Оптические методы диагностики

MRI/NIR IMAGING

Электронные переходы в

биомолекурахе стрелки — поглощательные и излучательные переходы, волнистые — безизлучательные переходы. Жирные горизонтальные линии — «чисто» электронные уровни энергив; тонкие — колебательные подуровни. Около каждого уровня в клетках (соответствующих разным орбиталям) показано направление спина возбужденного электрона по отношению к спину оставшегося электрона.

фосфоресценция

Флюоресценция

. .

S

S

Структуры типичных флуоресцирующих соединений







Хинин

Флуоресцеин

Родамин В

Антрацен

PP0

POPOP

Характеристики испускания флуоресценции

- Стоксов сдвиг
- Независимость спектра испускания от длины волны возбуждения
- Правило зеркальной симметрии и факторы Франка-Кондона
- Анизотропия флуоресценции

•
$$r = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + 2I_{\perp}}$$
; $P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$ $P = \frac{3r}{2 + r}$

- Типичное время поглощения 10^{-15}
- Время внутренней конверсии 10^{-12}
- Времена затухания флуоресценции 10 нс

Спектр поглощения молекулы отражает колебательную структуру возбужденных электронных состояний

Спектр испускания отражает колебательную структуру основного электронного состояния



поглощение света биосистемами



закон Бугера — Ламберта — Бера:

$$D = \lg \frac{J_0}{I} = \epsilon cI, \qquad (2.1)$$

где D — так называемая оптическая плотность образца, I_0 и I — интенсивности падающего и прошедшего света. Величину ε ($\pi \cdot \text{моль}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) называют молярным коэффициентом поглощения.



Рис. 1.7. Электронные переходы различных типов

Рис. 1.5. Полосы поглощения, соответствующие различным электронным переходам



Рис. 1.4. Зависимость положения длинноволнового максимума поглощения от числа сопряженных двойных связей (N) в молекуле:

 $I - \phi$ осфолипиды, выделенные из мозга (N=1); 2-окисленные фосфолипиды: диеновые конъюгаты $\lambda_{max} = 233$ нм (N=2), триеновые конъюгаты $\lambda_{max} = 270 - 280$ нм (N=3) и частично карбонильные соединения; 3-полностью-*тринс*ретиналь (N=6); 4-11-чис-ретиналь (N=6); 5-каротинонды (N=11)

Метка ^{ј)}	Поглощение		Испускание ²⁾			Чувс [.] тельн
	λ _{max} , HM	$\epsilon_{max} \times 10^{-3}$	λ _{пιах} , нм	Φ _F	r _F , нс	ε _{max} φ ₁ × 10
Дансилхлори д	330	3,4	510	0,1	13	3,4
1,5-I-AEDANS	360	6,8	480	0,5	15	34
Флуоресцеин- изотиоцианат (FITC)	495	42	516	0,3	4	116
8-анилино-1- нафтилсульфо- нат (ANS)	374	6,8	454	0,98	16	67
Пирен и его производные	342	40	383	0,25	100	100
Этеноаденозин и его производные	300	2,6	410	0,40	26	10

Время затухания флуоресценции дает детальную информацию о взаимодействии флуорофора с окружением. Измерение проводить сложно, поскольку порядок величин 10 нс.

Широко применяют два метода:

- импульсный
- фазово-модуляционный (гармонический)
- В импульсном методе изучают зависимость интенсивности флуоресценции от времени.
- В гармоническом методе образец возбуждают синусоидально модулированным светом. Фазовый сдвиг и степень демодуляции испускания по отношению к падающему свету используют для расчета времени затухания.

Деполяризация флуорисценции

Как правило, исходное излучение является поляризованным. Вторичное - флуоресцентное излучение - также является поляризованным (молекулы флуоресцирующих веществ оптически анизотропны). При этом, коэффициент, определяющий степень поляризации квантов флуоресценции может быть записан в следующем виде: $P = \frac{I_{\parallel} - I_{\perp}}{I_{\parallel} + I_{\perp}}$ В результате броуновского движения молекулы, её степень

поляризации меняется. Согласно теории Лёвшина-Перрена, степень поляризации флуоресценции может быть записана в виде:

 $\frac{1}{p} = \frac{1}{p_0} + \left(\frac{1}{p_0} - \frac{1}{3}\right) \frac{\tau_f}{\tau_r} \qquad \frac{3 \text{десь} \, \tau_f}{p_0} - \text{степень поляризации в условиях предельно вязкой среды (например, в глицерине).}$

Деполяризация флуорисценции

Главная причина ДФ – вращательная диффузия флуорофоров. Этот вид ДФ описывается уравнением Перрена. После возбуждения δ -импульсом кинетика затухания анизотропии r(t) для сферической молекулы описывается одноэкспоненциальным уравнением: $\mathbf{r}(t) = r_0 e^{-t/\varphi}$,

где φ (η , _R, T, V) — время вращательной корреляции флуорофора.

V- объем вращающей области. $\varphi = \frac{\eta V}{RT}$

Степень деполяризации связана с углом на который флуорофор поворачивается в возбужденном состоянии α

$$r=r_{\circ}(\frac{3\cos^{2}\alpha-1}{2})$$

Уравнение Перрена часто записывают в виде

$$\frac{r_0}{r} = 1 + 6R\tau$$

R – скорость вращения флуорофора.

ВАЖНО: затухание интенсивности флуоресценции не зависит от затухания ее анизотропии

Наиболее используемый зонд для оценки вязкости мембран DPH (высокий коэфф. экстинкции и предельная анизотропия постоянна в диап. 320-380 нм).

При исследовании белков выбор флуорофора определяется сопоставимостью времени затухания флуорисценции со временем вращательной корреляции белка. Откладывая на оси ординат 1/г или (1/P-1/3), а по оси абсцисс Т/п (вязкозть варьируют добавлением сахара) получают прямую линию, которая отсекает на оси ординат отрезок, равный 1/r₀. Тангенс угла наклона к оси абсцисс при известном значении Το позволяет определить величину молекулярного объема, и, наоборот, по известному молекулярному объему - определить значение среднего времени жизни возбужденного состояния исследуемых молекул. Используя эти данные, можно определить время вращательной релаксации (или разупорядочивания вследствие тепловой диффузии) ξ флуорофора по формуле: $4a^3 \pi \eta/3kT = V\eta/kT$, где a – эффективный гидродинамический радиус Эйнштейна V=4πа³/3

Широкое применение поляризации (анизотропии) нашло в количественной оценке реакций ассоциации биологических макромолекул. r = f_{своб}* r_{своб} + f связ * r связ, где f – доли флуоресценции. f связ = (r- r своб)/(r связ- r своб) Квантовый выход флуорофора часто при связывании изменяется: R = q связ/ q своб. Tогда общее выражение

$$f$$
 связ = $\frac{(r - r \, \text{своб})}{(r \, \text{связ} - r) * R + r - r \, \text{своб}}$

Импульсно-лазерная флуорометрия

Имея короткие лазерные импульсы, возможно изучать вращательную подвижность молекул в растворах по времени затухания поляризованной флуоресценции. Последнее связано с тем, что после действия лазерного импульса направления электрического диполя в основном и возбужденном состоянии практически совпадают, затем эта поляризация спадает до нуля, поскольку молекула совершает хаотическое вращательное движение. При этом уравнение диффузии: 1

$$\frac{dN}{dt} = D_r \nabla^2 N, \quad N = N_o \exp\left(-\frac{t}{\tau_r}\right)$$

$$D_r = \frac{1}{l(l+1)\tau_r} = \frac{1}{6\tau_r}$$

Импульсно-лазерная флуорометрия.



Анизотропия флуоресценции, в случае вращательной диффузии молекулы, дипольный момент которой в возбужденном состоянии поворачивается на угол ф, может быть рассчитана по следующей формуле:



ФАЗОВЫЕ И МОДУЛЯЦИОННЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ ВРЕМЕН ЗАТУХАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Образец возбуждают синусоидально модулированным светом. Испускание модулировано с той же круговой частотой. Из-за конечной величины времени жизни возбужденного состояния испускание отстает по фазе на угол φ. Испускание менее модулировано → степень демодуляции испускания по отношению к падающему свету m используют для расчета фазового и модуляционного времени.

$$tg\phi = \omega \tau^{p}; \quad \tau^{p} = \omega^{-1} tg\phi \quad m = \frac{B/A}{b/a} = [1 + \omega^{2}(\tau^{m})^{2}] - 4$$
$$m = [1 + \omega^{2}(\tau^{m})^{2}] - 4; \quad \tau^{m} = \omega^{-1}[(1/m^{2}) - 1]^{4}$$



При увеличении времени жизни фазовый угол увеличивается, а коэффициент демодуляции уменьшается. Определим связь между временем затухания флуоресценции и величинами фазового сдвига и демодуляции:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -\frac{1}{\tau}N(t) + f(t) = \omega B \cos(\omega t - \varphi)$$
$$m = \frac{B/A}{b/a} = [1 + \omega^2(\tau^m)^2] + s$$

Схема устройства ультразвукового модулятора Дебая-Сирса. 1- кристалл; 2 – окно; 3 – отражающая пластинка; 4 – линза; 5 – щель



Жидкая решетка появляется и исчезает с двойной частотой колебаний кристалла. Вышедший свет модулирован синусоидально, примерно на 50%.

Фоточувствительный метод

• Для затухания флуорисценции, описываемого одноэкспоненциальным законом: tg $\varphi = \omega \tau$; $m = (1 + \omega^2 \tau^2)^{-1/2}$;

Для двух флуорофоров А и В зависимость флуоресценции от t:

$$F(\lambda, t) = F_A(\lambda)m_A\sin(\omega t - \phi_A) + F_B(\lambda)m_B\sin(\omega t - \phi_B)$$

Модулированное испускание удобно исследовать с помощью фазочувствительного детектора или запираемого усилителя:

$$F(\lambda, \phi_D) = F_A(\lambda) m_A \cos(\phi_D - \phi_A) + F_B(\lambda) m_B \cos(\phi_D - \phi_B)$$

Детектор фазы подбирают в противофазе с одной из компонент.

Блок-схема флуорометра с фазочувствительным детектором.

М – монохроматоры МДС – Модулятор Дебая-Сирса Ф – фильтры, Ст – эталонный флуорофор











4-2. Предположим, что флуоресцентный зонд 1-диметиламино-5-нафталинсульфоновая кислота (DNS) связан с молекулой сывороточного альбумина (BSA). Предположим далее, что квантовый выход флуоресценции DNS увеличивается при связывании в два раза и что времена затухания для свободной и связанной форм равны соответственно 5 и 10 нс. Используйте следующие данные для расчета процентного содержания свободной DNS и связанной с молекулой альбумина в случае. последнего из указанных ниже растворов:

ИнтенсивностьФазочувствительной флуоресценции приОбразец $\Phi_D = 17, 4^\circ + 90^\circ$ $\Phi_D = 32, 1^\circ - 90^\circ$ DNS (10⁻⁵ M)01,0DNS (10⁻⁵ M) + избыток BSA1,7760DNS (10⁻⁵ M) + 10⁻⁶ M BSA0,8860,50

Дж. Лакович

1.1

ОСНОВЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Типы рассеивающих взаимодействий света с биотканью



1 - баллистические фотоны (проходящие без рассеяния), 2 - рассеяние под большими углами, 3 - однократное рассеяние назад, 4 - отражение строго назад, при котором происходит искажение фазового фронта волны за счет перепада показателя преломления среды, 5 - рассеяние под малыми углами

Диффузия фотонов

С появлением импульсных лазеров сверхкороткой длительности (наносекундных и фемптосекундных) стало возможным наблюдать диффузию фотонов во временной кинетике. Временная зависимость такой диффузии имеет следующий вид:

Первым (5) появляется сигнал от прямо прошедших (баллистических фотонов). Далее растущая амплитуда сигнала связана с рассеянными фотонами под большими углами (4).



Спадающая амплитуда характеризует рассеяние фотонов под малыми углами (3)- диффузный компонент. Эти фотоны позволяют увидеть неоднородность ткани, связанной с новообразованиями. Математически весь процесс можно записать в виде уравнения:

$$A(t) = \delta(t_0) + a \exp(k_1 t) t^{\frac{3}{5}} + b \exp(-k_2 t)$$

Используя нестационарную теорию переноса излучения (ТПИ) можно проанализировать временной отклик рассеивающих тканей. Такой анализ важен для обоснования оптических медицинских технологий, использующих измерения отражения или пропускания биоткани с разрешением во времени, когерентные методы, основанные на баллистических или отраженных фотонах. В общем виде нестационарное уравнение ТПИ имеет вид:

$$\frac{\partial}{\partial S}I(\bar{r},\bar{s},t) + t_2\frac{\partial}{\partial t}I(\bar{r},\bar{s},t) = -\mu_t I(\bar{r},\bar{s},t) + \frac{\mu_s}{4\pi}\int_{4\pi} \left[\int_{-\infty}^t I(\bar{r},\bar{s}',t') f(t,t')dt'\right]p(\bar{s},\bar{s}')d\Omega'.$$

В общем виде уравнение переноса излучения имеет вид:

$$\frac{1}{c} \frac{\partial I(\overset{\boxtimes}{r}, t, \overset{\boxtimes}{e_s})}{\partial t} + \overset{\boxtimes}{e_s} \cdot \nabla I(\overset{\boxtimes}{r}, t, \overset{\boxtimes}{e_s}) + (\mu_a + \mu_s)I(\overset{\boxtimes}{r}, t, \overset{\boxtimes}{e_s})$$
$$= \mu_s \int f(\overset{\boxtimes}{e_s}, \overset{\boxtimes}{e_s})I(\overset{\boxtimes}{r}, t, \overset{\boxtimes}{e_s})d^2\overset{\boxtimes}{e_s} + q(\overset{\boxtimes}{r}, t, \overset{\boxtimes}{e_s})$$

Временное диф^{*/}фузионное уравнение:

$$\frac{1}{c}\frac{\partial\phi(\overset{\boxtimes}{r},t)}{\partial t} - \nabla \cdot k(\overset{\boxtimes}{r})\nabla\phi(\overset{\boxtimes}{r},t) + \mu_{a}\phi(\overset{\boxtimes}{r},t) = q_{0}(\overset{\boxtimes}{r},t) \qquad \phi(\overset{\boxtimes}{r},t) = \int_{4\pi} I(\overset{\boxtimes}{r},t,\overset{\boxtimes}{e}_{s})d^{2}\overset{\boxtimes}{e}_{s}$$

Упрощенная диффузионная модель при освещении незатухающей волной (CW): $\mu_a \phi(\overset{\boxtimes}{r}) - \nabla \cdot k(\overset{\boxtimes}{r}) \nabla \phi(\overset{\boxtimes}{r}) = q_0(\overset{\boxtimes}{r})$ $\phi_o = \frac{\phi_i}{4\pi D |\overset{\boxtimes}{r} - \overset{\boxtimes}{r}_i|} \exp(-\mu_{e\!f\!f} |\overset{\boxtimes}{r} - \overset{\boxtimes}{r}_s|) - \frac{\phi_i}{4\pi D |\overset{\boxtimes}{r}_{s'} - \overset{\boxtimes}{r}|} \exp(-\mu_{e\!f\!f} |\overset{\boxtimes}{r}_{s'} - \overset{\boxtimes}{r}|)$ Основное диффузионное уравнение для получения изображ

$$\nabla D(r)\nabla\Phi - \left(\mu_a \Phi + \frac{i\omega}{c}\right)\Phi = -S_0\delta \qquad \begin{cases} \Phi(r,\omega) \\ S_0(\omega) \\ \delta(r-r_0) \end{cases} D = \frac{1}{\mu'_s}$$
$$\Phi = \frac{S_0}{4\pi Dr} e^{-\left[\frac{3\mu_a}{D} + \frac{i\omega}{cD}\right]}$$

 Теоретическое развитие метода привело к появлению нового типа волн – волн фотонной плотности. В сильно рассеивающих средах с малым поглощением вдали от стенок, приемника и источника излучения распространение света может рассматриваться как затухающий диффузный процесс, описываемый временным диффузионным уравнением для плотности фотонов

$$(\nabla^2 - c\mu_a D^{-1} - D^{-1} \frac{\partial}{\partial t}) \cdot U(\bar{r}, t) = -\dot{Q}(\bar{r}, t),$$

Применение флуоресценции в клинической практике

фотодинамическая
терапия

 флуоресцентная диагностика

Метод флуоресцентной диагностики основан на:

- 1. различие интенсивности и спектрального состава собственной флюоресценции здоровой и опухолевой ткани
- 2. избирательное накопление фотосенсибилизатора в ткани новообразования и его обнаружение

Методы анализа флуоресценции биологических тканей:

- 1. Точечная (локальная) спектрофотометрия
- 2. Регистрация панорамных флуоресцентных изображений

Главные хромофоры тканей

Хромофор	Поглощение	Флуоресценция	Положение максимумов
Оксигемоглобин	УФ-Вид	Нет	412, 542, 577
Дезоксигемоглобин	УФ-Вид	Нет	430, 555, 760
Меланин	УФ-Вид	Нет (ИК?)	Монотонное возрастание в синюю область
ДНК/РНК	УФ	Нет	260
МочевUrocanic acid	УФ	Нет	280
Порфирины	Вид	Да	Ex: ~405; Em: 600
Билирубин	Вид	Да	460
Триптофанил белка	УФ	Да	Ex: 295; Em: 340–350
НАД/НАДН+	УФ	Да	Ex: ~350; Em: 460
ФАД (окисл.)	УФ-Вид	Да	Ex: 370; Em: 530
ФМН (окисл.)	УФ-Вид	Дa	Ex: 445: Em: 530
Сшивки коллагена	УФ	Дa	Ex: 335, 370; Em: 380, 460
Сшивки эластина	УФ-Вид	Да	Ex: 420, 460; Em: 500, 540
Кератин (сухой)	УФ	Да	Ex: 370; Em: 460





ĊH₃



n= 0-6

фотофрин



радахлорин

аласенс





Спектр флюоресценции здоровой ткани

Спектр флюоресценции участка с избыточным накоплением фотосенсибилизатора



Установки

Назначение:

- Фотодинамическая терапия рака и деструктивно-воспалительных заболеваний
- Коагуляция патологических тканей и сосудов.
- Лазерный скальпель для локальных иссечений и взятия биопсии
- Лечение пигментных и сосудистых поражений кожи в дерматологии и косметологии.



Диффузная флуоресцентная томография (ДФТ).



Рис. 2. Прижизненное ДФТ-изображение мыши. Светлые области соответствуют высокому, а темные – низкому уровню сигнала Внешний вид блока сканирования опытного образца ДФТ-установки.



Fig. 1. Fast scanning fluorescence tomography system. The mouse subject is suspended and held in light compression between two movable windows (W1 and W2). Light from a laser diode at 785 nm (LD) is collimated and passes through a 95/5 beam splitter (BS). A reference Photodiode (PD) collects 5% of the beam. The main 95% beam passes through lens (L1) into a XY galvo scanning system (XYGal). The mirror pair scans the beam onto the illumination window (W1) of the imaging tank. Light emitted from W2 is detected by an EMCCD via a filter (F1) and lens system (L2).

ЛАЗЕРНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА СТАДИЙ ВОЗРАСТНОЙ КАТАРАКТЫ



Математическая обработка – метод Монте-Карло



ИК диапазон

Ближняя инфракрасная томография

В 1951 В. Chance предложил модель, позволяющую диагностировать процессы канцерогенеза в молочной железе по соотношению окси- и дезоксигемоглобина.

Характеристики канцерогенеза:

- 1. Повышение на участке ткани гемоглобина
- 2. При снижении насыщения кислородом
- 3. Повышение фракции воды
- 4. Уплотнение данного участка ткани.

NIR Imaging spectrometer

Diagnosis

Near Infra-Red Imaging as a cancer diagnostic



A Portable Near Infrared Imager for Breast Cancer Diagnosis



Cheng, X., X. Xu, et al., Optical imaging system with direct image reconstruction, US patent, 09/778,617, 2001.



Представленные кривые показывают области характеристического поглощения света дезокси- и оксигемоглобином на различных длинах волн и характеризуют механизмы кровоснабжения биотканей, при этом хорошо видны характерные максимумы и минимумы спектров поглощения, что используется для диагностики патологических состояний, включая рак молочной железы.



правая

левая









Персональный детектор рака груди



Dual Wavelength LED Silicon Diode Detector

