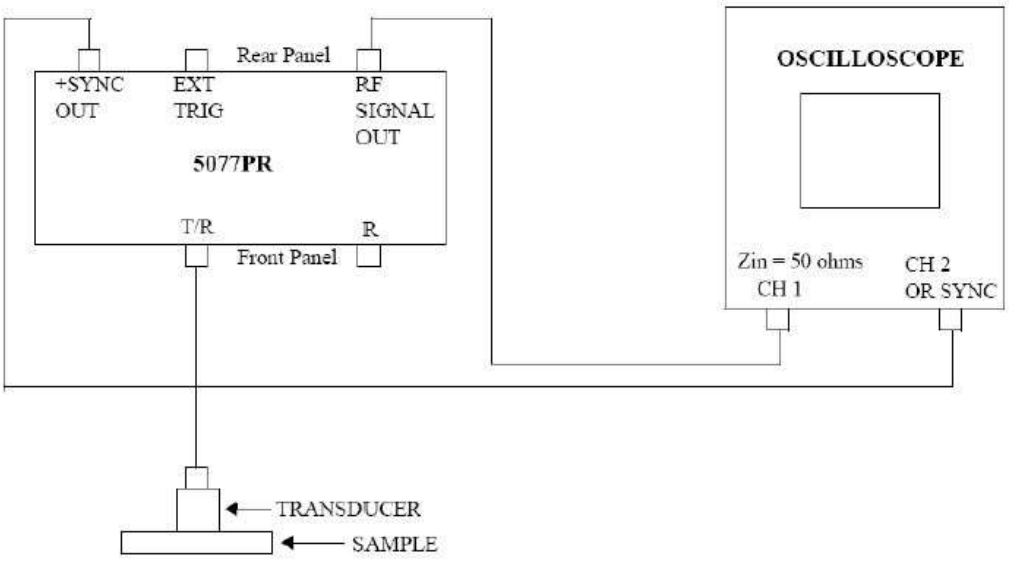
Lazer ile indüklenen ultrason sinyalini analiz etmek için, bir üretici/alıcı (OLYMPUS 5073PR), preamplifikatör (OLYMPUS 5678) ve osiloskop görevi gören veri toplama kartı (GAGE, Express Compu Scope 1422) kullanılmıştır. Şekil 27'de üretici/alıcı ile üretilmiş ve veri toplama kartı ile elde edilmiş atım/yankı (pulse/echo) sinyallerini göstermektedir. Böylece deneylere başlanmadan önce ultason sistemi test edilmiş ve gereken kalibrasyonlar yapılmıştır.



Şekil 29 Atım/yankı sinyalleri

Aşağıdaki şekil osiloskop ile üretici/alıcı'nın atım/yankı modunda çalışmasını sağlayan kablo bağlantılarını göstermektedir.

Şekil 28'de ise osiloskop ile üretici/alıcı'nın atım/yankı modunda çalışmasını sağlayan kablo bağlantılarını göstermektedir.



Şekil 30 Osiloskop ile üretici/alıcı'nın atım/yankı modunda çalışmasını sağlayan kablo bağlantılar

Şekil 29'de üretici/alıcı'nın ve ön amplifikatörün fotoğrafını göstermektedir. Şekil 65 ise osiloskop ile üretici/alıcının başlangıç ayarlarını göstermektedir.



Şekil 31 Üretici/alıcı (sağda) ile ön amplifikatörün fotoğrafı.

Oscilloscope	Pulser/Receiver
Vertical Sensitivity: 0.2V/Div	Mode: Position 1 (Pulse Echo)
Horizontal Sweep Rate: 1uS/Div	Rep Rate: 2K or 5K
Ext. Trig: Positive Slope	Pulser Voltage = 100V
	Transducer Frequency, according to chosen transducer
	Gain: -10dB
	HPF: OUT
	LPF: Full BW

Şekil 32 Osiloskop ile üretici/alıcı ayarları.

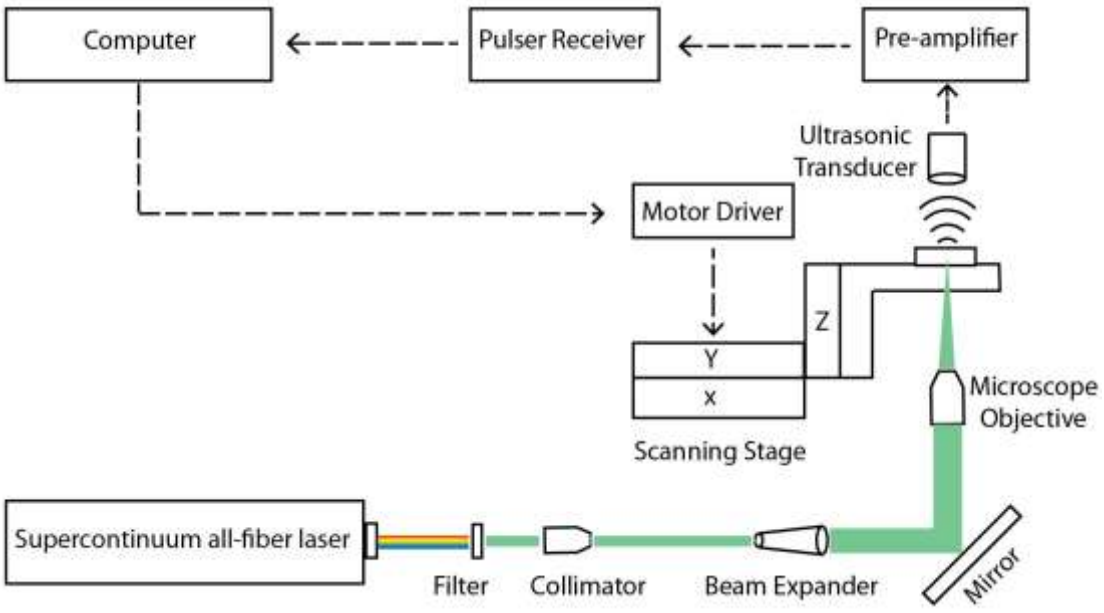
Çok hızlı görüntüleme yapılması için data toplama çok hızlı bir şekilde geçekleşmelidir. Şekil 31'da buna imkan sağlayan 6 Ghz'lik veri toplama hızına sahip veri toplama kartını göstermektedir.



Şekil 33 **Veri toplama kartının fotoğrafı.**

2.2.4.Fotoakustik Sistemi

Şekil 32. lazer sistemi ile entegre edilmiş akusto optik ayarlanabilir filtre, ultrason probu, bilgisayara bağlanmış galvo tarayıcı ve ön amplifikatör ile üretici/alıcıdan oluşan tüm sistemi göstermektedir.



Şekil 34 **Fotoakustik mikroskop sisteminin şematiği.**

2.2.5. Fantom Deneyler

Bu projede, fotoakustik mikroskop sistemi kurulduktan hemen sonra, sistemin çalışma performansını denemek için bazı fantom deneyler yapılmıştır. İlk yapılan deney tek

dalgaboyunda ‘at kılı’ fantom deneyleri, ikincisi ise çok dalgaboyunda ‘farklı renklerde doldurulmuş mikrotüp’ fantomu deneyleridir. Bu deneylerin hepsi lazer fantomun alt tarafından sabit pozisyonda gelecek şekilde ve ultrason prob üst tarafta sabit pozisyonda olacak şekilde iletim modunda gerçekleştirilmiştir.

2.2.5.1. ‘At kılı’ fantom deneyleri

İki tane at kılı artı işaretini oluşturacak şekilde petri kabın içine silikon yardımıyla yapıştırılmıştır. Burada belirtmek gerekir ki, deneylerde kullanılan petri kapları camdır ve ışığı herhangi bir saçılmaya maruz bırakmadan geçirmektedir. Böylelikle iletim modunda çalışmaya olanak sağlamaktadır.

At kılı görüntüsü oluşturulurken fotoakustik mikroskop sistemine ait parametreleri optik kısım parametreleri ve akustik kısım parametreleri olarak ikiye ayırabiliriz. Optik kısım parametreleri olarak lazerin atım süresi 1 ns, atım sıklığı ise 50 kHz değerine ayarlanmıştır. Diğer yandan, 600-1100 nm süpercontinuum aralığından optik filtre kullanılarak 1064 nm dalgaboyu çekilerek tek dalgaboyunda çalışılmıştır. Ayrıca, lazerin ortalama gücü 47 mW ve buna karşılık gelen atım enerjisi de 1 μJ olarak ayarlanmıştır. Akustik kısım parametreleri olarak ise merkez frekansı 3.5 MHz olan ultrason prob kullanılmıştır. Üretici/alıcı 40 dB ve ön-amplifikatör de 28 dB olacak şekilde toplam 68 dB’lik bir kazanç ile ölçümler alınmıştır.

At kılı fantomunun iki boyutlu taraması, bilgisayar ile kontrol edilebilen ve üç boyutta birbirinden bağımsız hareket edebilen motorize tabla ile yapılmıştır. Bu tarama iki boyutta yapıldığı için, z tablası sabit tutularak, x ve y tablaları bir kare matris oluşturacak şekilde hareket ettirilmiş ve görüntü oluşturulmuştur. At kılının 300 μm’lik çapı ve 5-10 μm civarındaki lazer odak büyüklüğü düşünülerek x ve y tablaları 20 μm adım büyüklükleri ile hareket ettirilmiştir. Tüm tarama ve görüntü oluşturma komutları, veri toplama kartı ile motorlu tablanın senkronize olmasını garanti eden MATLAB’da yazılan kod ile maksimum genlik projeksiyonu hesaba katılarak gerçekleştirilmiştir. Her pikselden toplanan sinyaller, 512 ortalama alınarak görüntü oluşturulmuştur (Şekil 33).



(a)(b)

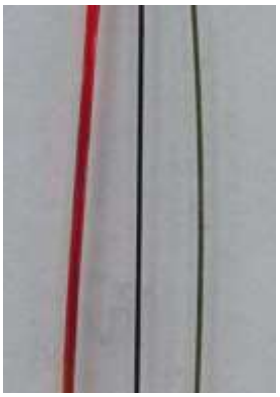
Şekil 35 At kılı fantom görüntüleri a) dijital fotoğraf makinesi ile b) fotoakustik mikroskop ile.

2.2.5.2. 'Farklı renklerde doldurulmuş mikrotüp' fantomu deneyleri

Projenin bir sonraki aşaması olarak, tek dalgaboyunda çalışmak yerine, çok dalgaboyunda çalışılma aşamasına geçilmiştir. Fotoakustik sistemi çok dalgaboyunda test etmek için farklı çaplardaki poliamid tüpler ve farklı renklerdeki Hint boyaları kullanılmıştır.

Aşağıdaki fotoğrafta gösterildiği gibi 127 µm, 250 µm, 500 µm çaplarındaki farklı poliamid tüplersırasıyla yeşil, siyah ve kırmızı renklerdeki boyalarla doldurulmuştur. Dolum işlemi her tüpün çapına uygun şekilde hazırlanan mikroenjeksiyon iğneleri ile mikroskop altında yapılmıştır. Kullanılan üç farklı boyanın da optik soğurma spektrumu birbirlerinden farklı oldukları için, her renk için kendi soğurma piklerine uygun şekilde dalgaboyları, süperkontinyum aralığından filtrelenerek elde edilmiştir.





Şekil 36 Deneylerde kullanılan Bombay Hint boyaları (b) Bu boyalarla doldurulmuş poliamid tüpler; kırmızı (500 µm), siyah (250 µm), yeşil (127 µm). (Funke vd., 2009; Ninni & Martelli, 2010).

Süperkontinyum aralığından kırmızı, siyah ve yeşil renkli boyalarla dolu tüpler için sırasıyla 1064 nm, 650 nm ve 590 nm dalgaboyları bu dalgaboylarına uygun filtrelerle filtrelenmiştir. Şekil 35'te bu filtrelerin fotoğrafları gösterilmektedir.

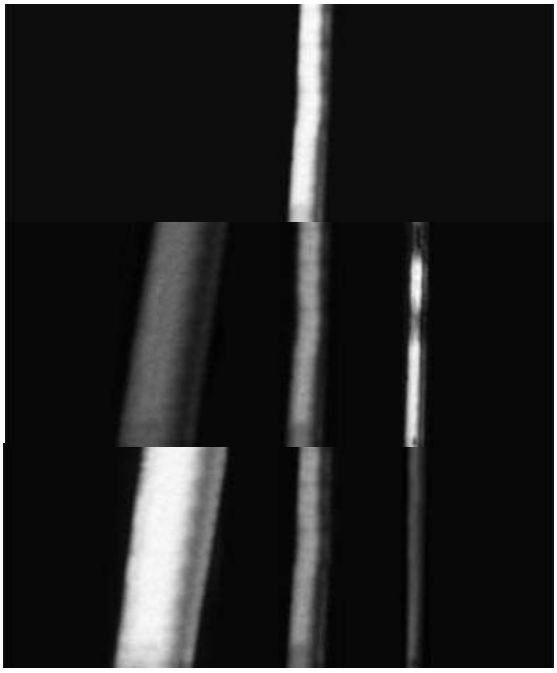


Şekil 37 Spektral ölçümler için kullanılan filtrelerin fotoğrafları.

Tüplerin görüntüleri oluşturulurken fotoakustik mikroskop sistemine ait optik kısım parametreleri, lazerin atım süresi 3 ns, atım sıklığı ise 50 kHz olacak şekilde ayarlanmıştır. Süperkontinyum ışığın ortalama gücü 650 mW, filtrelemeler yapıldıktan sonra ise, 1064 nm filtreden sonra 100 mW, 650 nm filtreden sonra 4 mW ve 590 nm filtreden sonra ise 3 mW değerlerindedir. Burada not etmek gerekir ki, 1064 nm'deki değerin diğerlerine kıyasla daha yüksek olmasının sebebi, lazerin pompa dalga boyunun zaten 1064 nm olmasından dolayıdır. At kılı fantomundan farklı olarak bu fantomlarda 650 nm ve 590 nm ölçümleri için 20x objektif ile odaklama yapılmıştır. Belirtmek gerekirse, bu tercih ışığı daha iyi odaklayabilmek için değil, elimizdeki 20x objektifin bu dalga boylarına daha uygun olmasından dolayıdır. 1064 nm için ise aynı 10x objektif kullanılmıştır. Akustik kısım parametrelerinde ise, bütün boyalar için merkez frekansı 3.5 MHz olan ultrason prob kullanılmıştır. Önceki ölçümlerde olduğu gibi üretici/alıcı 40 dB ve ön-amplifikatör de 28 dB olacak şekilde toplam 68 dB'lik bir kazanç ile ölçümler alınmıştır.

İki boyutlu taraması, motorize tabla ile yapılmıştır. Bu tarama da iki boyutta yapıldığı için, z tablası sabit tutularak, x ve y tablaları bir kare matris oluşturacak şekilde hareket ettirilmiş ve görüntü oluşturulmuştur. Bu deneylerde lazerin odak spot büyüklüğü 5 µm olarak belirlenmiş ve tüplerin farklı çapları hesaba katılarak her taramadaki adım büyüklüğü de 10 µm olarak ayarlanmıştır. Tüm tarama ve görüntü oluşturma komutları, veri toplama kartı ile motorlu tablanın senkronize olmasını garanti eden MATLAB'da yazılan kod ile maksimum genlik

projeksiyonu hesaba katılarak gerçekleştirilmiştir. Her pikselden toplanan sinyaller, 1024 ortalama alınarak görüntü oluşturulmuştur.



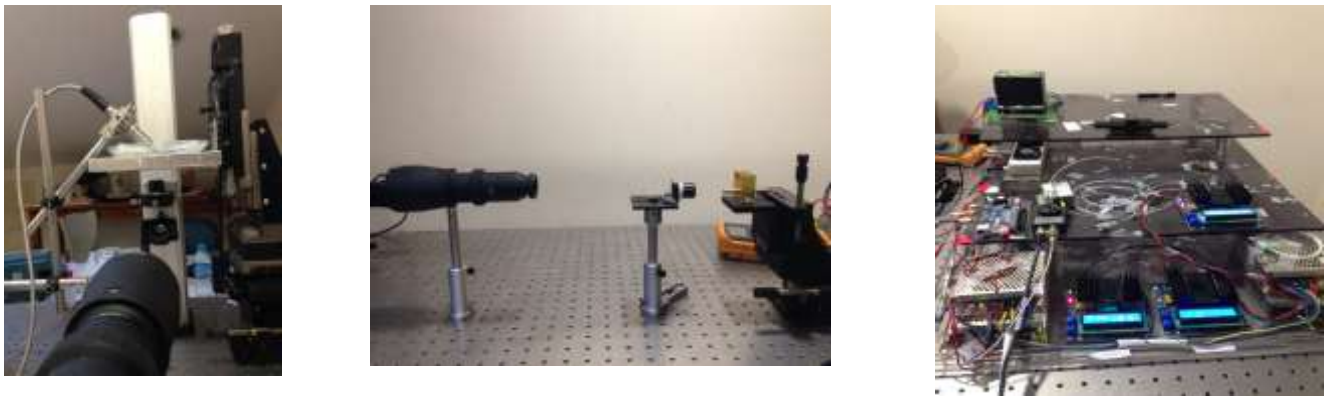
Şekil 38 Farklı renklerde doldurulmuş tüplerin sırasıyla 1064 nm, 650 nm ve 590 nm dalgaboylarındaki fotoakustik görüntüleri.

Resimde görüldüğü gibi farklı renklerde doldurulmuş tüpler için farklı dalgaboylarında elde edilen fotoakustik sinyalin genliği de birbirlerinden farklıdır. Örneğin, 1064 nm dalgaboyunda kırmızı ve yeşil renli tüpler hiç görülmezken, siyah renkli tüp net bir şekilde görülmektedir. Diğer yandan, 650 nm dalgaboyunda kırmızı ve yeşil renkli tüpler de görülebilmişken, siyah tüpün görüntüsündeki kontrastın biraz düştüğü kolaylıkla görülebilmektedir. Bunun sebebi 650 nm dalgaboyundaki soğurma katsayısının 1064 nm dalgaboyundaki soğurma katsayısına kıyasla daha düşük olmasından dolayıdır. Son olarak 590 nm dalgaboyunda kırmızı tüpün kontrastının önemli ölçüde arttığı, siyah tüpün benzer kontrastta göründüğü, kırmızı tüpün ise kontrastının düştüğü görülebilmektedir.

2.2.5.3. USAF 1951 çözünürlük testi

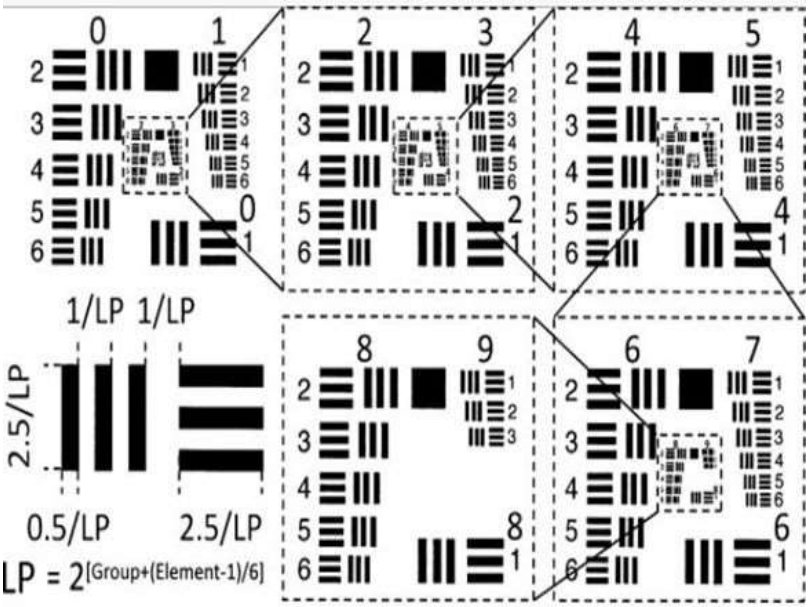
Fotoakustik mikroskop çalışmalarında kurulan deney düzeneği, yüksek çözünürlüklü ve gürültüsüz sonuçlar elde etmede büyük rol oynamaktadır. Öncelikle belirtmek gerekir ki, optik masanın son derece stabil olması gerekmektedir. Mikron hassaslıkta yapılan taramalar düşünüldüğünde stabilitenin önemi daha iyi anlaşılmaktadır. Diğer yandan, optik yönlendirme de en önemli meselelerden biridir. Düzgün yapılmayan optik yönlendirmeler ile iyi sonuçlar elde etmek mümkün değildir.

Bu projede tüm fantom deneyleri için kurulan düzeneğin görüntüsüŞekil 37'deki gibidir. Öncelikle, lazer çıkış fiberi, ışığın optik masa ile paralel ve doğrusal yönlenebilmesi için fiber tutucu ile sabitlenmiştir. Hemen ardından ışık 10x objektif kullanılarak demet çapı sabit kalacak şekilde paralelize edilmiştir. Hemen ardından, paralelize olan ışığın demet çapını büyütmek için demet genişletici (teleskop) kullanılarak, demet çapı son objektifin giriş kısımını doldurabilecek şekilde büyütülmüştür. Burada not etmek gerekir ki, yüksek uzaysal çözünürlük elde etmek için, görüntülenecek hedefe odaklanan ışığın spot büyüklüğü de çok küçük olmalıdır. Bu sebeple, objektifin en iyi odaklayabileceği şekilde yönlendirme yapılmalıdır. Objektiflerin iyi odaklayabilmesi için içine giren ışığın demet çapı ile objektifin kendi giriş çapı aynı büyüklükte olmalıdır. Tüm bu ayarlamalar yapıldıktan sonra, lazerin odak spot büyüklüğü 1 µm seviyesine kadar düşürülmüştür. Bu büyüklük hücre görüntülemek için yeteri kadar iyi bir değerdir.



Şekil 39 Fantom deneyleri için kurulan düzeneğin görüntüsü.

Bu projede geliştirilen fotoakustik mikroskop sisteminin uzaysal çözünürlüğünü test etmek için, USAF 1951 çözünürlük test hedefi kullanılmıştır. Bu çözünürlük hedefi optik sistemlerin çözünürlüğünü belirlemek için yaygın olarak kullanılan kare cam plaka şeklinde bir araçtır. MIL-STD-150A standardı ile belirlenen USAF 1951 test plakası, boyutu azalan bir seri yatay ve dikey çizgi gruplarından oluşmaktadır. Bu çizgiler camın içine gömülmüş krom maddesinden oluşmaktadır. Toplam 7 grup vardır ve her bir grup 6 elementten oluşmaktadır. Çizgi uzunlukları, çizgi eninin beş katıdır. İki çizgi arasındaki boşluk da çizgi enine eşittir. Elementler belirli bir oranda küçülmektedir. Tek sayı olan gruplar sağ tarafta alta doğru, çift sayı olan grupların ise ilk elementi sağ altta ve sonrakiler de sol üstten alta doğru yerleşmektedir. Bu şekilde oluşan iç içe geçmiş katmanlarda da gözle görülemeyen gruplar mevcuttur.



Şekil 40 USAF 1951 test hedefinin grup ve elementlerin konumları.

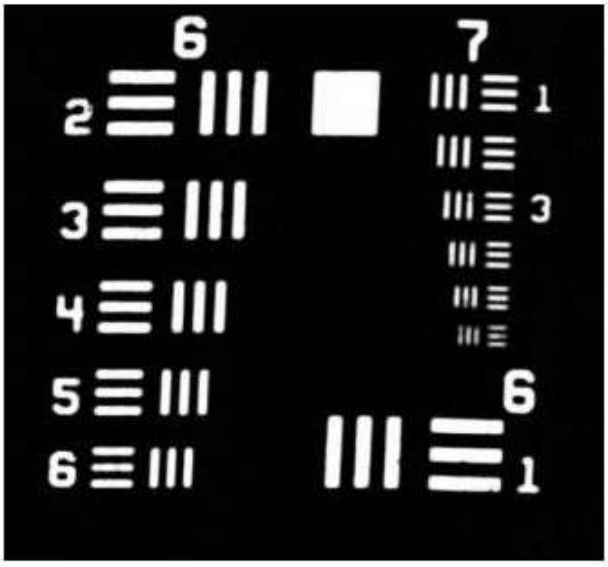
Plaka şeklindeki bu çözünürlük test hedefinin 2 boyutlu taraması yapılarak oluşturulan görüntü sonucunda ayırt edilen grup ve elementlerin temsil ettiği değerlere bakılarak optik sistemlerin çözünürlükleri belirlenmektedir. Aşağıdaki tabloda bu test hedefinin grup ve element numaralarına karşılık gelen uzaysal çözünürlük değerleri gösterilmektedir (Tablo 6).

Tablo 6 USAF 1951 test hedefinin grup ve element numaralarına karşılık gelen çözünürlük değerleri

Width of 1 line in micrometers in USAF Resolving Power Test Target 1951												
Group Number												
Element	-2	-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	2000.00	1000.00	500.00	250.00	125.00	62.50	31.25	15.63	7.81	3.91	1.95	0.98
2	1785.71	891.27	446.43	223.21	111.36	55.68	27.86	13.89	6.96	3.47	1.74	0.87
3	1587.30	793.65	396.83	198.41	99.21	49.50	24.80	12.41	6.20	3.11	1.55	0.78
4	1416.43	707.21	354.61	176.68	88.34	44.25	22.10	11.04	5.52	2.76	1.38	-----
5	1259.45	630.52	314.47	157.73	78.74	39.37	19.69	9.84	4.90	2.46	1.23	-----
6	1123.60	561.17	280.90	140.45	70.13	34.97	17.54	8.77	4.39	2.19	1.10	-----

Bu projede hedeflenen çözünürlük değeri bir kaç mikron mertebesinde olduğundan dolayı, test hedefinin 6 ve 7. Gruplarına odaklanarak sistemin çözünürlüğünü test etmeye çalıştık.

Aşağıdaki resimde elde edilen çözünürlük test sonuçları gösterilmektedir. Bu test hedefinin en yüksek çözünürlük değerine karşılık gelen grup-element numarası olan 6. grup 7. element çizgileri başarılı bir şekilde ayırt edilebilmiştir. (Şekil 39) Yukarıdaki tablodan da görülebileceği gibi bu grup ve element numarasına karşılık gelen çözünürlük değeri 2.19 μm'dir.



Şekil 41 Fotoakustik mikroskop sistemi ile elde edilen USAF 1951 çözünürlük test hedefi görüntüsü.

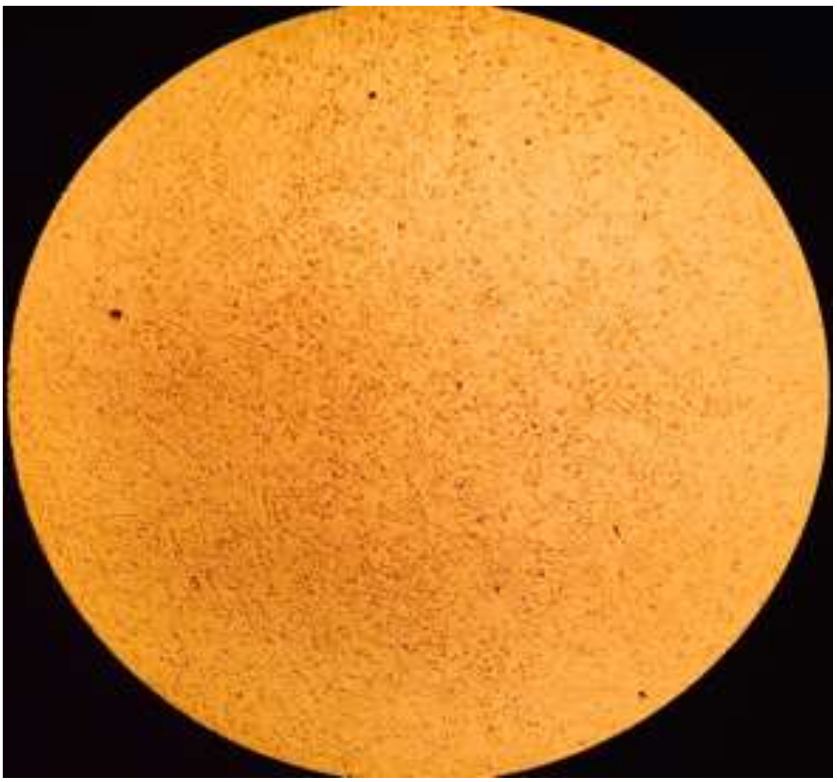
Bu test hedefinin görüntüsü oluşturulurken fotoakustik mikroskop sistemine ait parametreleri optik kısım parametreleri ve akustik kısım parametreleri olarak ikiye ayırabiliriz. Optik kısım parametreleri olarak lazerin atım süresi 3 ns, atım sıklığı ise 50 kHz değerine ayarlanmıştır. Diğer yandan, 600-1100 nm süpercontinuum aralığından optik filtre kullanılarak 1064 nm dalgaboyu çekilerek tek dalgaboyunda çalışılmıştır. Burada belirtmek gerekir ki, 1064 nm dalgaboyu, USAF 1951 test hedefinin içindeki madde olan kromun soğurma spektrumuna uygun olduğu için tercih edilmiştir. Ayrıca, lazerin ortalama gücü 3 mW ve buna karşılık gelen atım enerjisi de 60 nJ olarak ayarlanmıştır. Akustik kısım parametreleri olarak ise merkez frekansı 10 MHz olan ultrason prob kullanılmıştır. Üretici/alıcı 40 dB ve ön-amplifikatör de 28 dB olacak şekilde toplam 68 dB'lik bir kazanç ile ölçümler alınmıştır.

Test hedefinin iki boyutlu taraması, bilgisayar ile kontrol edilebilen ve üç boyutta birbirinden bağımsız hareket edebilen motorize tabla ile yapılmıştır. Bu tarama iki boyutta yapıldığı için, z tablası sabit tutularak, x ve y tablaları bir kare matris oluşturacak şekilde hareket ettirilmiş ve görüntü oluşturulmuştur. 6. grup 7. element in boyutları düşünülerek x ve y tablaları 1 μm adım büyüklüğü ile hareket ettirilmiş ve daha önce belirtilen yaklaşık 1 μm odak büyüklüğü de hesaba katıldığında, toplanan her sinyal hedef üzerindeki sadece bir çizgi üzerindeki bir

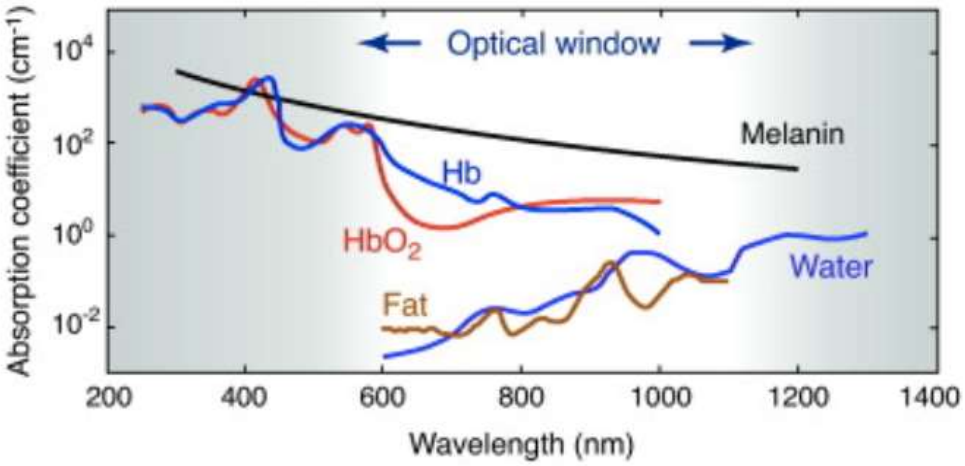
pikselden gelecek şekilde ayarlanmıştır. Tüm tarama ve görüntü oluşturma komutları, veri toplama kartı ile motorlu tablanın senkronize olmasını garanti eden MATLAB'da yazılan kod ile maksimum genlik projeksiyonu hesaba katılarak gerçekleştirilmiştir. Her pikselden toplanan sinyaller, 512 ortalama alınarak görüntü oluşturulmuştur.

Hücre Deneyleri

Hücre deneylerimiz için çeşitli yöntemler geliştirilmeye çalışıldı. İlk hücre deneyi için MeWo deri kanseri hücresinden fotoakustik sinyal saptanmaya çalışıldı (Şekil 40). MeWo hücresi kötü huylu melonom hücresi olarak da bilinmektedir. Melonom hücreleri içermiş olduğu melanin pigmentlerinden dolayı fotoakustik mikroskopla görüntülenmesi mümkündür. Melaninin soğurma spektrumu oldukça geniş olduğundan MeWo hücreleri söz konusu olduğunda birden fazla dalga boyunda çalışmak mümkün olabilir. Fakat oluşan fotoakustik sinyali ayırt edebilmek için ultrason sisteminde bahsettiğimiz preamplifikatörün yetersiz kaldığı gerçeği sonucuna vardık. Literatürde yapılan çalışmalar da bu savımızı desteklemektedir. Örneğin 800 nm dalga boyu çıkışlı bir lazer kullanılanarak saptanan fotoakustik sinyalin 1064 nm dalga boylu çıkışlı bir lazer kullanıldığında saptanan fotoakustik sinyalden daha yüksek olması gerektiğini melaninin optik soğurma spekturumuna bakılarak yorumlanabilir.



Şekil 42 Petri kabın içinde MeWo deri kanseri hücreleri.



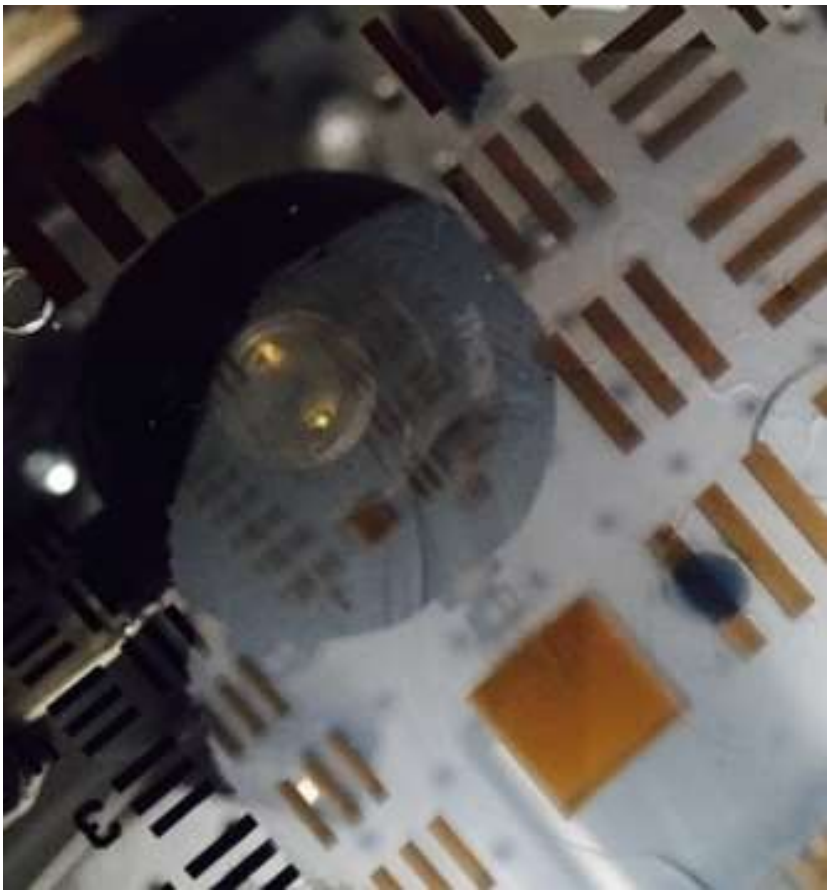
Şekil 43 Melanin optik soğurma spekturmu.

Fotoakustik sinyal saptamak için ışığı görüntülenecek veya fotoakustik sinyal saptanacak olan hücreye odaklamak oldukça önemlidir. Işığı doğrudan hücreye odaklamak oldukça zordur. Odak noktasında olup olunmadığı test etmek gereklidir. Bu yüzden çeşitli fantomlar üzerinde düşünülmeye çalışıldı. 'At kılı' kullanılarak odak noktasını belirlemek kolay olduğundan hem hücreleri hem de at kılını içeren fantom yapıldı. Aşağıda şekilde görüldüğü gibi petri kabına ayrı ayrı küçük havuzlar yapılarak bir böülüme 'at kılı' fantomu diğer bölümüne de hücre fantomu oluşturulmuştur. Bu fantomları mikroskop slaytları yardımıyla oluşturduğumuzdan akustik mistmach problemi ile karşılaştık.



Şekil 44 At kılı ve MeWo hücre fantomu.

Karşılaşılan bu sorunu çözmek için hücreleri çözünürlüğü belirlemek için kullanılan ve fotoakustik sistemde odak noktasının bulunmasında hücrelere kıyasla çok kolay bulunabilen USAF 1951 test hedefinin üzerine biyoloji ve genetik mühendisliğinde kullanılan tekniklerle direk fiks edildi. (Şekil 3) Bu sayede odak noktası bulmada başarılı olunmuştur. Daha iyi bir preamplifikatöre sahip okunulduğunda hücre deneylerimizin devamlılığı söz konusu olacaktır.



Şekil 45 USAF 1951 test hedefin üzerindeki MeWo hücreleri

Örneğin diğer bir çalışmamız ise MCF7 göğüs hücresi için trypan mavi boyama maddesinin kullanılarak ihmal edilemeyecek bir ölçüde fotoakustik sinyal saptamak duruma getirmek olacaktır. Bir sonraki çalışmalarımızda çeşitli hücrelerin görüntüsünü elde etmek için uygun olan kontrast maddelerinin kullanılması planlanıyor. Lazerimizin birden fazla dalga boylu çıkışlı olduğundan ve uygulamaya göre bazı önemli parametrelerinin değişmesi söz konusu olduğundan birçok hücre kültüründen fotoakustik sinyal elde etmek mümkün olacaktır. Bu sayede hücreleri karakterize etmek mümkün kılınabilir. Literatürde yaygın olan hücre kültürleriyle ilgili çalışmalar mevcuttur. Önemli olan bu çalışmaların artırılıp daha çok hücre çeşitlerini karakterize etmek olacaktır. Görüntülemenin yanı sıra bazen hücrelerden çıkan fotoakustik sinyalin büyüklüğünün farklılıkları kanserli hücreleri karakterize etmekte olanak sağlamaktadır. Örneğin PAM'la MMP görüntülemesi yapabilmek için MMPSense-680

flüoresans pro kullanacağız. MMPSense-680, MMP-2-pozitif (HT-180, insan fibrosarcoma) ve MMP-2-negatif (BT20, adenokarsinoma) hücrelerini birbirinden ayırabilmektedir [43]. MMPSense-680 MMP enzim aktivitesinin olduğu bölgede aktive olmakta ve bu sayede flüoresans ışıma yapmaktadır. Ama biz MMPSense-680'i görmek için PAM sistemini kullanacağız. MMPSense-680 MMP aktivitesinin olduğu bölgede aktive olmaktadır. Aktive olmuş ve aktive olmamış MMPSense-680 extinction katsayıları, dolayısıyla ışığı soğurma özellikleri ve dolayısıyla fotoakustik sinyalleri farklı olacaktır. Literatürde bu savımızı destekleyen bir çalışmayı referans olarak sunuyoruz [44]. Kanser çalışmalarında bu teknik henüz uygulanmamıştır Örneğin PAM'la MMP görüntülemesi yapabilmek için MMPSense-680 flüoresans pro kullanacağız. MMPSense-680, MMP-2-pozitif (HT-180, insan fibrosarcoma) ve MMP-2-negatif (BT20, adenokarsinoma) hücrelerini birbirinden ayırabilmektedir [43]. MMPSense-680 MMP enzim aktivitesinin olduğu bölgede aktive olmakta ve bu sayede flüoresans ışıma yapmaktadır. Ama biz MMPSense-680'i görmek için PAM sistemini kullanacağız. MMPSense-680 MMP aktivitesinin olduğu bölgede aktive olmaktadır. Aktive olmuş ve aktive olmamış MMPSense-680 extinction katsayıları, dolayısıyla ışığı soğurma özellikleri ve dolayısıyla fotoakustik sinyalleri farklı olacaktır. Literatürde bu savımızı destekleyen bir çalışmayı referans olarak sunuyoruz [44]. Kanser çalışmalarında bu teknik henüz uygulanmamıştır.

Bu projedeki ana amaçlardan biri de MMP modellemesidir. Matriks metalloproteinazlar (MMP), ekstrasellüler matriks (ECM) ile bazal membran bileşenlerini parçalama yeteneğine sahip olan ve yaklaşık 28 enzimden oluşan çinko bağımlı bir endopeptidaz ailesidir. Bu enzimler dokunun yeniden yapılanması, morfogenezis ve yara iyileşmesi gibi fizyolojik durumlarda önemli bir rol oynadıkları gibi tümör hücresi invazyonu, anjiogenez ve metastaz gibi patolojik olaylarda da rol alırlar.

MMPler, tümör dokusunun büyümesini ve tümör hücrelerinin yayılımını önlemek için primer bir bariyer olarak görev yapan ekstrasellüler matriksi parçalayarak kanserin invazyon ve metastaz yapmasını kolaylaştırırlar. MMPlerin; anjiyogenez, apopitozun engellenmesi, metastaz ve invazyon olaylarıyla kanser gelişimine katkıda bulundukların yapılan çalışmalar ile bilinmektedir. Fakat son zamanlarda yapılan araştırmalar, MMPlerin tümör oluşumunu desteklediği görüşüne aksi yönde sonuçlar vermiştir.

MMP türlerinden MMP-1 ve MMP-8 kullanılarak yapılan bir klinik çalışma, bu MMPlerin ekspresyonunun konvektif taşınımı ve tümör mikroçevresi içerisinde ilaç dağılımını artırdığını göstermiştir. Bu yapılan çalışma temel alınarak, MMP aktivasyonunun ilaç iletimine etkisini gözlemlemek için matematiksel bir model geliştirilmiştir. Modeldeki denklemler, uygun sınır

koşullarıyla birlikte interstisyel ve transvasküler sıvı taşınım ilkeleri ve korunum yasalarından oluşmaktadır.

Modelde interstisyel sıvı akış hızını $\mathbf{v_F}$ tanımlamak için kütle denkliği eşitliği kullanılmıştır:

$$\nabla.(\phi_F\,\mathbf{v_F}) = \Gamma_{Fb} - \Gamma_{Fl} \qquad (1)$$

Burada ϕ_F interstisyel sıvının hacimsel oranını, Γ_{Fb} kan damarlarından interstisyel boşluğa gelen, Γ_{Fl} ise interstisyel boşluktan lenf damarlarına giden sıvı miktarını belirtmektedir.

Transvasküler sıvı akışını tanımlamak için Starling kanunu kullanılmıştır:

$$\Gamma_{Fb} = \lambda_{Fb}\,[P_o - P - \sigma(\pi_c - \pi_i)] \qquad (2)$$

$$\Gamma_{Fl} = \lambda_{Fl}\,P \qquad (3)$$

λ_{Fl} ve λ_{Fb} , sırasıyla lenf ve kan damarlarının hidrolik iletkenliklerini, P_o damar içi sıvının basıncını, P interstisyel sıvının basıncını, σ ozmotik yansıma katsayısını, π_c ve π_i ise sırasıyla kılcal damar ve interstisyel ozmotik basınçlarını belirtmektedir.

Doku içindeki interstisyel sıvının akışı Darcy Kanunu kullanılarak tanımlanmıştır:

$$q_F = -K\,\nabla P \qquad (4)$$

q_F interstisyel sıvı akışını, K ise dokunun hidrolik iletkenliğini belirtmektedir. İnterstisyel sıvı akışı ile sıvı hızı arasında aşağıdaki gibi bir ilişki bulunmaktadır:

$$q_F = \phi_F\,\mathbf{v_F} \qquad (5)$$

(5) eşitliğinin (1),(2) ve (3) ile birleştirilmesiyle;

$$\nabla.(-K\,\nabla P) = \lambda_{Fb}\,[P_o - P - \sigma(\pi_c - \pi_i)] - \lambda_{Fl}\,P \qquad (6)$$ eşitliği elde edilir.

İlaç moleküllerinin taşınımı, konveksiyon-difüzyon-absorbsiyon eşitliği kullanılarak tanımlanmaktadır:

$$\frac{\partial c}{\partial t} + \nabla.(-D_c\,\nabla c) + \nabla.(q_F\,c\,k_E) = \lambda_{Fb}\,(1-\sigma)c_P + \lambda_d\,(c_p - c) - \lambda_{Fl}\,c - \lambda_r\,c \qquad (7)$$

Eşitlikteki c_p ve c sırasıyla, plazma ve dokudaki ilaç konsantrasyonlarını, D_c dokunun difüzyon katsayısını, k_E transvasküler konveksiyonda gecikme katsayısını, λ_d transvasküler difüzyon katsayısını ve λ_r ise ilaç moleküllerinin bozunma oranını belirtmektedir. (7) eşitliğinin sağ tarafı, ilaç moleküllerinin konveksiyon ve difüzyon yoluyla taşınımı, lenf damarları tarafından tutulumu ve ilaç moleküllerinin biyolojik bozunumu göz önüne alınarak yazılmıştır.

İlaç enjekte edildikten sonraki plazma konsantrasyonu, $c_P(t) = c_0\,e^{-(log2)t/t_{1/2}}$, $t \geq 0$ şeklinde ifade edilmiştir. MMP aktivasyonu göz önüne alınarak, konveksiyon-difüzyon-absorbsiyon denklemi aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır:

$$\frac{\partial M}{\partial t} + \nabla.(-D_M \nabla M) = \lambda_{Md}(M_P - M) + \lambda_{Mn}\, n - \lambda_{Mr}\, M$$

Eşitlikteki M ve M_P sırasıyla doku ve plazmadaki MMP konsantrasyonunu, D_M dokudaki MMP moleküllerinin difüzyon oranını, n ortalama tümör hücresi yoğunluğunu, λ_{Mn} tümör hücrelerinin MMP moleküllerini üretim hızını, λ_{Md} MMP molekülleri için transvasküler difüzyon katsayısını ve λ_{Mr} ise MMP moleküllerinin bozunma oranını belirtmektedir.

Tümör sınır koşulları belirlenirken, tümörün küresel simetrik olduğu kabul edilmiştir. Tümör ve normal doku sınırında, interstisyel sıvı ve MMP için kütle süreklilik bağıntıları aşağıdaki şekilde tanımlanmıştır:

$$\left[-K\frac{\partial P}{\partial r}\right]_{r=Ro} = 0$$

$$\left[-D\frac{\partial c}{\partial r} - K\frac{\partial P}{\partial r}(1-\sigma)c\right]_{r=Ro} = 0$$

$$\left[\frac{\partial M}{\partial r}\right]_{r=Ro} = 0 \qquad (R_o = \text{tümör yarıçapı})$$

Tümör merkezinde ve tümörden uzak alanda, simetrik sınır koşulları geçerlidir:

$$\left[\frac{\partial P}{\partial r}\right]_{r=0, r=R^{\infty}} = 0$$

$$\left[\frac{\partial c}{\partial r}\right]_{r=0, r=R^{\infty}} = 0$$

$$\left[\frac{\partial M}{\partial r}\right]_{r=0, r=R^{\infty}} = 0$$

3.SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Fotoakustik sinyal sabit atım enerjileri için atım süresinin azalan bir fonksiyonudur. Belirli bir dalga boyu için, başka bir deyişle sabit soğurma katsayısı için, atım enerjisi sabit kalsa bile, atım süresi arttıkça fotoakustik sinyalin genliği azalmaktadır. Buna ek olarak, atım süresi akustik sıkışma süresi veya termal sıkışma süresinden daha da büyük değerlerde olursa, fotoakustik denklem geçerliliğini kaybetmektedir. Tam tersi olarak, kısa atım süreleri daha büyük genlikli fotoakustik dalgalar sağlamaktadır. Bu durum atım süresinin ışığın ancak doğrusal olarak soğrulmasına izin verdiği durumlar için geçerlidir. Piko saniye veya femto saniye seviyelerindeki atım süreleri, termal ve fotoakustik etkilerin ortadan kalkmasına ve ışığın şiddetine bağlı doğrusal olmayan lazer-doku etkileşimlerinin oluşmasına sebebiyet vermektedir. Doğrusal olmayan bir başka etki ise, iki fotonlu soğurmanın dokuların zarar görmesine sebep olmasıdır. Kısa atım süreleri yüksek frekanslı ses dalgaları üretmekte

olduğundan, akustik sönümlenmenin de hesaba katılması gerekmektedir. Akustik etkiler de dikkate alındığında görülmektedir ki, etkin ve yüksek genlikli bir fotoakustik sinyal ancak kısa atım süreli lazerlerle mümkündür.

Lazer demetlerine maruz kalan küresel objelerin yarıçaplarının bir oranı olarak, lazer demet genişliğinin büyümesine rağmen normalize sinyaldeki değişim hafif bir şekilde azalmaktadır. Çünkü böyle durumlarda radyal profil çok keskin olmakta ve Dirac delta fonksiyonu gibi davranmaktadır. Öyle ki, atım süresi ve demet genişliği gibi lazer parametreleri sinyal üzerindeki etkilerini kaybetmeye başlamaktadırlar.

Lazerin ortalama gücü sabit kalırken, atım tekrar sıklığının azalması enerjinin yani sinyalin genliğinin artmasıyla sonuçlanmaktadır. Çünkü fotoakustik dalga fluans ile diğer bir deyişle lazerin enerjisi ile orantılıdır. Diğer yandan hesaba katılması gereken bir diğer etki de atım tekrar sıklığının azalmasının veri toplama süresinin yavaşlamasına sebep olmasıdır. Ayrıca, zayıf kontrastlı görüntüler elde edildiğinde, kontrast-gürültü oranını iyileştirmek için yüksek atım tekrar sıklığı kullanmak da iyi bir yoldur.

Fotoakustik sinyal genliği yerel fluans ve görüntülenecek maddenin ışık soğurma katsayısı ile doğru orantılıdır. Bu sebeple, farklı dalga boylarında ölçüm yapmak kendi karakteristik soğurma spektralarına bağlı olarak farklı soğuruculardan elde edilen sinyallerin spektral ayrımının yapılmasına ve fonksiyonel görüntülemeye olanak sağlamaktadır.

Piyasadaki mevcut lazerlerin hepsi belirli karakteristik özelliklere sahiplerdir. Bazıları ayarlanabilir dalga boyu ve enerji özelliğine sahip olsa da, atım sıklığı ve atım enerjisi bu lazerlerde genellikle sabittir. Bu tür kısıtlamaların doğal bir sonucu olarak, piyasada bu lazerleri kullanıcılar kendi çok özel uygulamalarını hesaba katarak seçmektedirler. Örneğin, melanoma hücre ölçümleri için uygun olan lazer 1064 nm dalga boyunda olmalıdır fakat aynı zamanda bu lazer hemoglobin görüntülemek için uygun değildir çünkü hemoglobinin ışık soğurma katsayısının pik değeri daha düşük dalga boyu değerlerindedir. Diğer yandan, piyasada bulunan mevcut dalga boyu ayarlanabilir lazerler ise düşük atım tekrar sıklığına sahip oldukları için gerçek zamanlı görüntülemeler için uygun değillerdir. Atım tekrar sıklığı değiştirilebilen lazerler sadece, sabit dalga boyunda ışık üreten ve bu sebeple spektral ölçümler için uygun olmayan fiber lazerlerdir. Sabit enerji değerleri, mikro damarsal ya da hücresel görüntüleme gerçekleştirmeyi zorlaştırmaktadır. Bu projede, özellikle fotoakustik görüntüleme için tasarlanmış olan lazer, 600 nm ile 1100 nm arasında dalga boyu, 2nJ ile 10 mikroJ arasında enerji, 50 kHz ile 3 MHz arasında atım tekrar sıklığı seçme özgürlüğü vermektedir. Diğer bir deyişle, tek bir lazer ile birçok farklı uygulamayı gerçekleştirebilme özgürlüğü vermektedir.

Proje kapsamında geliştirdiğimiz mikroskopun uzaysal çözünürlüğü 2.5 mikrondur. Bu projede

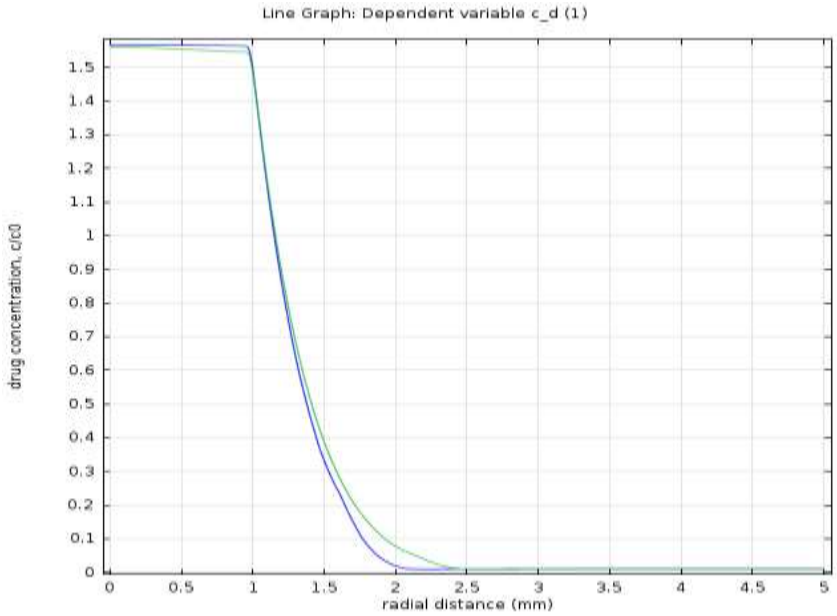
belirtilen 15 mikronluk çözünürlük hedefinin çok çok altındadır. Bundan dolayı proje bu bağlamda başarılıdır. Ayrıca hücre kültürleriyle deneyler yapmaya başlanmıştır. Bu denyler halen devam etmektedir.

Fotoakustik mikroskop sistemler transmisyon (transmission) veya yansıma (reflection) modda çalışabilmektedir. Resim 1. (a)'da gösterildiği gibi lazer ışığı ultrason alıcıyla aynı taraftaysa buna yansıma modu denmektedir. Arada hedef olacak şekilde lazer ışığı ve ultrason alıcı karşılıklı yerleştirilirse buna da transmisyon modu denmektedir.

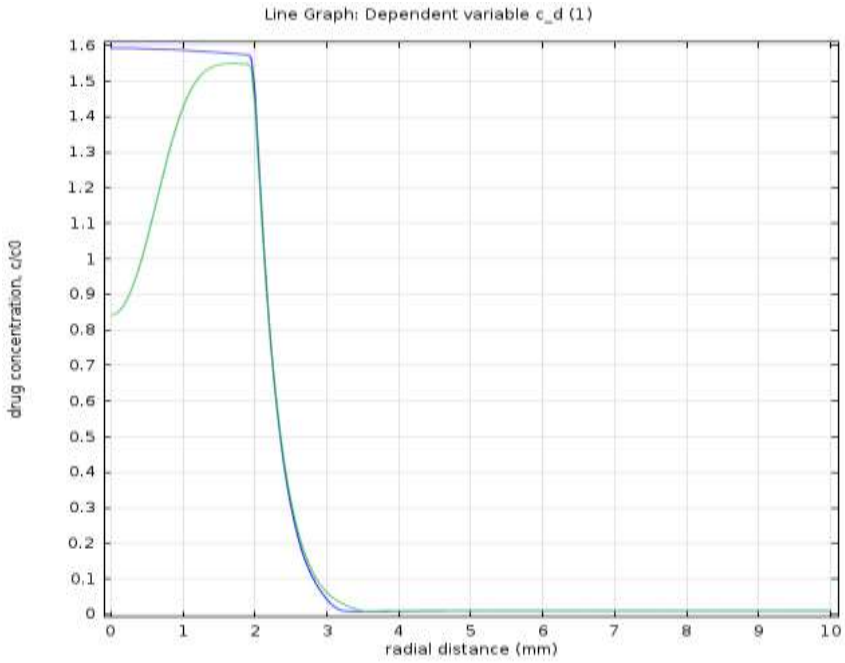
İnşa ettiğimiz FAM iki modda da çalışabilmektedir. Ama hücre deneyleri yapacağımız için sistemimiz şu anda transmisyon modunda çalışmaktadır. Ama saç, fiber veya kan damarı gibi kalın örneklerde yansıma modu daha avantajlıdır.

MMP ile ilintili sonuçlar

Simulasyon sonuçları tümör yarıçapına bağlı olarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlara göre küçük boyutlu tümörlerde ilaç konsantrasyonu R_0 = 1 mm ve R_0 = 2 mm için oldukça farklılık göstermektedir. R_0 = 1 mm olan tümör için ilacın dağılımı, tedavi edilmemiş tümör durumuyla neredeyse aynıdır (Şekil-1). (Mavi ve yeşil çizgiler sırasıyla tedavi uygulanan ve tedavi uygulanmayan durumları belirtmektedir). Fakat R_0 = 2 mm için, MMP aktivasyonunun olduğu durumda, ilaç konsantrasyonu tümör merkezinde daha fazladır (Şekil-2).

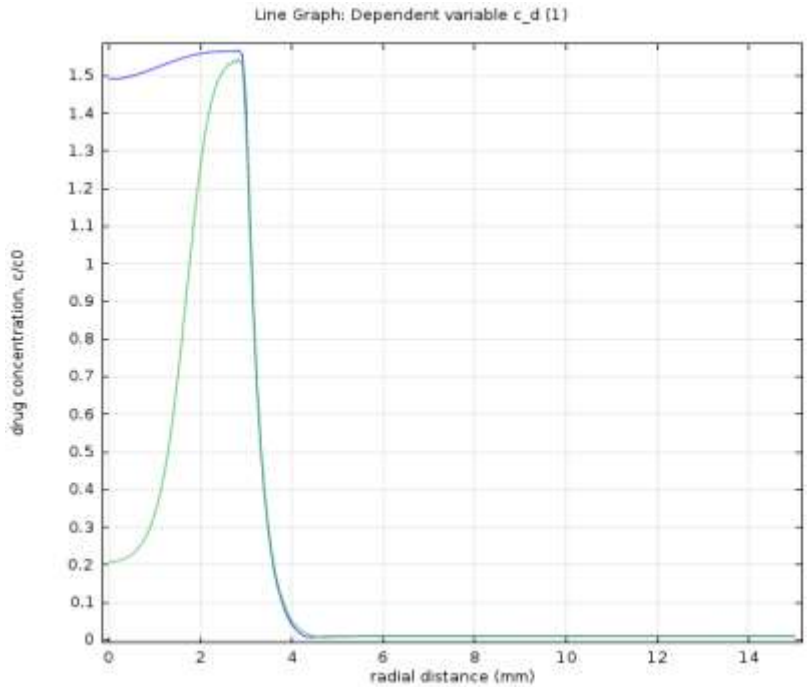


Şekil 46 R0 = 1 mm için ilaç konsantrasyonu

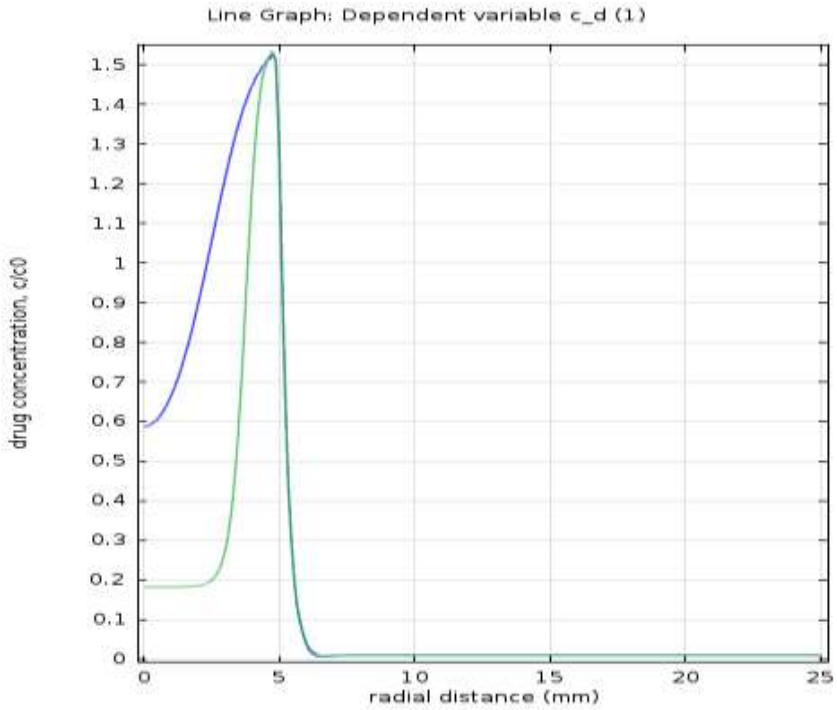


Şekil 47 R0 = 2 mm için ilaç konsantrasyonu

Orta boyuttaki tümörler için $3 \leq R_o \leq 5$ mm, tümör merkezindeki ilaç konsantrasyonunda küçük tümörlere kıyasla düşüş olmasına rağmen, elde edilen sonuçlar MMP aktivasyonunun olduğu durumlarda hidrolik iletkenliğin arttığını göstermektedir (Şekil-46 ve Şekil-47).

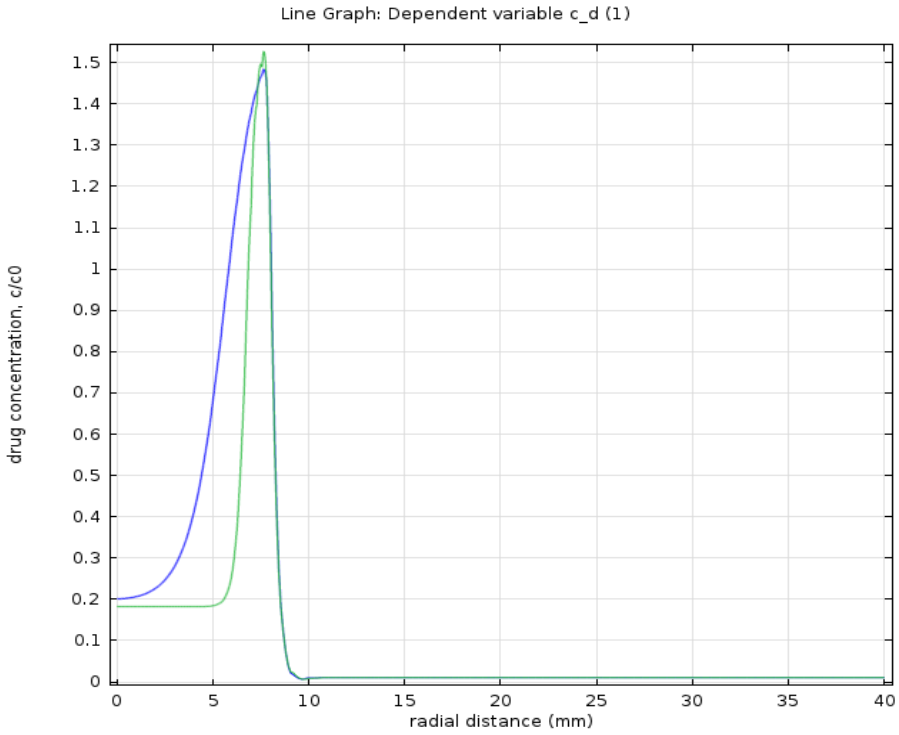


Şekil 48 R0 = 3 mm için ilaç konsantrasyonu

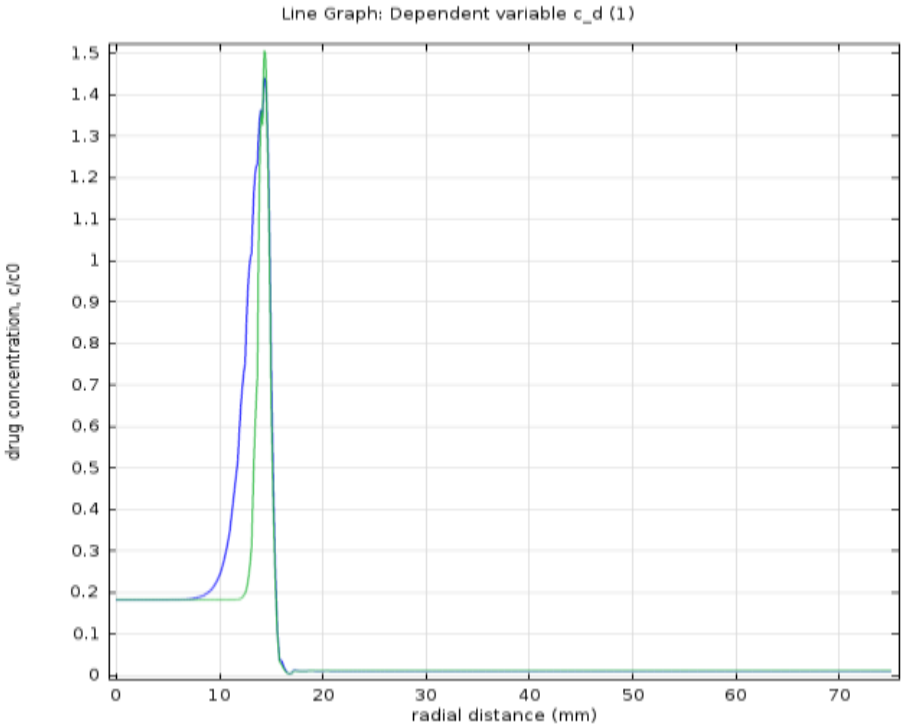


Şekil 49 R0 = 5 mm için ilaç konsantrasyonu

Büyük boyutlu tümörlerde $8 \leq R_o \leq 15$ mm, ilaç konsantrasyonu üniform olarak dağılmıştır ve tümörün sınırlarında pik değere ulaşmıştır. Simulasyon sonuçlarına göre ilacın davranışı, MMP aktivasyonunun başarılı olduğunu göstermektedir (Şekil-48 ve Şekil-49).



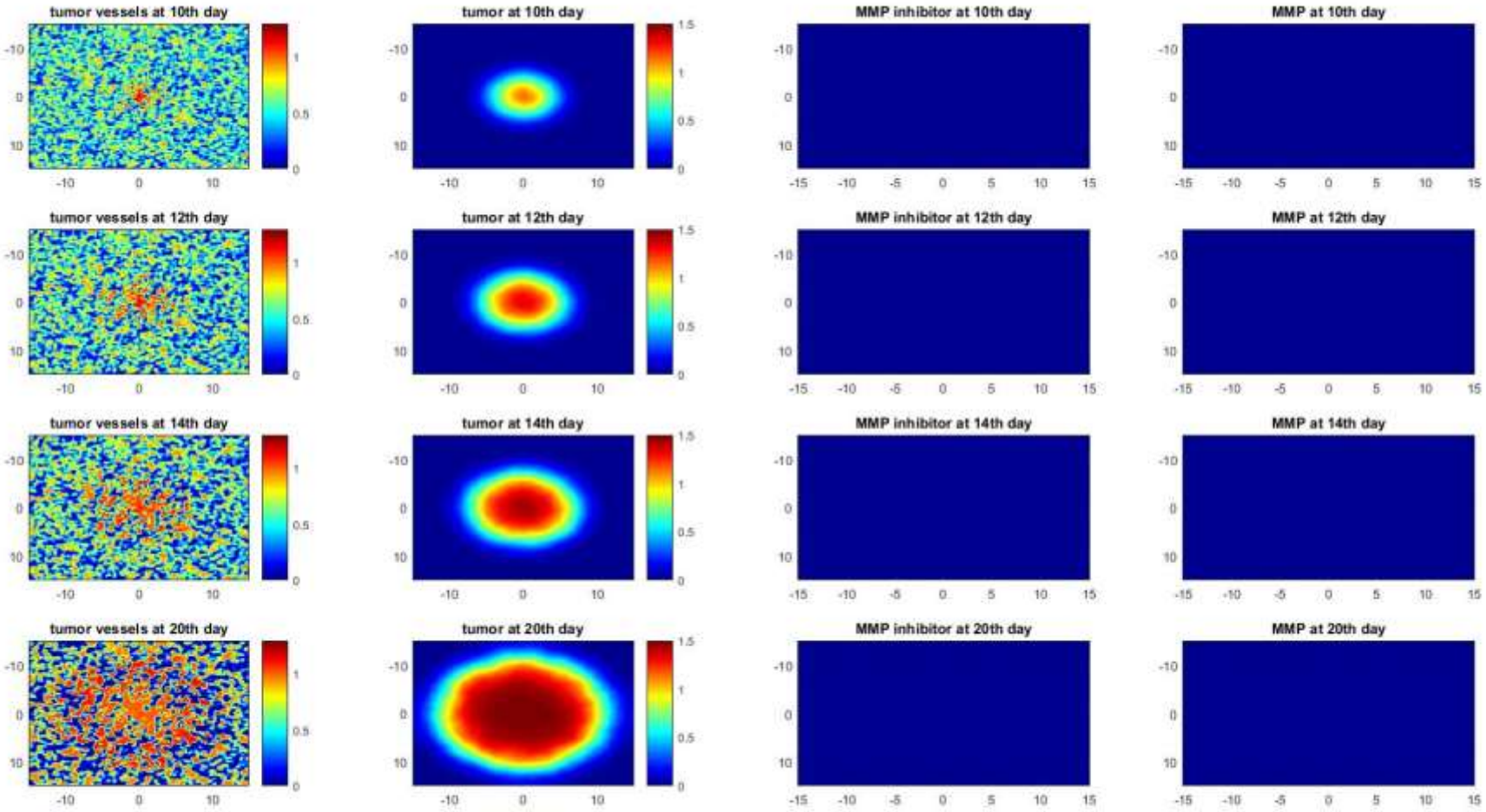
Şekil 50 R0 = 8 mm için ilaç konsantrasyonu



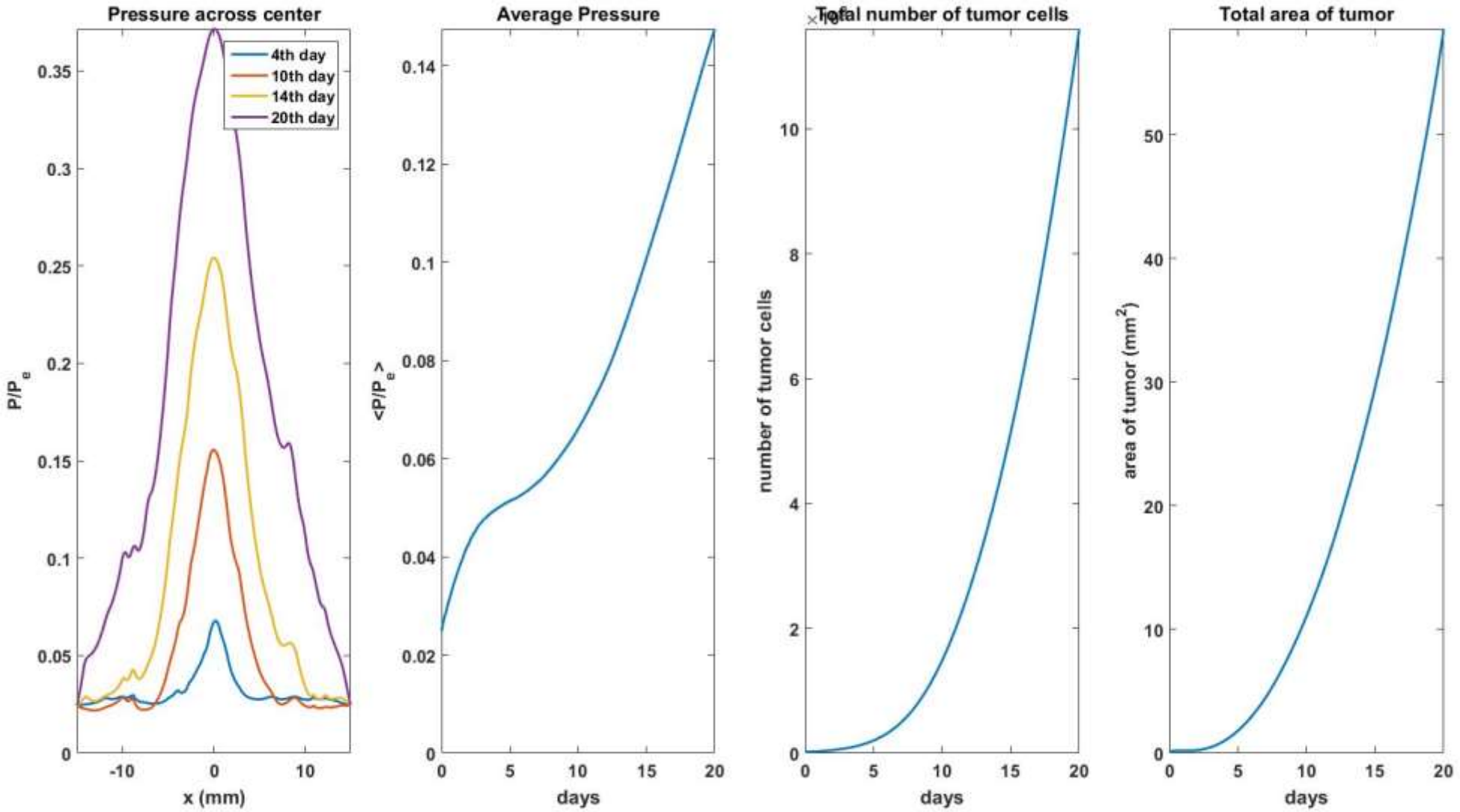
Şekil 51 R0 = 15 mm için ilaç konsantrasyonu

MMP enziminin tümör büyümesi ve sıvı basıncı üzerindeki etkilerini anlamak için sistematik çalışmalar yaptık. Bunları da yakın zamanda yayınlayacağız.

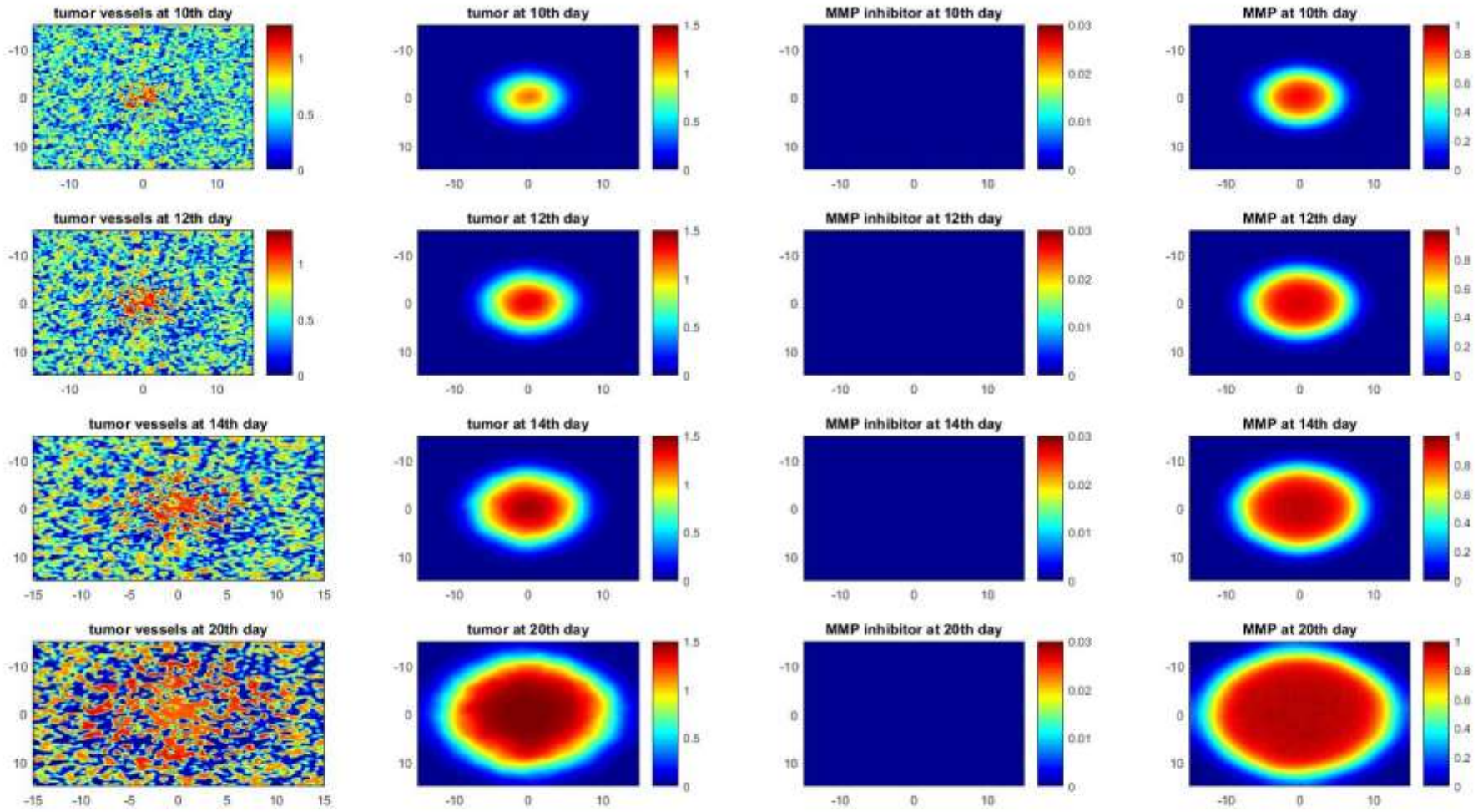
Simülasyon sonuçlarının, daha önce yapılan deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçlarla uyumlu olduğu gözlenmekte olup; MMP aktivasyonunun hidrolik iletkenliği arttırarak tümör mikroçevresinin değişimini etkilediği görülmüştür.



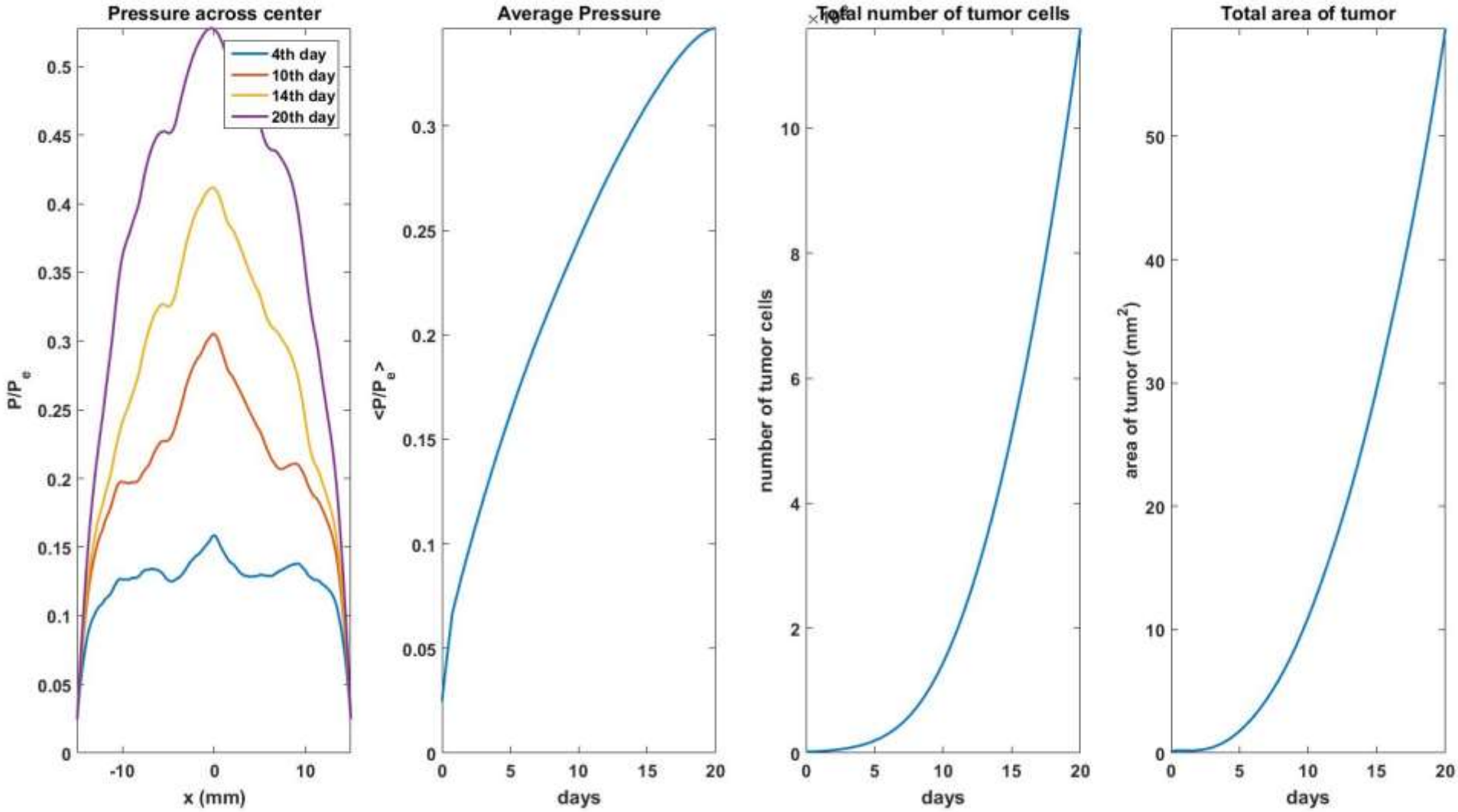
Şekil 52 MMPsiz ortamda tümör büyümesi ve basınç



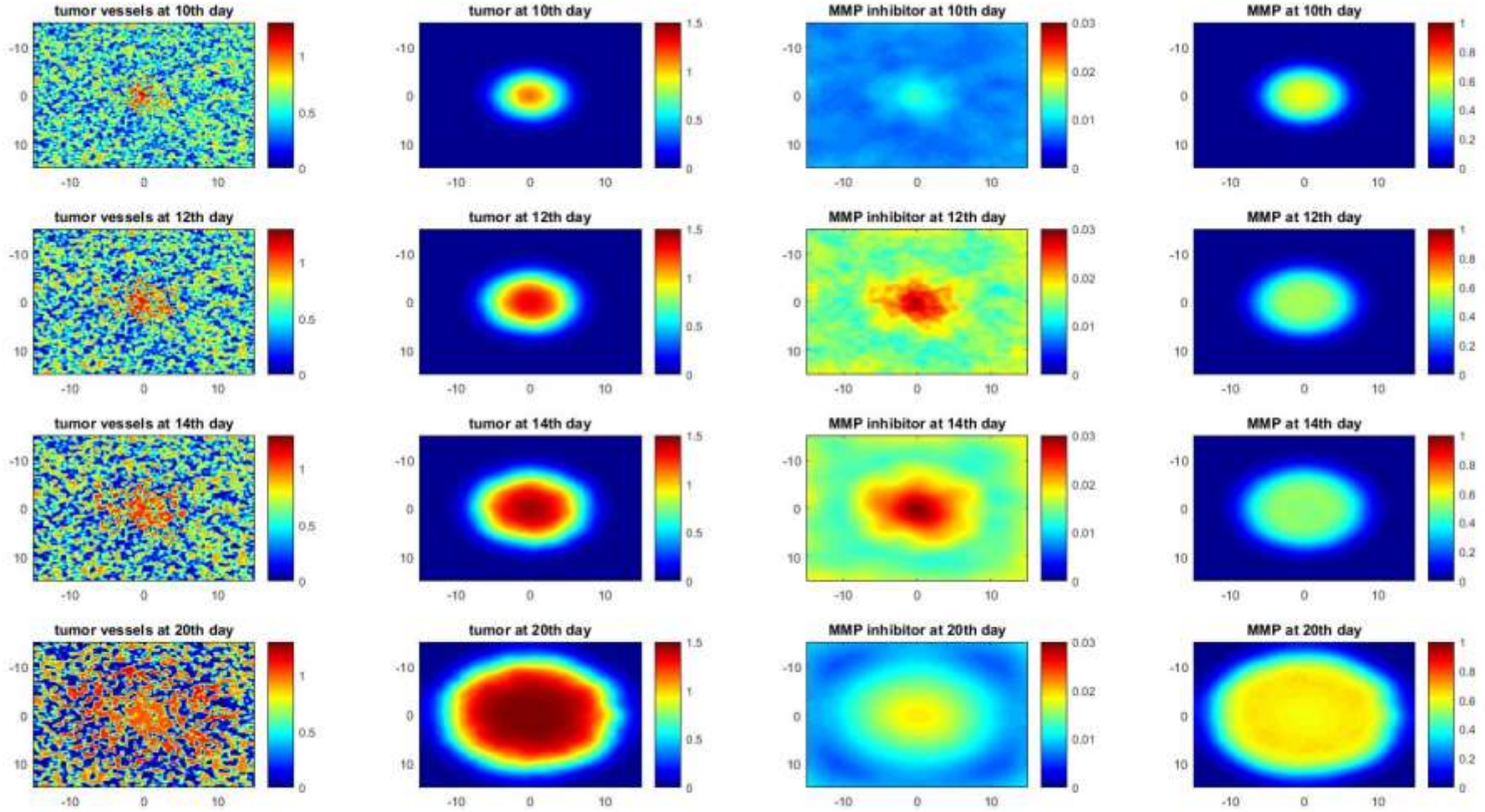
Şekil 53 Şekil 50 MMPsiz ortamda tümör büyümesi ve basınç



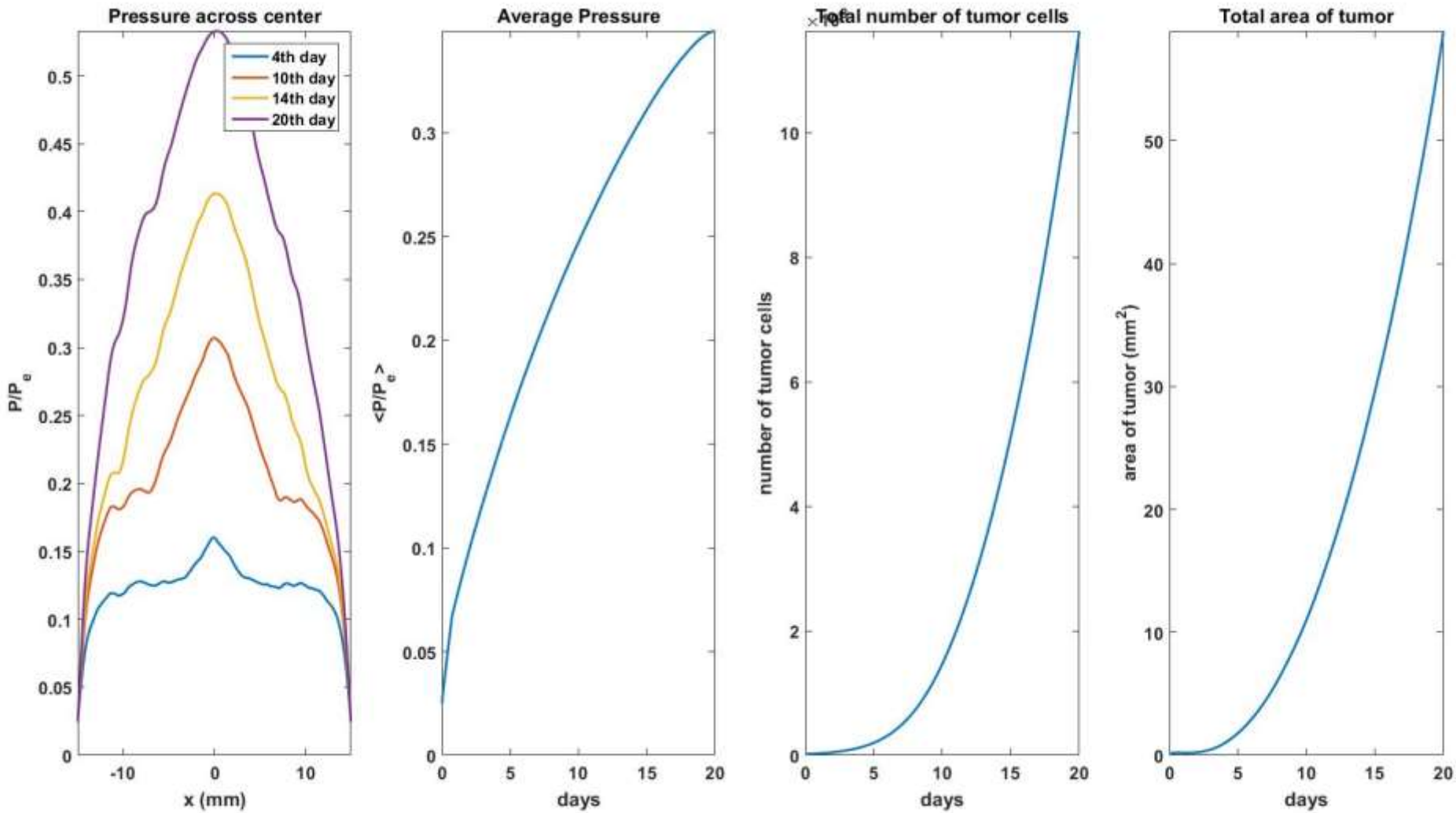
Şekil 54 MMP bulunan ortamda tümör büyümesi ve basınç



Şekil 55 MMP bulunan ortamda tümör büyümesi ve basınç



Şekil 56 MMP ve MMP inhibitörü bir arada: (İnhibitör 10, 12, 14. Günlerde verildi.)



Şekil 57 MMP ve MMP inhibitörü bir arada: (İnhibitör 10, 12, 14. Günlerde verildi.)

5.PROJE ÇIKTILARI

Yayınlar

1. Title: An extended analytical approach for diffuse optical imaging
Author(s): Erkol, H.; Nouizi, F.; Unlu, M. B.; et al.
Source: **Physics in Medicine and Biology** Volume: **60** Issue: **13** Pages: **5103-5121** Published: **JUL 7 2015**
Times Cited: **0**
DOI: **10.1088/0031-9155/60/13/5103**

2. Title: Influence of vascular normalization on interstitial flow and delivery of liposomes in tumors
Author(s): Ozturk, Deniz; Yonucu, Sirin; Yilmaz, Defne; et al.
Source: **Physics in Medicine and Biology** Volume: **60** Issue: **4** Pages: **1477-1496** Published: **FEB 21 2015**
Times Cited: **0**
DOI: **10.1088/0031-9155/60/4/1477**

3. Title: A measurement-based analytical approach to the bioluminescence tomography problem
Author(s): Erkol, Hakan; Demirkiran, Aytac; Kipergil, Esra-Aytac; et al.
Source: **Biomedical Applications of Light Scattering Viii** Volume: **8952** Published: **2014**
Times Cited: **0**
DOI: **10.1117/12.2039301**

4. Title: Analytical reconstruction of the bioluminescent source with priors
Author(s): Erkol, Hakan; Demirkiran, Aytac; Uluc, Nasire; et al.
Source: **Optics Express** Volume: **22** Issue: **16** Published: **AUG 11 2014**
Times Cited: **0**
DOI: **10.1364/OE.22.01914119758**

5. Title: Photoacoustic radiation force on a microbubble
Author(s): Erkol, Hakan; Aytac-Kipergil, Esra; Unlu, Mehmet Burcin
Source: **Physical Review E** Volume: **90** Issue: **2** Published: **AUG 5 2014**
Times Cited: **0**
DOI: **10.1103/PhysRevE.90.023001**

6. Title: Source-receiver photoacoustic wave interferometry
Author(s): Erkol, Hakan; Demirkiran, Aytac; Kipergil, Esra-Aytac; et al.
Source: **Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2014** Volume: **8943** Published: **2014**
Times Cited: **0**
DOI: **10.1117/12.2038999**

7. Title: Spectral power density of the random excitation for the photoacoustic wave equation
Author(s): Erkol, Hakan; Unlu, Mehmet Burcin
Source: **Aip Advances** Volume: **4** Issue: **9** Published: **SEP 2014**
Times Cited: **0**
DOI: **10.1063/1.4894524**

8. Title: A novel fiber laser development for photoacoustic microscopy
Author(s): Yavas, Seydi; Aytac-Kipergil, Esra; Arabul, Mustafa U.; et al.
Source: **Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2013** Volume: **8581** Published: **2013**
Times Cited: **0**
DOI: **10.1117/12.2004910**

9. Title: All-Fiber Nanosecond Laser System Generating Supercontinuum Spectrum for Photoacoustic Imaging
Author(s): Yavas, S.; Kipergil, E. A.; Akcaalan, O.; et al.
Source: **2013 Conference on and International Quantum Electronics Conference Lasers and Electro-Optics Europe (Cleo Europe/iqec)**Published: **2013**
Times Cited: **0**

10. Title: Analysis of laser parameters in the solution of photoacoustic wave equation
Author(s): Erkol, Hakan; Aytac-Kipergil, Esra; Arabul, Mustafa U.; et al.
Source: **Photons Plus Ultrasound: Imaging and Sensing 2013** Volume: **8581** Published: **2013**
Times Cited: **0**
DOI: **10.1117/12.2003844**

11. Title: Virtual source method for diffuse optical imaging
Author(s): Erkol, Hakan; Unlu, Mehmet Burcin
Source: **Applied Optics** Volume: **52** Issue: **20** Pages: **4933-4940** Published: **JUL 10 2013**
Times Cited: **3**
DOI: **10.1364/AO.52.004933**

Tezler

Duygu Kaba, Yüksek Lisans Tezi, Tümör mikroçevresinin değiştirilmesi yoluyla ilaç iletiminin matematiksel modellemesi: MMP aktivasyonu, (2013)

Mustafa Ümit Arabul, Yüksek Lisans Tezi, Fiber lazer tabanli geriye modda fotoakustik mikroskop geliştirilmei ve görüntü karakterizasyonu, (2013).

Projeler

Ayrıca bu projenin bir uzantısı olarak önemli bir projeye daha başlamış bulunmaktayız. Onunla ilgili kısa bir özet de veriyoruz.

Kanser Patolojisi Için Optik Cımbızlı Fotoakustik Mikroskop TÜBİTAK 1003 - 213E033

Bu proje kapsamında üretilen lazerin parametrelerinin, ticari lazerlerden farklı olarak birbirinden bağımsız olarak ayarlanabilirliği ve parameter değişim aralığının geniş olması (tekrar frekansı (50 kHz-3MHz, dalgaboyu (600-1100 nm), atım süresi (1-3 ns)), ve mikroskop siteminin başarı ile kurulması bir başka projenin (TÜBİTAK 1003 213E033) yapılabilirliğini

mümkün kılmıştır. Bu kapsamda fotoakustik mikroskop sistemi ile optik cımbız sisteminin birleştirilmesi için Bilkent Üniversitesi ile iş birliği halinde ön çalışmalara başlanmıştır.

Optik cımbızlama tek bir lazer demetinin odaklanması ile elde edilmektedir. İstenilen odaklanmayı gerçekleştirmek için, yüksek sayısal açıklığa (NA) sahip bir mercekten (NA>1) ve merceğin arka açıklığını tamamen dolduran optik lazer demetinden oluşan bir düzenek gerekmektedir. Yüksek sayısal açıklık, lazer ışınının yayılma ekseni doğrultusunda parçacıkları itme eğilimine sahip saçılma kuvvetini dengelemek için gereklidir.

Nano ve mikron boyutlu dielektrik parçacıkların hareketlerinin kontrol edilmesi ve tuzaklanması için, lazer ışınının odak noktası civarındaki herhangi bir dielektrik parçacığa iki kuvvet bileşeni etki etmektedir:

1.Saçılma kuvveti: Işığın yayılma doğrultusunda parçacığı iten kuvvet olan ışınım basıncıdır.

2. Gradyan kuvvet: Dielektrik parçacığı ışık şiddetinin yoğun olduğu bölgeye iten kuvvettir.

Bu kuvvetlerin dengelenmesi için parçacıkların tuzaklanması mümkündür. Optik tuzakların karakteristik özellikleri çoğunlukla tuzakların sertliği ile ilgilidir, dolayısıyla sistemin kalibre edilmesi tuzaklara karşılık gelen potansiyel bariyerlerin belirlenmesi ve Brownian parçacıkların çalışılabilmesi açısından önem taşımaktadır. Optik tuzakların kalibre edilme süreci aşağıda özetlenmiştir.

Burada, Brownian parçacıkların optik tuzaklar içerisindeki yörüngelerini yüksek hızlı kameralar ile kaydedip, parçacığın uzaysal olasılık dağılımı hesaplanmıştır. Daha sonra çıkartılan histogram aşağıda denklemi verilen normal olasılık dağılım fonksiyonuna uyacak şekilde yazılmıştır (fit edilmiştir):

$$\frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}}\, e^{\frac{x^2}{2\sigma^2}}$$

burada σ^2 varyansı ifade etmektedir.

Tuzak içindeki parçacığın varyansı da buna göre hesaplanmıştır ve tuzağın katılığı (stiffness) da Eşdağılım Metoduna (equipartition method) göre hesaplanmıştır. Bu metoda göre

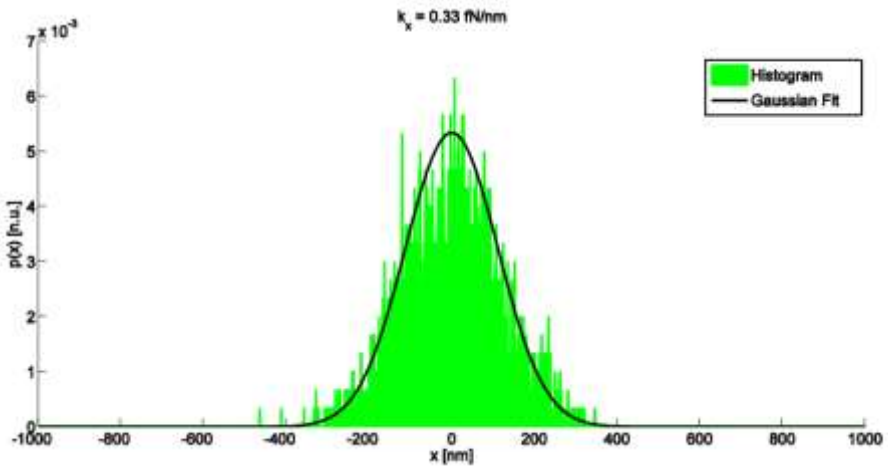
$$\frac{1}{2}\, k_b\, T = \frac{1}{2}\, k_x\, x^2$$

olduğundan

$$k_x = \frac{k_b\, T}{\sigma}$$

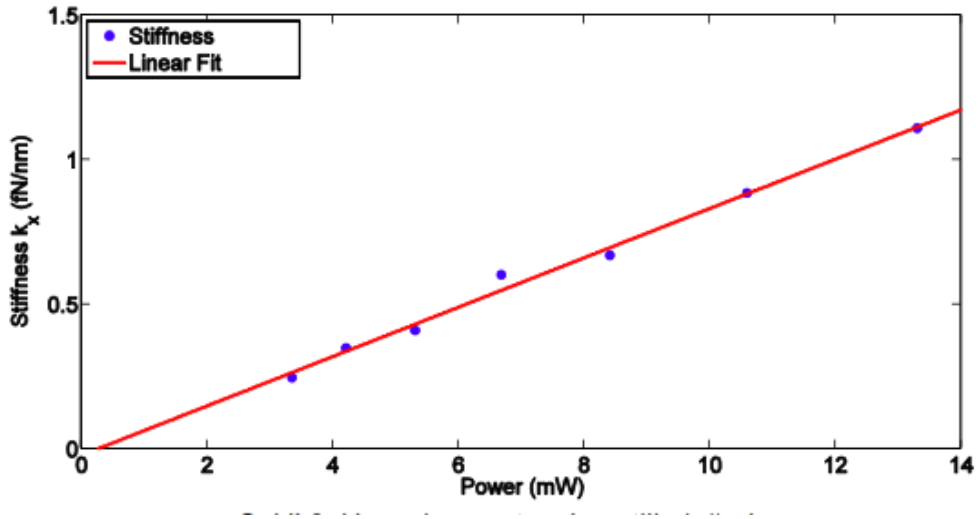
olarak bulunmaktadır.

Şekil (Numara) bir parçacığın optik tuzak içerisinde olasılık dağılım fonksiyonu ve hesaplanmış tuzak sertlik değeri verilmiştir.



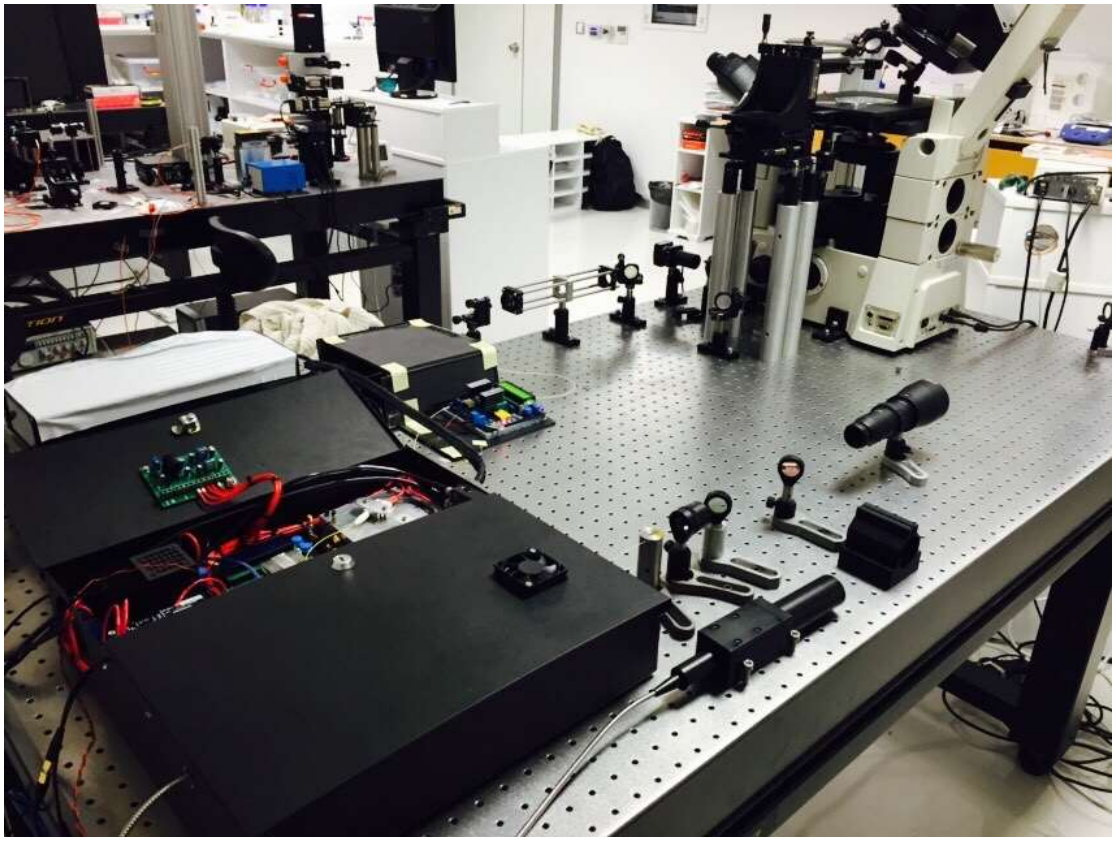
Şekil 58 Parçacığın optik tuzak içerisinde olasılık dağılım fonksiyonu.

Aşağıda ise lazerin gücüne gore tuzağın sertlik değerine ait grafik gösterilmektedir.



Şekil 59 Hesaplanmış tuzak sertlik değerleri.

Tuzaklanan parçacıkların ses dalgalarının algılanmasında kullanılabileceği fikri literatürde Physical Review Letters dergisindeki bir makaleyle gösterilmiştir (A. Ohlinger et al. PRL 108, 018101 (2012)). Bu bağlamda optik soğurma sonucu oluşan ultrason dalgaları saptamak için geleneksel fotoakustik mikroskoplarda kullanılan ultrason alıcılar yerine optik cımbız kullanılması için Bilkent Üniversitesi ile ortak olarak ön çalışmalar yapılmıştır. Aşağıda optik cımbızla birleştirilmiş fotoakustik mikroskop sistemi gösterilmektedir.



Şekil 60 Optik cımbızla birleştirilmiş fotoakustik mikroskop sistemimiz.

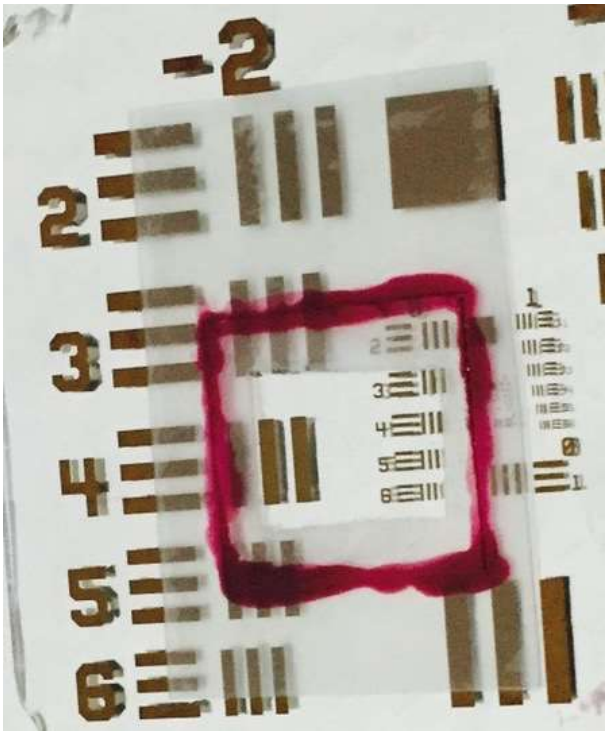
Optik tuzaklama için 976 nm dalga boyunda gücü ayarlanabilen lazer diyot kullanılmıştır. Güç ayarlanması ile gradyan ve saçılma kuvvetleri değiştirilerek optik cımbızın sertliği ayarlanabilmektedir. Algılama kısmı için, yüksek hızlı (500 fps) kamera sisteme eklenmiştir. Yüksek odaklanmayı sağlamak için 100X yüksek nümerik apertürlü (1.3 NA) yağ damlalı objektif , tuzaklama için ise 2 μm yarıçaplı silica parçacıklar kullanılmıştır. Yüksek NA'lı mercek nedeniyle, görüş alanı yaklaşık 100 μm x 100 μm ile sınırlıdır. Bu alan, özellikle spektroskopi uygulamaları ile nano ve mikron boyutlu dielektrik parçacıkların hareketlerinin kontrol edilmesi ve tuzaklanması için uygundur. D. Petrov, "Raman spectroscopy of optically trapped particles," J. Opt. A 9, S139-S156 (2007). Fotoakustik mikroskop sistemi için daha önceki bölümlerde ayrıntılı olarak anlatılan superkontinyum lazer kullanılmıştır. İstenilen dalga boyunda filtrelenen ışık, demet genişleyici kullanılarak odaklamanın düzgün gerçekleşebilmesi için 10X'lik objektifin girişini dolduracak şekilde genişletilmiştir. Fotoakustik hedef için USAF 1951 kullanılmıştır.

Aşağıda iki sistemin bir mikroskop gövdesi üzerinde birleştirildiği gösterilmektedir.



Şekil 61 Optik cımbızla birleştirilmiş fotoakustik mikroskop sisteminin mikroskop gövdesi üzerindeki son kısmı.

Silica parçacıklarının yerçekimi kuvveti etkisiyle tuzaktan çıkmaması için optik cımbız için kullanılan lazer mikroskop gövdesinin alt kısmından gönderilmiştir. Fotoakustik mikroskop örneği (USAF 1951) üzerinde odaklanan ışık ile optik cımbız odağı arasında, fotoakustik odağın tuzağı bozmaması için 10 μm'lik aralık bırakılmıştır. Şekil (Numara)'da fotoakustik hedef ile silica parçacıklarının birleştirildiği örnek gösterilmektedir.



Şekil 62 Fotoakustik hedef ile silica parçacıklarının birleştirildiği örnek.

Sistem üzerinde ses dalgalarının büyüklük ve frekanslarının izlenmesi eş zamanlı olarak ultrason probları ile gerçekleşmektedir. Bilkent Üniversitesi'nde deneyler ve ön çalışmalar tamamlanmış, deney sonuçlarının analizleri devam etmektedir.

6. KAYNAKLAR

Allen vd., T. (2005). Generating Photoacoustic Signals Using High-Peak Power Pulsed Laser Diodes. *Proceedings of the International Society for Optics and Photonics* , 233-242.

Anastasio vd., R. (2007). Application of inverse source concepts to photoacoustic tomography. *23*.

Beard vd., P. (2011). Biomedical Photoacoustic Imaging. *Interface Focus* , 602-631.

Calasso vd., I. (2001). Photoacoustic Point Source. *86*.

D. G. (1991). Photoacoustic monopole radiation in one, two, and three dimensions. *67*.

Dayton vd., P. (1997). A preliminary evaluation of the effects of primary and secondary radiation forces on acoustic contrast agents. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control , 44*, 1264.

Erkol vd., H. (2014). Photoacoustic radiation force on a microbubble. *PHYSICAL REVIEW E 90* , 1-11.

Erkol, H. (2014). Photoacoustic radiation force on a microbubble. *PHYSICAL REVIEW E 90* , 1-11.

Favazza vd. (2011). In Vivo Functional Photoacoustic Microscopy of Cutaneous Microvasculature in Human Skin. *Journal of Biomedical Optics , 16*.

Funke vd., A. (2009). “Photoacoustic guidance of high intensity focused ultrasound with selective optical contrasts and time-reversal. *Appl. Phys. Lett , 94*, 054102-3.

G. J. Diebold, T. S. (1991). Photoacoustic monopole radiation in one, two, and three dimensions. *67*.

Geng vd., K. (2005). Imaging of tumor angiogenesis in rat brains in Imaging of tumor angiogenesis in rat brains in. *Applied Optics , 44*, 770-775.

Hu, S., & Wang, L. (2010). Photoacoustic imaging and characterization of the microvasculature. *Journal of Biomedica , 15*, 011101 1-15.

I. G. Calasso, W. C. (2001). Photoacoustic Point Source. *86*.

J. M. Dudley, L. P. (2002). Supercontinuum generation in air–silica microstructured fibers with nanosecond and femtosecond pulse pumping,”. *B 19*.

Jo, J., & Yang, X. (2011). Functional Photoacoustic Imaging to Observe Regional Brain Activation Induced by Cocaine Hydrochloride. *16*.

Jong vd., N. (2002). Basic Acoustic Properties of Microbubbles. *Echocardiography , 19*, 229-240.

Kessenbrock vd., V. (2010). Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment Cell. *141*, 52-67.

Kneubühl vd. (1978). Laser-generated stress waves in liquids. *64*.

Kneubühl, M. S. (1978). Laser-generated stress waves in liquids. *64*.

Kozhushko vd., V. (2004). Focused array transducer for two-dimensional optoacoustic tomography. *116*.

Kruger vd, R. (1995). Photoacoustic ultrasound (paus)reconstruction tomography. *22*.

Krumholz vd., A. (2011). Photoacoustic Microscopy of Tyrosinase Reporter Gene in Vivo. *Journal of Biomedical Optics , 16*.

Krumholz, A. S.-C. (2011). Photoacoustic Microscopy of Tyrosinase Reporter Gene in Viv0. *Journal of Biomedical Optics , 16*.

Leighton, T. G. (1994). In *The Acoustic Bubble.* San Diego, CA: Academic Press.

Liao vd., L. (2010). Imaging Brain Hemodynamic Changes During Rat Forepaw Electrical Stimulation Using Functional Photoacoustic Microscopy. *Neuroimage* , 562-70.

Liu, M., & Buma, T. (2010). Wavelength Agile Photoacoustic Microscopy with a Pulsed Supercontinuum Source. *IEEE* .

M. A. Anastasio, J. Z. (2007). Application of inverse source concepts to photoacoustic tomography. *23*.

N. de Jong, A. B. (2002). Basic Acoustic Properties of Microbubbles. *Echocardiography* , 229-240.

Ninni, P., & Martelli, F. (2010). The use of India ink in tissue-simulating phantoms. *Optic Express* , 26854-65 .

P. A. Dayton, K. E. (1997). A preliminary evaluation of the effects of primary and secondary radiation forces on acoustic contrast agents. *44*.

R. A. Kruger, P. L. (1995). Photoacoustic ultrasound (paus)reconstruction tomography . *22*.

Saka vd., M. (2010). Linear Superposition of Sensory-Evoked and Ongoing Cortical Hemodynamics. 1662-6427.

Shao vd. (2012). Mosaic Acquisition and Processing for Optical-Resolution Photoacoustic Microscopy. *Journal of Biomedical Optics , 17*, 080503.

Shi vd. (2011). In vivo Near-Realtime Volumetric Optical-resolution Photoacoustic Microscopy Using a High repetition rate Nanosecond Fiber laser. *Optics Express , 19*, 17143-17150.

Shi vd., W. (2011). In vivo Near-Realtime Volumetric Optical-resolution Photoacoustic Microscopy Using a High-repetition- rate Nanosecond Fiber-laser. *Optics Express , 9*, 17143-17150.

Staley vd., J. (2010). Growth of Melanoma Brain Tumors Monitored by Photoacoustic Microscopy. *Journal of Biomedical Optics , 15*.

Staley vd., J. (2010). Growth of Melanoma Brain Tumors Monitored by Photoacoustic Microscopy. *Journal of Biomedical Optics , 15*.

T. Buma, B. C. (2015). Near-infrared spectroscopic photoacoustic microscopy using a multi-color fiber laser source.

V. Kozhushko, T. K. (2004). Focused array transducer for two-dimensional optoacoustic tomography. *116*.

Wang. (2007). *Biomedical Optics.* Willey, New jersey, USA.

Wang vd. (2007). *Biomedical Optics.* Willey, New jersey, USA.

Wang vd. (2011). Fiber Laser Based Photoacoustic Microscopy and Melanoma Cell Detection. *Journal of Biomedical Optics , 16*.

Wang vd., L. (2011). Fiber Laser Based Photoacoustic Microscopy and Melanoma Cell Detection. *Journal of Biomedical Optics , 16*.

Wang vd., L. (2004). Ultrasound-Mediated Biophotonic Imaging: A review of Acoustooptical Tomography and Photoacoustic Tomography.

Wang, L. V. (2004). Ultrasound-Mediated Biophotonic Imaging: A review of Acoustooptical Tomography and Photoacoustic Tomography.

Weinberg, R. (2007). The biology of cancer. Garland Science New York.

Westervelt vd. (1988). The photoacoustic effect generated by a spherical droplet in a fluid. *84*.

Westervelt, G. J. (1988). The photoacoustic effect generated by a spherical droplet in a fluid. *84*.

Y. N. Billeh, M. L. (2010). Spectroscopic photoacoustic microscopy using a photonic crystal fiber. *18*.

Yang vd., S. (2012). Intracellular Label-Free Gold Nanorods Imaging with Photoacoustic Microscopy. *Optics Express , 20*, 10370-10375.

Yao vd., J. (2011). Label-free Oxygen-metabolic Photoacoustic Microscopy in Vivo. *Journal of Biomedical Optics , 16*, 076003.

Yeh vd., C. (2012). Photoacoustic Microscopy of Blood Pulse Wave. *Journal of Biomedical Optics , 17*.

Young vd. (1982). Theory of the pulsed optoacoustic technique. *72*.

Young, H. M. (1982). Theory of the pulsed optoacoustic technique. *72*.

Zeng vd. (2012). 3D-visual Laser Diode Based Photoacoustic Imaging. *Optics Express , 20*, 1237.

Zeng, L. G. (2012). 3D-visual Laser Diode Based Photoacoustic Imaging. *Optics Express , 20*, 1237.

Zhang vd., C. (2012). Label-Free Photoacoustic Microscopy of Myocardial Sheet Architecture. *Journal of Biomedical Optics , 17*.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. MEHMET BURÇİN ÜNLÜ
Proje No:	112T253
Proje Başlığı:	Tümör Anjiyogenezin Moleküler Görüntülenmesi İçin Fotoakustik Mikroskop Geliştirilmesi
Proje Türü:	Uluslararası
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	MEHMET NACİ İNCİ, YANİ İSKARLATOS
Danışmanlar:	NESRİN ÖZÖREN, FATİH ÖMER İLDAY
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	BOĞAZİÇİ Ü. FEN-EDEBİYAT F. FİZİK B.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/01/2013 - 01/01/2016
Onaylanan Bütçe:	479050.0
Harcanan Bütçe:	369435.4
Öz:	Anjiyogenez var olan mikrovaskülerden yeni kan damarlarının oluşmasıdır. Kanserde, tümör anjiyogeneze bağlı moleküler süreçlerin takibinde invasif olmayan görüntüleme tekniklerinin kullanılmasının büyük önemi vardır. Bunun temel sebepleri anjiyogenezi hedefleyen görüntüleme tekniklerinin erken teşhiste faydalı olma potansiyeline sahip olmasının yanı sıra antianjiyogenez ve proanjiyogenez terapilerin değerlendirilmesinde de rol oynama kapasitesine sahip olmasıdır. Matriks metalloproteinazlar (MMP) tümör anjiyogenezin görüntülenmesinde özel biyolojik hedefler olarak kullanılabilir. Çünkü MMP düzeyi her tür insan kanserinde artmaktadır ve tümör anjiyogenezin oluşumu için de gereklidir. Buna rağmen, çoğu kanser türü için MMP'lerin hala tümör anjiyogeneze nasıl, ne zaman ve nerede dahil olduğu bilinmemektedir. Bundan dolayı yüksek çözünürlüklü, yüksek hassasiyetli moleküler görüntüleme tekniklerinin ve görüntüleme güdümlü in silico tümör modellerinin geliştirilmesi büyük önem taşımaktadır. Güdümlü tümör modelleri MMP enzimatik aktivasyonunun fiziksel yeri ve zaman içindeki değişimini belirlemekte paha biçilmez yardımda bulunabilir. Biz bu projede yüksek çözünürlüklü bir fotoakustik mikroskop ve in silico bir tümör modeli geliştirdik. Geliştirdiğimiz mikroskobun çözünürlüğü 2.5 mikrometre oldu. Tümör modelimiz sayesinde de MMP aktivitesinin tümör büyümesini ve tümör içindeki sıvı basıncını nasıl etkilediğini test ettik. Sonuçlar şunu göstermektedir ki kullanılan ilaçların dozu ve zamanlaması bu ilaçların etkinliği üzerinde büyük öneme sahiptir. Bundan dolayı da sistematik çalışmalar için kişiye özel sanal tümör modellerine ihtiyaç büyüktür.
Anahtar Kelimeler:	nser, kanser görüntüleme, fotoakustik mikroskop, tümör modelleme, matris metalloproteinaz
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- A novel fiber laser development for photoacoustic microscopy (Bildiri), 2- Analysis of laser parameters in the solution of photoacoustic wave equation (Bildiri)1- Spectral power density of the random excitation for the photoacoustic wave equation (Makale - Diğer Hakemli Makale), 2- An extended analytical approach for diffuse optical imaging (Makale - Diğer Hakemli Makale), 3- Analysis of laser parameters in the solution of photoacoustic wave equation. (Bildiri - Uluslararası Bildiri - Poster Sunum), 4- Fiber lazer tabanli geriye modda fotoakustik mikroskop geliştirilmei ve görüntü karakterizasyonu (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Yüksek Lisans Tezi), 5- Tümör mikroçevresinin değiştirilmesi yoluyla ilaç iletiminin matematiksel modellemesi: MMP aktivasyonu (Tez (Araştırmacı Yetiştirilmesi) - Yüksek Lisans Tezi), 6- Photoacoustic radiation force on a microbubble (Makale - Diğer Hakemli Makale),

TÜBİTAK