

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΗ ΑΣΚΗΣΗ 3

***ΔΙΑΓΝΩΣΗ ΚΑΡΚΙΝΙΚΩΝ ΜΟΡΦΩΜΑΤΩΝ
ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΣΤΗΝ ΠΕΡΙΟΧΗ ΤΟΥ ΜΑΚΡΑΝ
ΕΡΥΘΡΟΥ***

1. Εισαγωγή

Η μεταβολή του φθορισμού που οφείλεται σε φυσιολογικές, μορφολογικές ή βιολογικές αλλαγές των ιστών, αποτελεί την κοινή βάση αναφοράς όλων των φασματοσκοπικών διαγνωστικών μεθόδων φθορισμού. Οι φασματοσκοπικές μέθοδοι φθορισμού μπορούν να διακριθούν σε δύο κατηγορίες ανάλογα με την προέλευση του μορίου του οποίου ο φθορισμός θα δώσει την διαγνωστική πληροφορία. Το μόριο αυτό μπορεί να είναι είτε ενδογενές (αυτοφθορισμός), είτε εξωγενές. Στην περίπτωση που το μόριο είναι ενδογενές η μεταβολή στο σήμα φθορισμού μπορεί να οφείλεται σε έναν ή περισσότερους από τους παρακάτω λόγους.

- Η συγκέντρωση του φθορίζοντος μορίου είναι διαφορετική μεταξύ των υγιών και πασχόντων ιστών (διαφορετική ένταση φθορισμού).
- Το μικροπεριβάλλον του φθορίζοντος μορίου στους δύο τύπους ιστών είναι διαφορετικό (διαφορετική ένταση φθορισμού).
- Το μόριο λόγω της συνεπαγόμενης της ασθένειας διαφορετικής βιοχημείας έχει υποστεί μεταβολές οι οποίες μπορεί να μεταφράζονται σε διαφορετικά μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής ή/και σε διαφορετική ένταση φθορισμού.

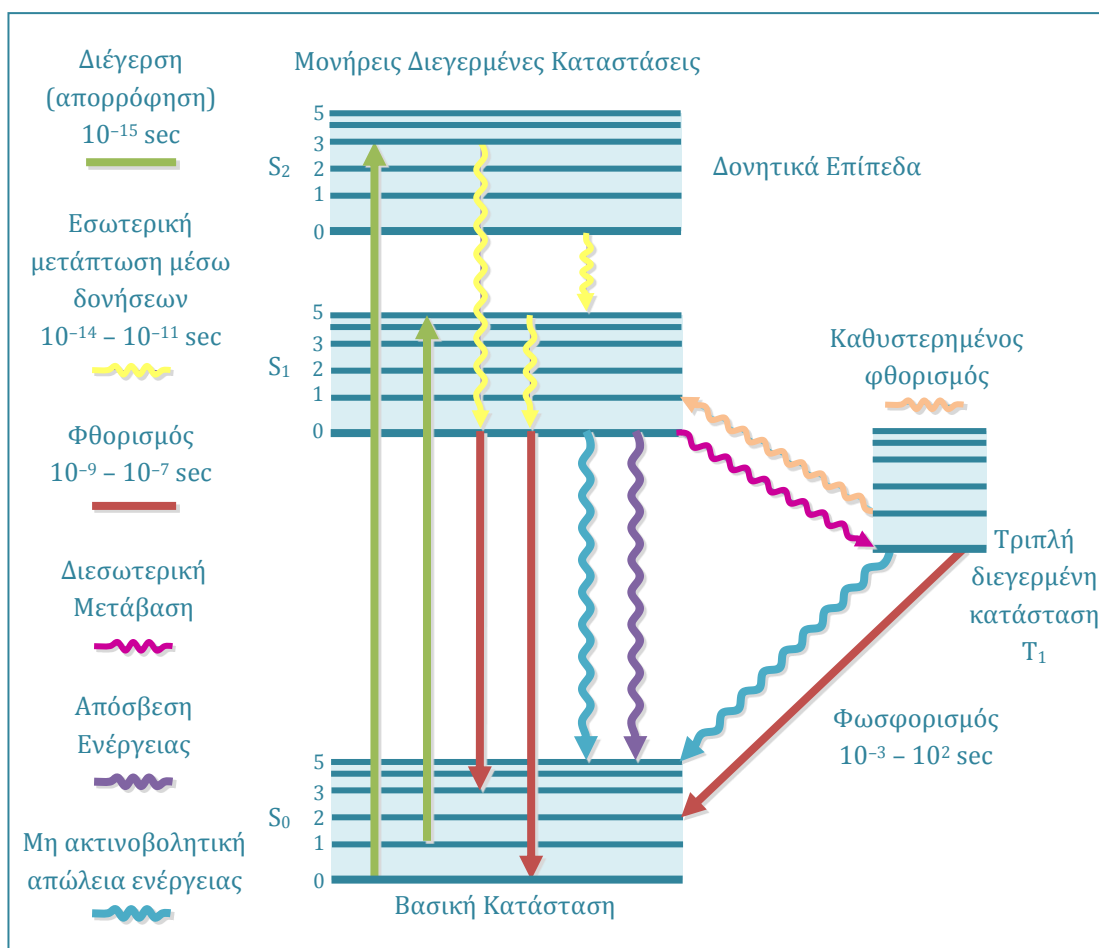
Στην περίπτωση που χρησιμοποιηθεί ένα εξωγενές φθορίζον μόριο αυτό πρέπει να συγκεντρώνεται επιλεκτικά στον πάσχοντα ιστό. Σε αυτήν την περίπτωση η διαφοροποίηση των ιστών υφίσταται στη διαφορετική ένταση σημάτων φθορισμού. Γενικά στη μέθοδο αυτή έχει αποδοθεί ο όρος φωτοδιάγνωση, ενώ στην περίπτωση που ο ιχνηθέτης φθορισμού είναι κάποιος φωτοευαισθητοποιητής η μέθοδος ονομάζεται φωτοδυναμική διάγνωση. Αν και η έρευνα γύρω από αυτούς τους ιχνηθέτες φθορισμού αποτελεί ένα από τα κύρια πεδία μετωπικής έρευνας σήμερα, τα περισσότερα διαγνωστικά συστήματα τα οποία έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιούν φωτοευαισθητοποιητές.

Στη φωτοδυναμική διάγνωση ο φωτοευαισθητοποιητής χορηγείται τοπικά ή συστηματικά και μετά την πάροδο κάποιου χρονικού διαστήματος κατακρατείται επιλεκτικά από τους καρκινικούς ιστούς. Εάν οι ιστοί αυτοί ακτινοβοληθούν με κατάλληλο φως (χαμηλής ισχύος και μήκους κύματος που αντιστοιχεί σε κάποια από τις κορυφές του φάσματος απορρόφησης του φωτοευαισθητοποιητή) ο φωτοευαισθητοποιητής θα φθορίσει επιτρέποντας την ανίχνευση των καρκινικών ιστών.

Η παρούσα άσκηση έχει ως σκοπό την εργαστηριακή σας εισαγωγή στη φωτοδυναμική διάγνωση. Η μέθοδος διάγνωσης καρκινικών μορφωμάτων σε ιστό με τη χρήση Laser στην περιοχή του μακράν υπερύθρου στηρίζεται στο φαινόμενο του φθορισμού φωτοευαίσθητων ουσιών οι οποίες χρησιμοποιούνται για φωτοδυναμική θεραπεία και διάγνωση.

2. Φαινόμενα που ακολουθούν την απορρόφηση φωτός από χρωμοφόρα μόρια

Χρωμοφόρα ονομάζονται τα μόρια τα οποία απορροφούν κάποια μήκη κύματος του ορατού φωτός, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα να τα θεωρούμε έγχρωμα συστατικά. Πολλές φορές όμως ο ορισμός αυτός επεκτείνεται για την UV και IR ακτινοβολία.



Διάγραμμα Jablonski ενδομοριακών διεργασιών με βάση την απορρόφηση φωτός.

Κάθε μόριο κατέχει μία σειρά ενεργειακών σταθμών και μπορεί να μεταβεί από μία χαμηλότερη σε μία υψηλότερη στάθμη με την απορρόφηση κβάντου φωτεινής ακτινοβολίας, ίσης ενέργειας με τη διαφορά των δύο ενεργειακών επιπέδων. Σε κάθε ηλεκτρονιακή στάθμη αντιστοιχεί επίσης ένα πλήθος δονητικών επιπέδων. Η πολλαπλότητα M μιας στάθμης, που εκφράζει την τροχιακή στροφορμή, σχετίζεται με το συνολικό spin της στάθμης S μέσω της σχέσης $M=2S+1$. Έτσι στην περίπτωση ενός πολυατομικού μορίου του οποίου τα ηλεκτρόνια βρίσκονται σε ζεύγη με αντιπαράλληλα spin το συνολικό spin είναι 0 και η πολλαπλότητά του είναι ίση με 1. Αυτή η κατάσταση ονομάζεται μονήρης (singlet). Όταν το spin ενός ηλεκτρονίου αντιστραφεί, τότε στην κατάσταση αυτή υπάρχουν δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια με

παράλληλα spin και ολικό spin 1 άρα η πολλαπλότητα της στάθμης είναι 3. Αυτή η ηλεκτρονιακή στάθμη καλείται τριπλή (triplet).

Στη σταθερή τους κατάσταση τα περισσότερα μόρια βρίσκονται στη μονήρη κατάσταση (singlet state) S_0 . Η βασική αυτή στάθμη χαρακτηρίζεται από τη μικρότερη δυνατή ενέργεια που μπορεί να έχει το μόριο. Αυτό επιτυγχάνεται όταν όλα τα ηλεκτρόνια είναι συζευγμένα και έχουν αντιπαράλληλα spins. Δεν υπάρχει δηλαδή ασύζευκτο ηλεκτρόνιο. Η τριπλή κατάσταση είναι για τα περισσότερα μόρια μία ασταθής κατάσταση στην οποία μεταβαίνουν όταν διεγερθούν και η οποία χαρακτηρίζεται από δύο ασύζευκτα ηλεκτρόνια τα οποία έχουν παράλληλα spins. Το οξυγόνο αποτελεί εξαίρεση των παραπάνω, όντας μία από τις σπάνιες ενώσεις οι οποίες στη βασική τους κατάσταση βρίσκονται στην τριπλή στάθμη, ενώ όταν διεγερθούν μεταβαίνουν στην πολύ σημαντική για τη φωτοδυναμική θεραπεία μονήρη κατάσταση.

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα Jablonski, μετά την απορρόφηση ενός φωτονίου από το μόριο του χρωμοφόρου (διαδικασία που ολοκληρώνεται σε χρόνο της τάξεως των 10^{-15} sec), ακολουθεί μετάβασή του στην πρώτη ή δεύτερη μονήρη διεγερμένη κατάσταση ανάλογα με το εάν το φωτόνιο ανήκει στην περιοχή της ορατής ή της υπεριώδους ακτινοβολίας. Η διαδικασία αυτή είναι πολύ εξειδικευμένη και ακτινοβολία συγκεκριμένης ενέργειας απορροφάται από συγκεκριμένες χημικές δομές. Κατά τη διάρκεια παραμονής του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, η πλεονάζουσα ενέργεια σε σχέση με την ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της στάθμης διοχετεύεται μέσω δονήσεων ή συγκρούσεων με άλλα μόρια. Με τη διαδικασία αυτή το μόριο καταλαμβάνει το χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της διεγερμένης μονήρους στάθμης. Ο χρόνος ζωής αυτής της στάθμης είναι πολύ μικρός, της τάξεως του 1 μs. Το μόριο μπορεί να επιστρέψει στη βασική του στάθμη ακολουθώντας κάποιον από τους παρακάτω μηχανισμούς:

- Εσωτερική μετάπτωση: το μόριο μπορεί από την διεγερμένη κατάσταση, να μεταπηδήσει σε ένα κοντινό δονητικό επίπεδο της βασικής ενεργειακής κατάστασης. Η ενέργεια χάνεται χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας μέσω δονητικής αποδιέγερσης.
- Εκπομπή φθορισμού: το διεγερμένο μόριο που βρίσκεται σε κάποιο δονητικό επίπεδο της μονήρους στάθμης μπορεί να μεταβεί σε ένα δονητικό επίπεδο της βασικής μονήρους κατάστασης, με εκπομπή ενός φωτονίου. Η ενέργεια του φωτονίου και άρα το μήκος κύματος της ακτινοβολίας, καθορίζεται από την ενεργειακή διαφορά μεταξύ της διεγερμένης και του δονητικού επιπέδου της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η διάρκεια ζωής του φθορισμού είναι της τάξης των nsec. Κατόπιν, μέσω απόσβεσης και χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας, το μόριο επιστρέφει στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της βασικής κατάστασης. Εξαιτίας της απώλειας ενέργειας κατά την παραμονή του μορίου στη διεγερμένη κατάσταση, η εκπεμπόμενη ενέργεια (φθορισμός) είναι μεγαλύτερου μήκους κύματος σε σχέση με

την απορροφηθείσα ενέργεια. Το φάσμα φθορισμού (η κατανομή της έντασης της ακτινοβολίας φθορισμού για κάθε μήκος κύματος), εκφράζει τις διαφορετικές πιθανές μεταβάσεις από την μονήρη διεγερμένη κατάσταση στα διάφορα δονητικά επίπεδα της βασικής ηλεκτρονιακής κατάστασης. Η σχετική πιθανότητα να συμβεί κάποια από τις πιθανές διαδρομές διαφέρει από μόριο σε μόριο και εξαρτάται, όχι μόνο από τη δομή του, αλλά και από το τοπικό του περιβάλλον.

- Εσωτερική μετατροπή $S^* \rightarrow T^*$: το διεγερμένο μόριο μπορεί να μεταβεί από τη μονήρη διεγερμένη (S^*) στην πρώτη τριπλή διεγερμένη στάθμη (T^*). Η μετάβαση από τη βασική S_0 στην τριπλή διεγερμένη είναι απαγορευμένη (πολύ απίθανη). Σε αντιδιαστολή, η μετάπτωση από τη μονήρη στην τριπλή διεγερμένη στάθμη είναι περισσότερο πιθανή, αφού η ενέργεια του χαμηλότερου δονητικού επιπέδου της T^* είναι μικρότερη αυτής της S^* . Η άμεση επιστροφή στην βασική κατάσταση μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας είτε με εκπομπή ακτινοβολίας, οπότε και έχουμε το φαινόμενο του φωσφορισμού. Εφόσον η πιθανότητα αντίστροφης μετάβασης από τη διεγερμένη τριπλή στη διεγερμένη μονήρη στάθμη είναι μικρή, η διεγερμένη τριπλή στάθμη είναι συνήθως μεγάλης διάρκειας ζωής (της τάξεως των msec). Επίσης η σχετικά μεγάλη παραμονή των μορίων σε αυτή την κατάσταση τα καθιστά πιο επιρρεπή σε διαδικασίες αποδιέγερσης χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας.

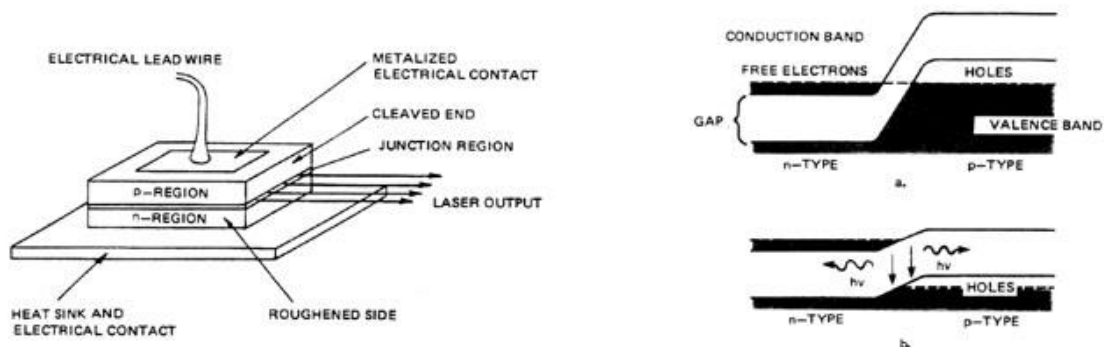
- Καθυστερημένος φθορισμός: Το διεγερμένο μόριο το οποίο βρίσκεται στην τριπλή διεγερμένη κατάσταση T^* μπορεί εκτός από άμεσα να επιστρέψει και έμμεσα στη βασική μονήρη κατάσταση S_0 μέσω της S_1 . Η μετάβαση από την τριπλή διεγερμένη στη μονήρη διεγερμένη προϋποθέτει απορρόφηση ενέργειας από το περιβάλλον. Από την μονήρη διεγερμένη το μόριο θα μεταβεί στη βασική μονήρη εκκέμποντας φωτεινή ενέργεια ίση με τη ενεργειακή διαφορά των δύο σταθμών.

- Μεταφορά ενέργειας μέσω κρούσεων: αν το διεγερμένο μόριο συγκρουστεί με άλλο μόριο που βρίσκεται σε χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο, τότε η ενέργεια μπορεί να μεταφερθεί σε αυτό το μόριο χωρίς εκπομπή ακτινοβολίας. Η διαδικασία αυτή είναι γνωστή ως απόσβεση φθορισμού.

- Μεταφορά ενέργειας μέσω συντονισμού: η ενέργεια αυτή μπορεί να μεταφερθεί σε άλλο μόριο χωρίς επαφή μέσω μιας σύζευξης διπόλου-διπόλου ανάμεσα στα μόρια. Αν και αυτή η σύζευξη μειώνεται ανάλογα με την έκτη δύναμη της απόστασης ανάμεσα στα μόρια, στα βιολογικά συστήματα μπορεί να επιτευχθεί ικανοποιητική μεταφορά ενέργειας για αποστάσεις μέχρι και 5 nm. Το μόριο που δέχεται την ενέργεια, πρέπει να έχει και μια κατάλληλη ενεργειακή δομή. Το φαινόμενο αυτό είναι μια παραλλαγή της απόσβεσης φθορισμού.

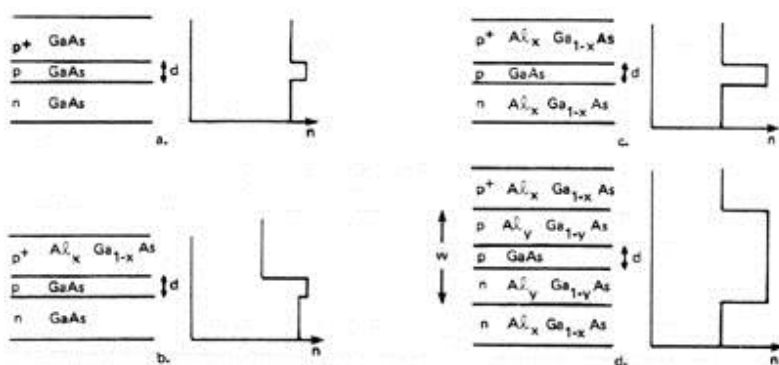
3. Τα Όργανα

3.1 Διοδικό Laser



Διάταξη διόδου Laser, ενεργειακές καταστάσεις κατά την ισορροπία και κατά την διάρκεια διαρροής από ρεύμα.

Σε μία επαφή διόδου όταν διέρχεται ρεύμα δημιουργούνται ενώσεις μεταξύ των οπών και των ηλεκτρονίων. Η διαφορά ενέργειας (gap) συχνά μετατρέπεται σε φως (led, laser). Όταν το ρεύμα της διόδου περάσει ένα ορισμένο κατώφλι τότε δημιουργείται αντιστροφή πληθυσμών και έχουμε εξαναγκασμένη εκπομπή (laser). Το υλικό κατασκευής της διόδου λόγω της διαφορετικής διηλεκτρικής σταθεράς που έχει ως προς τον αέρα αποτελεί και την κοιλότητα του laser. Για μεγαλύτερη ανακλαστικότητα στην κοιλότητα συχνά προστίθεται Al (Αργίλιο). Διατάξεις διόδων φαίνονται στο παρακάτω σχήμα.



Διατάξεις διόδων laser και ενεργειακή δομή

3.2 Οπτικά Φίλτρα

Ένα οπτικό φίλτρο είναι ένα κομμάτι γυαλί ή χαλαζία, το οποίο περιέχει χρωστικές, που απορροφούν συγκεκριμένα μήκη κύματος και μεταφέρουν άλλα. Μερικά φίλτρα είναι τύπου “highpass”, δηλαδή μεταφέρουν ακτινοβολία πάνω από ένα μήκος κύματος. Το όριο αποκοπής αναφέρεται στο μήκος κύματος, όπου το φίλτρο επιτρέπει τη διέλευση περισσότερου από το 0,01% του προσπίπτοντος φωτός. Άλλα φίλτρα επιτρέπουν τη διέλευση μιας περιοχής μηκών κύματος, που είναι αρκετά ευρεία (π.χ 400-500 nm), φίλτρα “bandpass”. Υπάρχουν επίσης φίλτρα “low-pass”.

Αυτά μεταφέρουν ακτινοβολία μέχρι κάποιο μήκος κύματος (π.χ. μέχρι τα 450 nm ενώ από εκεί και πάνω η μετάδοση είναι 0.01%).

3.3 Μονοχρωμάτορας

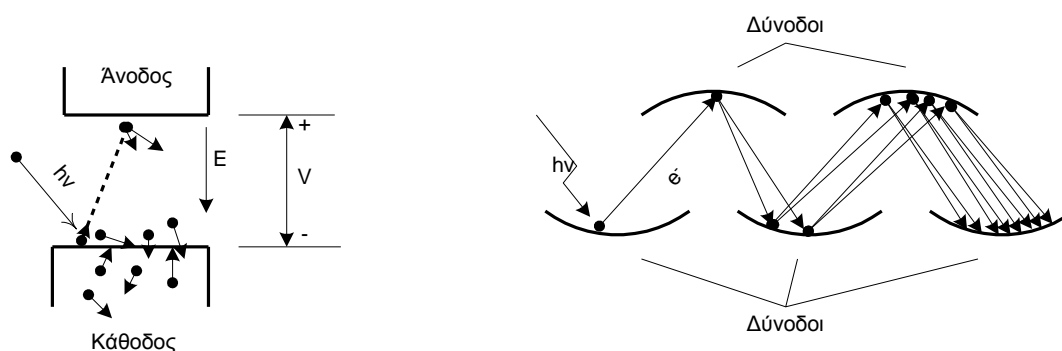
Ο μονοχρωμάτορας είναι μια συσκευή, που περιλαμβάνει ένα διαχωριστή μηκών κύματός σε αντίθεση με ένα φίλτρο, που αποκόπτει συγκεκριμένα μήκη. Στις πρώτες μέρες της φασματοσκοπίας ένα πρίσμα χρησιμοποιούνταν για να διαχωρίζει την ακτινοβολία. Σήμερα χρησιμοποιείται φράγμα περίθλασης. Επιπλέον ένας μονοχρωμάτορας περιλαμβάνει σχισμές εισόδου και εξόδου και κατάλληλους καθρέπτες. Μια ποικιλία τύπων υπάρχουν συχνά για τους μονοχρωμάτορες σε μία διάταξη φθορισμού. Θα δούμε μερικά αφού μιλήσουμε για το φράγμα περίθλασης.

Ένα φράγμα περίθλασης είναι ένα κομμάτι γυαλισμένο αλουμίνιο, πάνω στο οποίο έχει χαρακτηριστεί ένας μεγάλος αριθμός αυλακώσεων (συνήθως 300 με 1500 γραμμές / mm). Όταν μια δέσμη πολυχρωματικού φωτός, εστιάζεται σε ένα φράγμα περίθλασης, κάθε χαρακιά θα συμπεριφερθεί σαν μια πηγή ακτινοβολίας. Σε συγκεκριμένα σημεία στην άλλη πλευρά του φράγματος προσθετική συμβολή θα συμβεί για συγκεκριμένα μήκη κύματος και αφαιρετική για άλλα. Όπου συμβαίνει προσθετική, το φως θα μεταδίδεται, ενώ στην άλλη περίπτωση θα έχουμε σκοτάδι. Το αποτέλεσμα αυτού του φαινομένου, είναι μια εναλλαγή έντονα φωτεινών και σκοτεινών περιοχών. Το μήκος κύματος του διαδιδόμενου φωτός εξαρτάται από τη γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας διέγερσης, σε σχέση με το φράγμα. Στην πράξη το φράγμα περιστρέφεται, για να μεταδώσει φως διαφορετικών μηκών κύματος πάνω στα αντανακλαστικά οπτικά, που παίρνουν το φως από το μονοχρωμάτορα.

3.4 Φωτοπολλαπλασιαστής

Ένας φωτοπολλαπλασιαστής, χρησιμοποιείται ως ανιχνευτής σε μια διάταξη φασματοσκοπίας φθορισμού. Η αρχή λειτουργίας του βασίζεται στα ελεύθερα ηλεκτρόνια των μετάλλων. Τα ηλεκτρόνια αυτά είναι δυνατόν να απομακρυνθούν από το κρυσταλλικό πλέγμα του μετάλλου λόγω της κινητικής ενέργειας που έχουν. Απομακρυνόμενα δημιουργείται ένα ηλεκτρονιακό νέφος φορτισμένο αρνητικά ενώ το κρυσταλλικό πλέγμα είναι θετικά φορτισμένο. Δυνάμεις Coulomb συγκρατούν το νέφος σε μία μικρή απόσταση από το πλέγμα. Εάν ένα φωτόνιο αποδώσει την ενέργειά του σε ένα ηλεκτρόνιο τότε αυτό λόγω της αυξημένης ενέργειας θα απομακρυνθεί περισσότερο από την περιοχή του ηλεκτρονιακού νέφους. Σημειώνουμε ότι οι δυνάμεις Coulomb εξασθενούν με το τετράγωνο της απόστασης, εφαρμόζοντας δε, ένα ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο, είναι δυνατόν να μεταφέρουμε το ηλεκτρόνιο στην άνοδο. Το ηλεκτρόνιο αυτό αποκτά μεγάλη κινητική ενέργεια, ίση με την ενέργεια του εφαρμοσμένου πεδίου και την αποδίδει λόγω συγκρούσεων σε

περισσότερα του ενός ηλεκτρόνια. Τα νέα ηλεκτρόνια αποκτούν ικανή κινητική ενέργεια ώστε να απομακρυνθούν από την πρώτη άνοδο. Το φαινόμενο επαναλαμβάνεται πολλαπλασιαστικά στα επόμενα επίπεδα. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται ικανοποιητικό ρεύμα ώστε να είναι ανιχνεύσιμο. Στον φωτοπολλαπλασιαστή οι άνοδοι λέγονται δύνοδοι.



Σχηματική παράσταση φωτοπολλαπλασιαστή

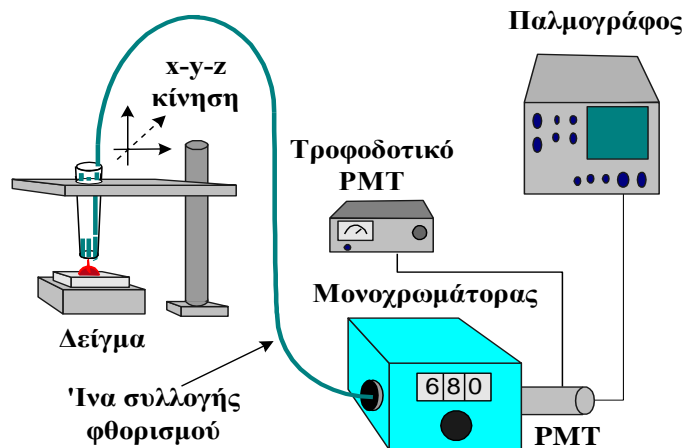
Συνήθως υπάρχουν 6 με 12 δύνοδοι. Η ενίσχυση που επιτυγχάνεται είναι της τάξης του 10^6 . Η τάση σε ένα φωτοπολλαπλασιαστή φτάνει τα 1000 V.

Ένας φωτοπολλαπλασιαστής δίνει μια απόκριση, που εξαρτάται από το μήκος κύματος. Τα περισσότερα όργανα χρησιμοποιούν ένα ανιχνευτή, που έχει μία σχετικά ομαλή απόκριση ανάμεσα στα 300 και τα 600 nm.

4. Περιγραφή της Άσκησης

Η πειραματική διάταξη της άσκησης φαίνεται στο σχήμα της επόμενης σελίδας. Ένα laser διοδικό, με μήκος κύματος εκπομπής 655nm, χρησιμοποιείται ως πηγή μονοχρωματικής ακτινοβολίας για την επαγωγή φθορισμού. Κατάλληλος συγκλίνων φακός εστιάζει την ακτινοβολία αυτή στην είσοδο οπτικής ίνας η οποία μεταφέρει την ακτινοβολία στο δείγμα. Το δείγμα είναι τοποθετημένο σε τράπεζα που έχει την δυνατότητα X-Y μετατόπισης. Σαν δείγμα χρησιμοποιούνται κομμάτια ιστού διαφορετικών παχών κάτω από τα οποία έχει τοποθετηθεί η φωτοευαίσθητη ουσία Methylene Blue (MB) η οποία παρουσιάζει ισχυρή απορρόφηση στην περιοχή των (650nm). Η συγκεντρωμένη ουσία παίζει στην άσκηση τον ρόλο του καρκινικού μορφώματος που έχει πραγματοποιήσει επιλεκτική κατακράτηση.

Μια οπτική ίνα μεταφέρει την ακτινοβολία που εκπέμπεται από το δείγμα σε ένα μονοχρωμάτορα που επιτρέπει την διέλευση ακτινοβολίας στην περιοχή του μεγίστου μήκους κύματος εκπομπής φθορισμού της ουσίας MB (685nm). Σύστημα φακών στην έξοδο της ίνας συγκεντρώνει τη συλλεγόμενη ακτινοβολία και την περνά μέσα από ένα φίλτρο υψηλής διέλευσης στην είσοδο του μονοχρωμάτορα με αποκοπή στα 660 nm, απορρίπτοντας έτσι μεγάλη ισχύ από την ανακλώμενη ακτινοβολία του laser.



Πειραματική διάταξη άσκησης

Η ακτινοβολία αυτή στην συνέχεια μετά την σχισμή εξόδου του μονοχρωμάτορα καταλήγει στο παράθυρο ενός φωτοπολλαπλασιαστή ο οποίος εν συνεχεία δίνει το ηλεκτρικό πλεον σήμα σε ένα ψηφιακό παλμογράφο.

Στην οθόνη αυτού του παλμογράφου παρατηρούμε το σήμα του φθορισμού όπως αυτό αυξομειώνεται ανάλογα με το αν βρισκόμαστε σε περιοχή υψηλής συγκέντρωσης της ουσίας στον ιστό ή όχι.

5. Πειραματικές Μετρήσεις

1. Τοποθετήστε το δοχείο με το διάλυμα πάνω στην τράπεζα X-Y.
2. Εξοικειωθείτε με την βοήθεια και των επιβλεπόντων με το πειραματικό σύστημα.
3. Ρυθμίστε τον μονοχρωμάτορα στην θέση μεγίστης εκπομπής φθορισμού του MB όπως αναφέρεται στο φυλλάδιο. Πώς είμαστε σίγουροι ότι η τιμή αυτή είναι πράγματι το μέγιστο φθορισμού της ουσίας;
4. Ανοίξτε το laser και καταγράψτε τον επαγόμενο φθορισμό όπως φαίνεται στον παλμογράφο, αφού βρείτε και καταγράψετε την θέση (X,Y) του μεγίστου σήματος.
5. Τοποθετείστε τα διάφορα πάχη ιστών πάνω από το phantom και καταγράψτε κάθε φορά το σήμα φθορισμού
6. Με βάση αυτές τις τιμές φτιάξτε την γραφική παράσταση σήματος φθορισμού έναντι πάχους ιστού.
7. Κάντε χειροκίνητα μια σάρωση κατά τον X άξονα πάνω από τον ιστό. Καταγράψτε απόσταση από την θέση εκκίνησης και σήμα φθορισμού. Κατασκευάστε την γραφική παράσταση σήμα φθορισμού με θέση καταγραφής (mm). Τι παρατηρείτε;