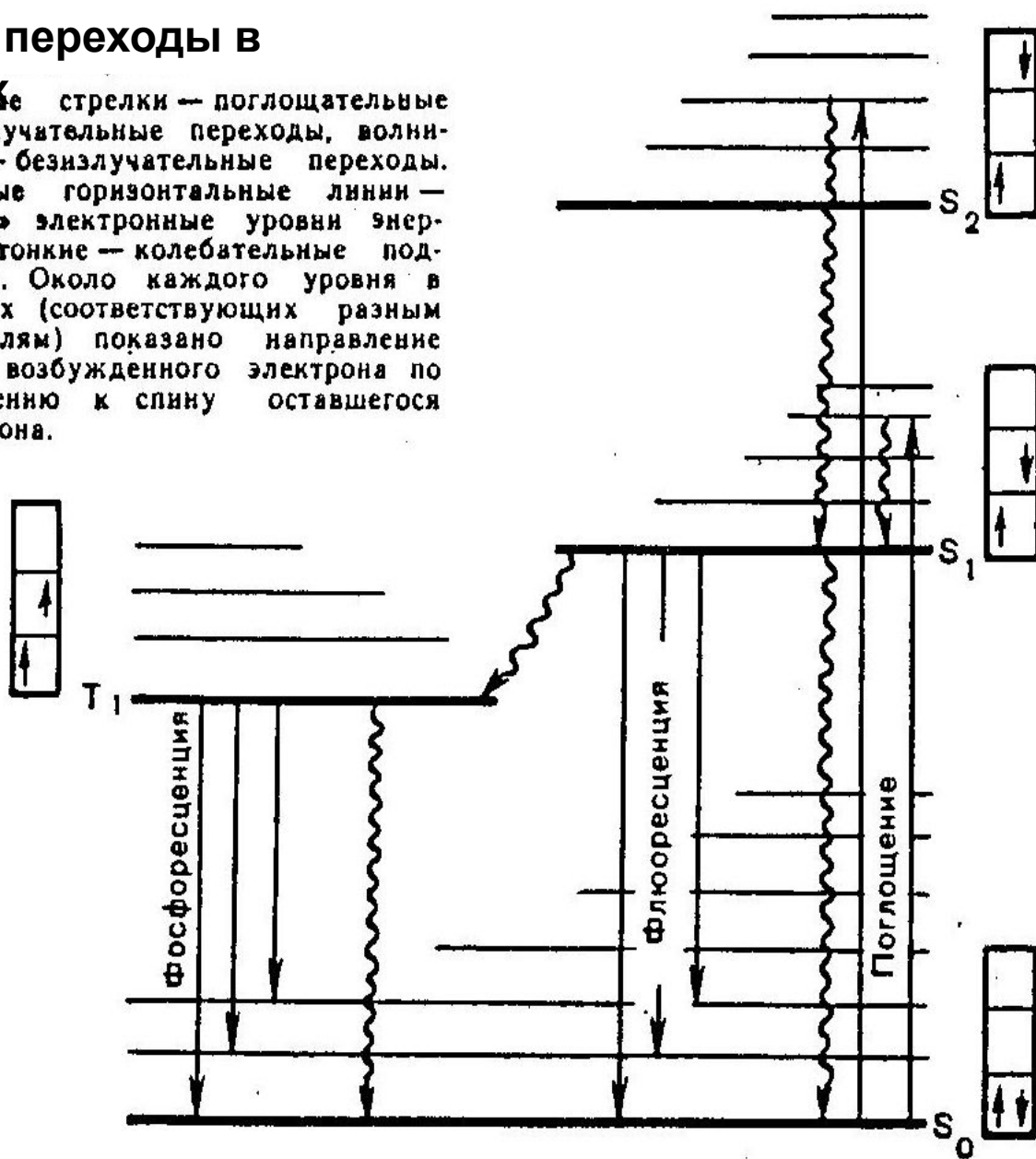


Оптические методы диагностики

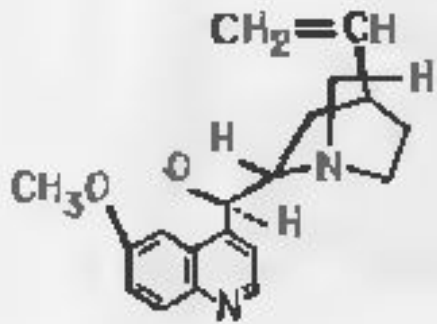
MRI/NIR IMAGING

Электронные переходы в биомолекулах

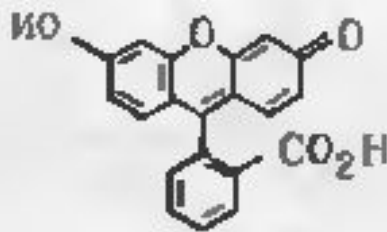
Угловые стрелки — поглощательные и излучательные переходы, волнистые — безизлучательные переходы. Жирные горизонтальные линии — «чисто» электронные уровни энергии; тонкие — колебательные подуровни. Около каждого уровня в клетках (соответствующих разным орбиталям) показано направление спина возбужденного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



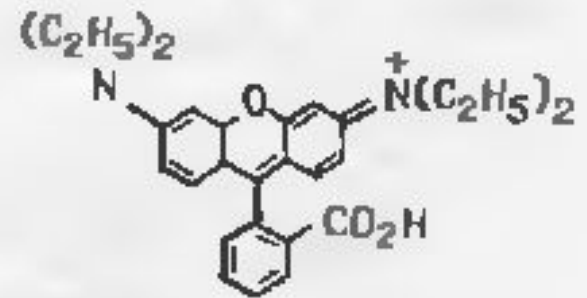
Структуры типичных флуоресцирующих соединений



Хинин



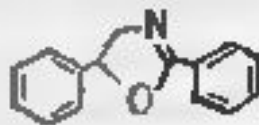
Флуоресцеин



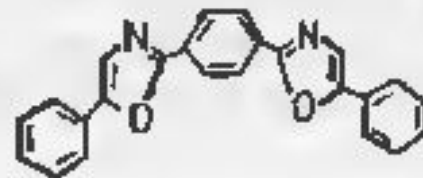
Родамин В



Антрацен



PPO



POPOP

Характеристики испускания флуоресценции

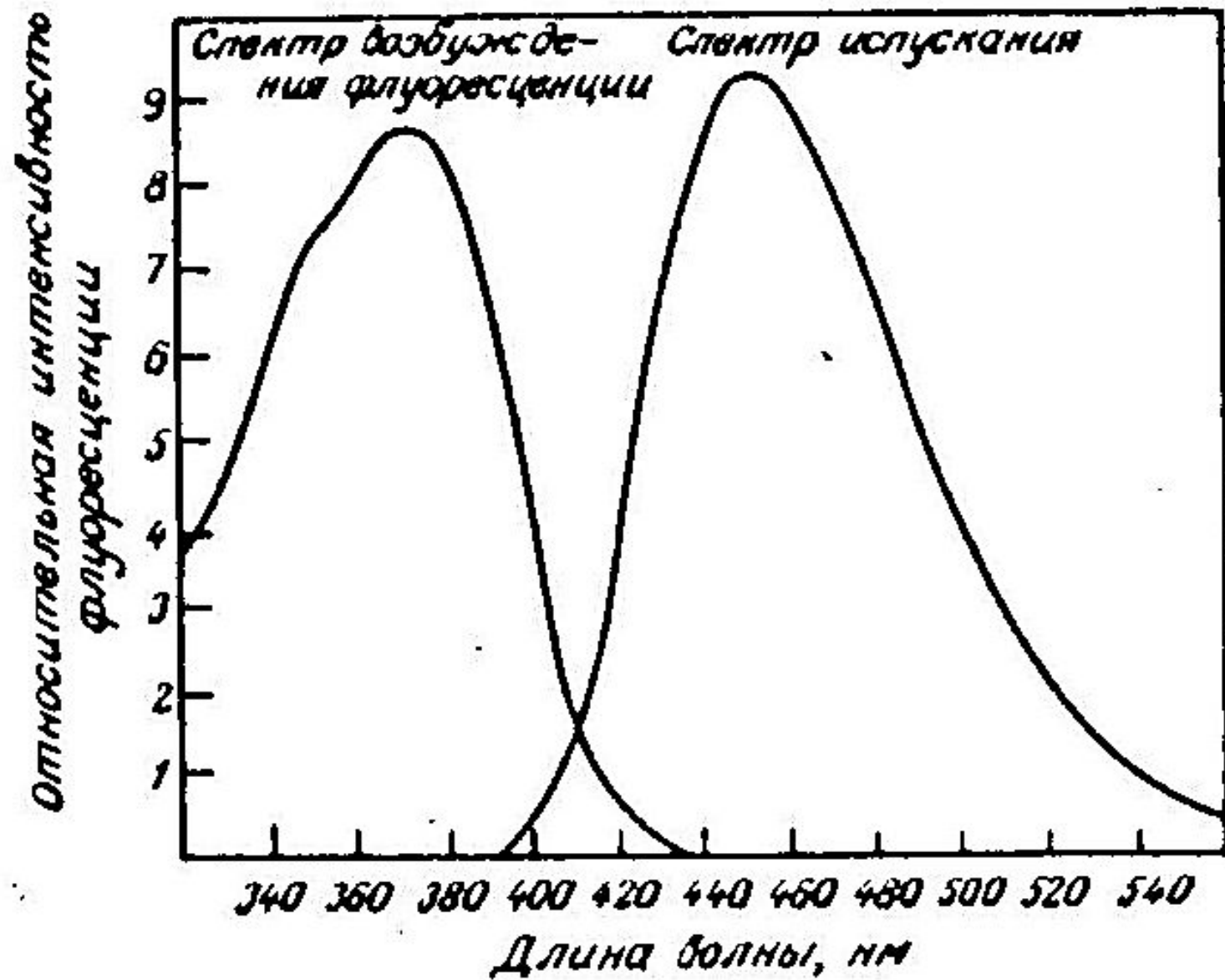
- Стоксов сдвиг
- Независимость спектра испускания от длины волны возбуждения
- Правило зеркальной симметрии и факторы Франка-Кондона
- Анизотропия флуоресценции

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

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

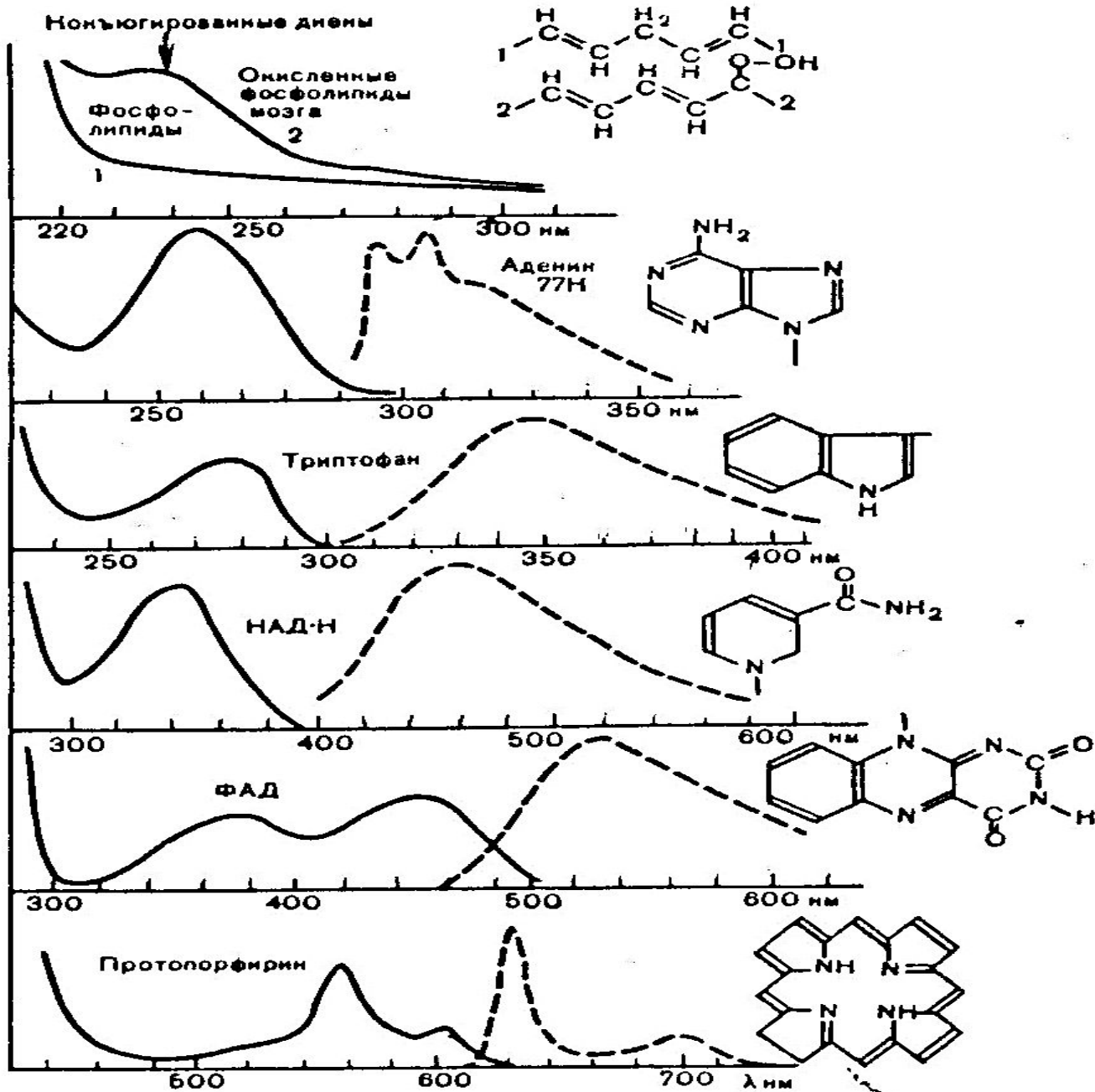
Спектр поглощения молекулы отражает колебательную структуру возбужденных электронных состояний

Спектр испускания отражает колебательную структуру основного электронного состояния



Спектры испускания и возбуждения флуоресценции ANS

ПОГЛОЩЕНИЕ СВЕТА БИОСИСТЕМАМИ



закон Бугера — Ламберта — Бера:

$$D = \lg \frac{I_0}{I} = \epsilon cl, \quad (2.1)$$

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

$$f_{\text{max}} = 4,32 \cdot 10^{-9} \int_{\bar{\nu}_m}^{\bar{\nu}_n} \epsilon(\bar{\nu}) d\bar{\nu}.$$

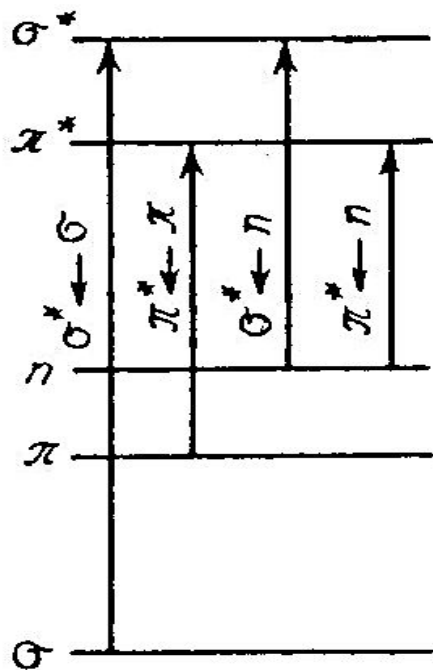


Рис. 1.7. Электронные переходы различных типов

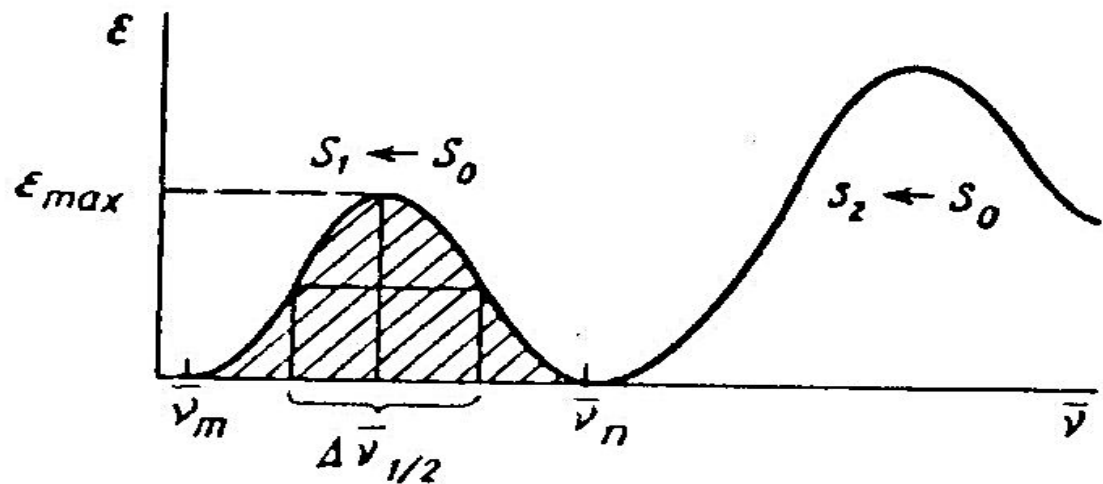


Рис. 1.5. Полосы поглощения, соответствующие различным электронным переходам

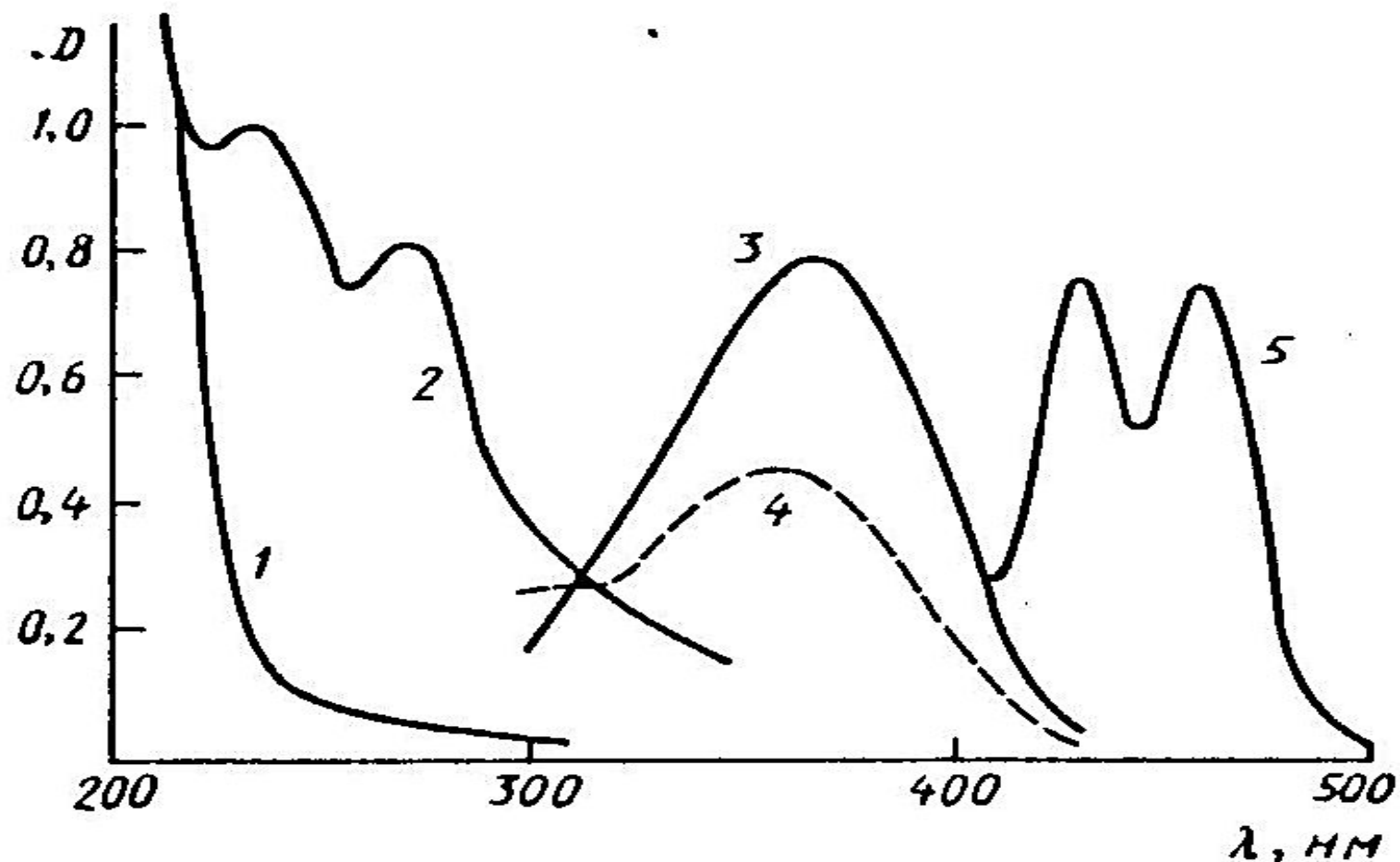


Рис. 1.4. Зависимость положения длинноволнового максимума поглощения от числа сопряженных двойных связей (N) в молекуле:

1 — фосфолипиды, выделенные из мозга ($N=1$); 2 — окисленные фосфолипиды: диеновые конъюгаты $\lambda_{\text{max}}=233$ нм ($N=2$), триеновые конъюгаты $\lambda_{\text{max}}=270-280$ нм ($N=3$) и частично карбонильные соединения; 3 — полностью-*транс*-ретинаяль ($N=6$); 4 — *11-цис*-ретинаяль ($N=6$); 5 — каротиноиды ($N=11$)

Метка ¹⁾	Поглощение		Испускание ²⁾			Чувствительность
	λ_{\max} , нм	$\epsilon_{\max} \times 10^{-3}$	λ_{\max} , нм	ϕ_F	τ_F , нс	$\epsilon_{\max} \phi_I \times 10^3$
Дансилхлорид	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 (<u>ANS</u>)	374	6,8	<u>454</u>	0,98	<u>16</u>	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:

$$\frac{1}{P} = \frac{1}{P_0} + \left(\frac{1}{P_0} - \frac{1}{3} \right) \frac{\tau_f}{\tau_r}$$

Здесь τ_f - время жизни флуоресцентного уровня
 P_0 - степень поляризации в условиях предельно вязкой среды (например, в глицерине).

$$\tau_r = \frac{V\eta}{kT}$$

- время корреляции вращательного броуновского движения

В отсутствие вращательной диффузии и безизлучательного переноса анизотропия:

$$r_0 = \frac{2}{5} \left(\frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{2} \right)$$

Уравнение Перрена приобретает вид:

$$\frac{r_0}{r} = 1 + \frac{\tau_f}{\tau_r}$$

Деполаризация 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: $r(t) = r_0 e^{-t/\varphi}$,

где φ (η, R, T, V) – время вращательной корреляции флуорофора.

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

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

$$r = r_0 \left(\frac{3 \cos^2 \alpha - 1}{2} \right)$$

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 $1/r$ или $(1/P-1/3)$, а по оси абсцисс T/η (вязкость варьируют добавлением сахара) получают прямую линию, которая отсекает на оси ординат отрезок, равный $1/r_0$. Тангенс угла наклона к оси абсцисс при известном значении T_0 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 $V = 4\pi a^3 / 3$

Широкое применение поляризации (анизотропии) нашло в количественной оценке реакций ассоциации биологических макромолекул.

$r = f_{\text{своб}} * r_{\text{своб}} + f_{\text{связ}} * r_{\text{связ}}$, где f – доли флуоресценции.

$$f_{\text{связ}} = (r - r_{\text{своб}}) / (r_{\text{связ}} - r_{\text{своб}})$$

Квантовый выход флуорофора часто при связывании изменяется: $R = q_{\text{связ}} / q_{\text{своб}}$.

Тогда общее выражение

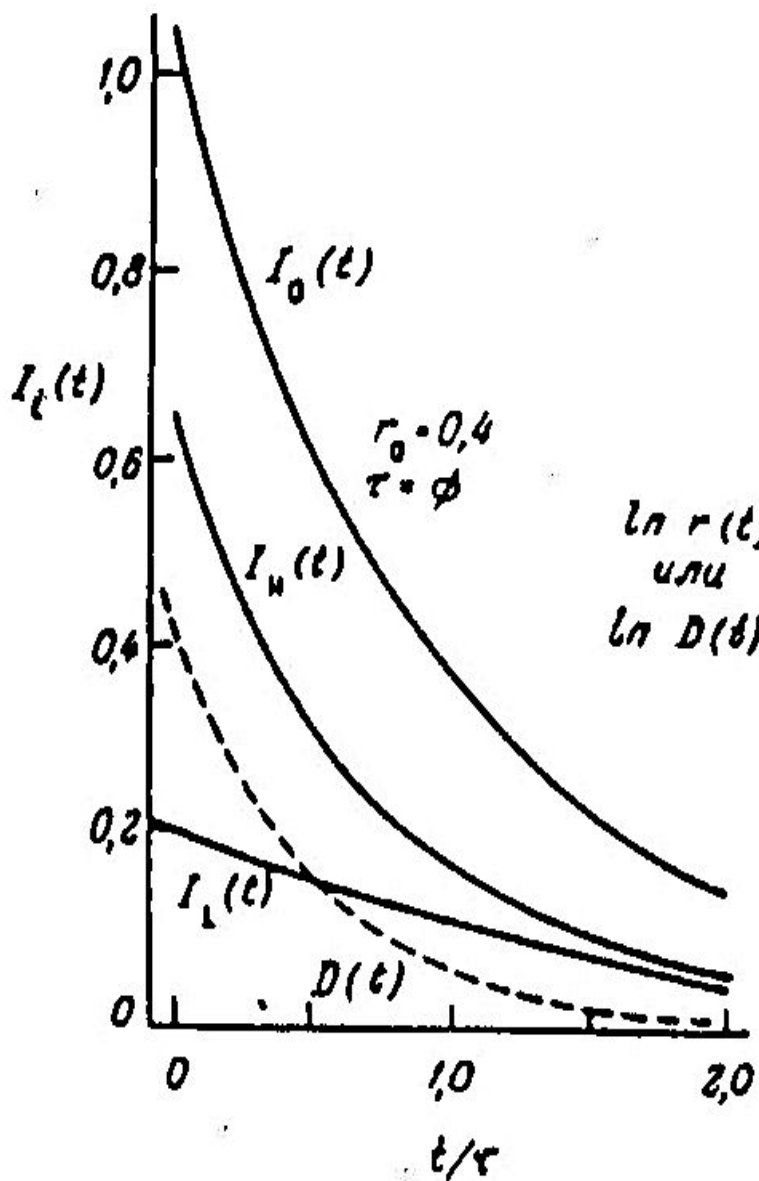
$$f_{\text{связ}} = \frac{(r - r_{\text{своб}})}{(r_{\text{связ}} - r) * R + r - r_{\text{своб}}}$$

Импульсно-лазерная флуорометрия

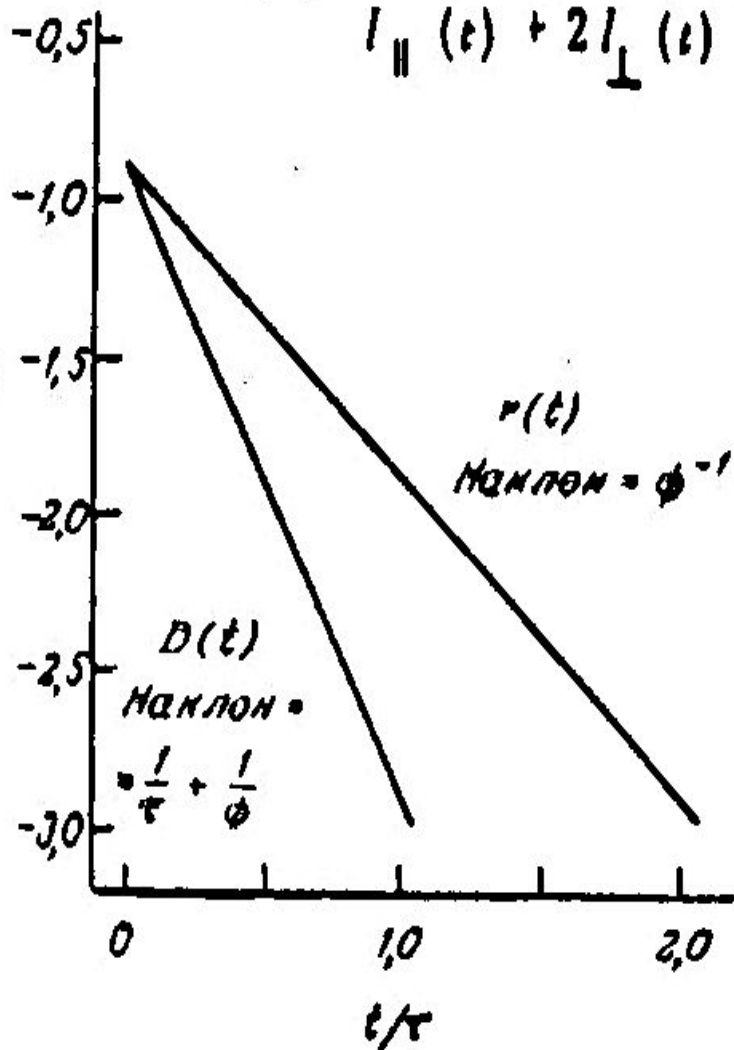
Имея короткие лазерные импульсы, возможно изучать вращательную подвижность молекул в растворах по времени затухания поляризованной флуоресценции. Последнее связано с тем, что после действия лазерного импульса направления электрического диполя в основном и возбужденном состоянии практически совпадают,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

$$D_r = \frac{1}{l(l+1)\tau_r} = \frac{1}{6\tau_r} \quad \frac{dN}{dt} = D_r \nabla^2 N, \quad N = N_o \exp\left(-\frac{t}{\tau_r}\right)$$

Импульсно-лазерная флуорометрия.

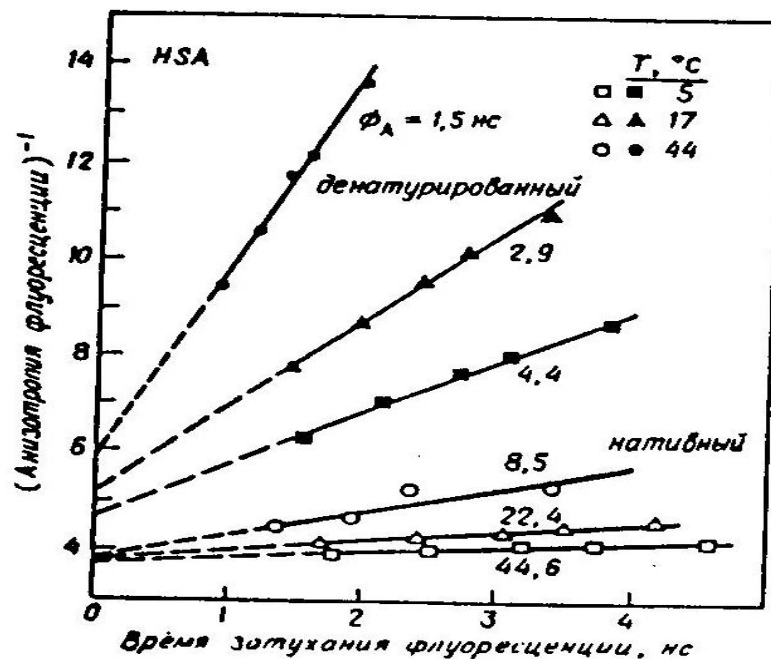
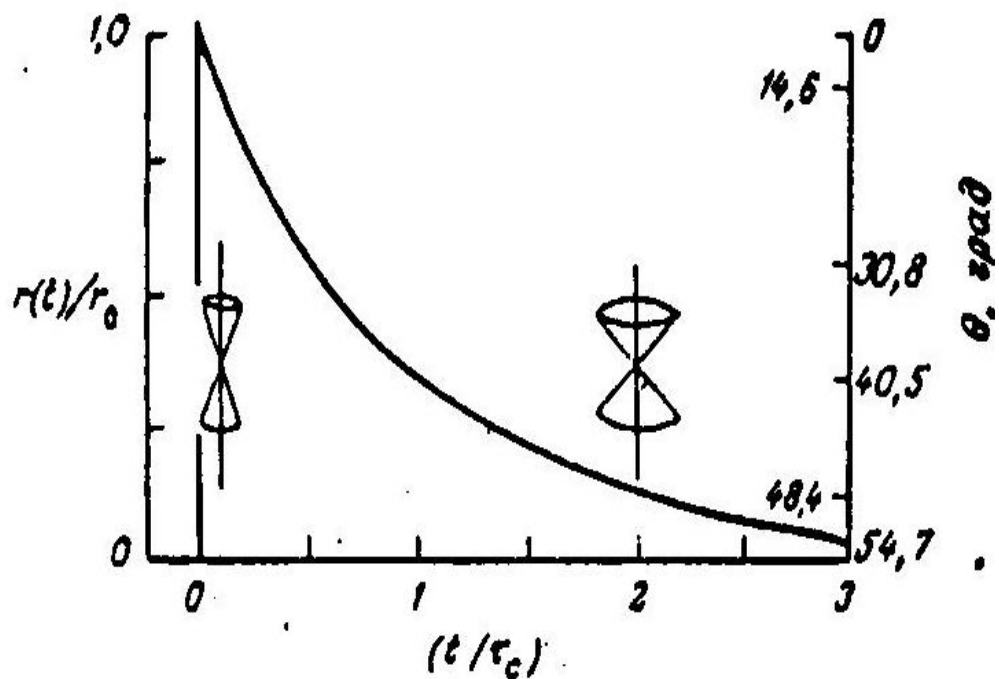


$$r(t) = \frac{I_{||}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{||}(t) + 2I_{\perp}(t)} = \frac{D(t)}{I_0(t)}$$



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

$$r(t) = \frac{2}{5} \exp\left(-\frac{t}{\tau_r}\right) \left[\frac{3 \cos^2 \varphi - 1}{2} \right]$$

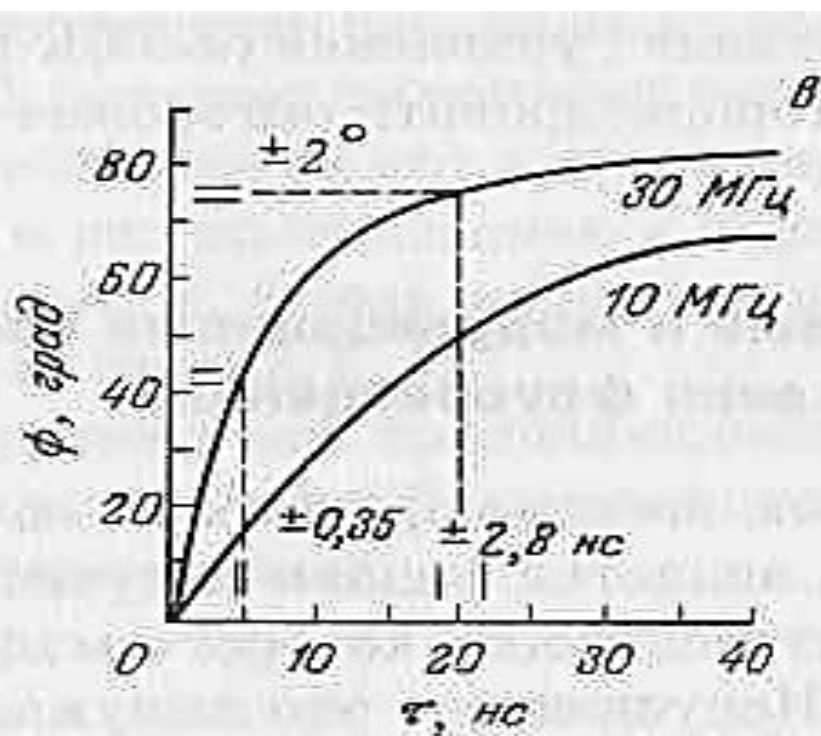
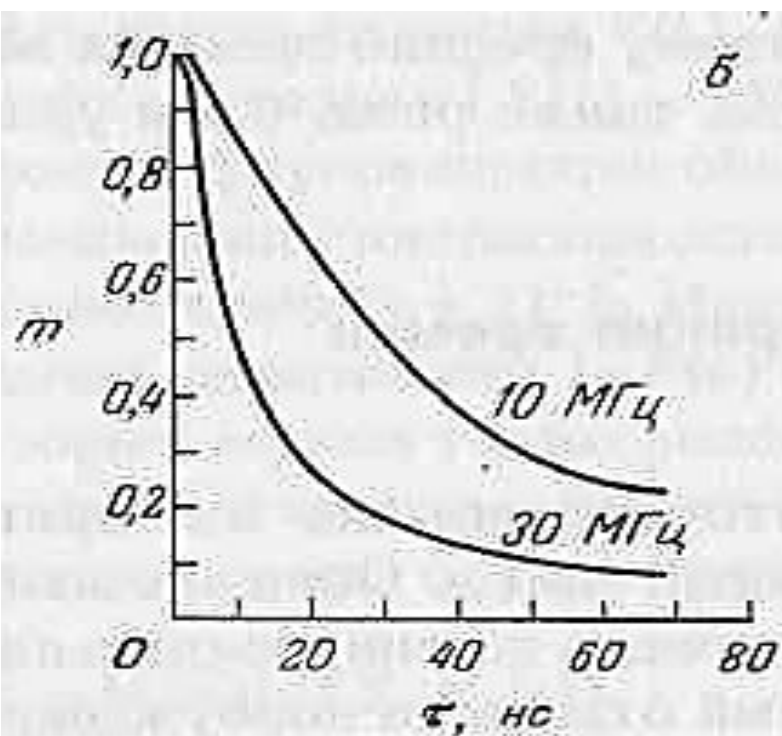
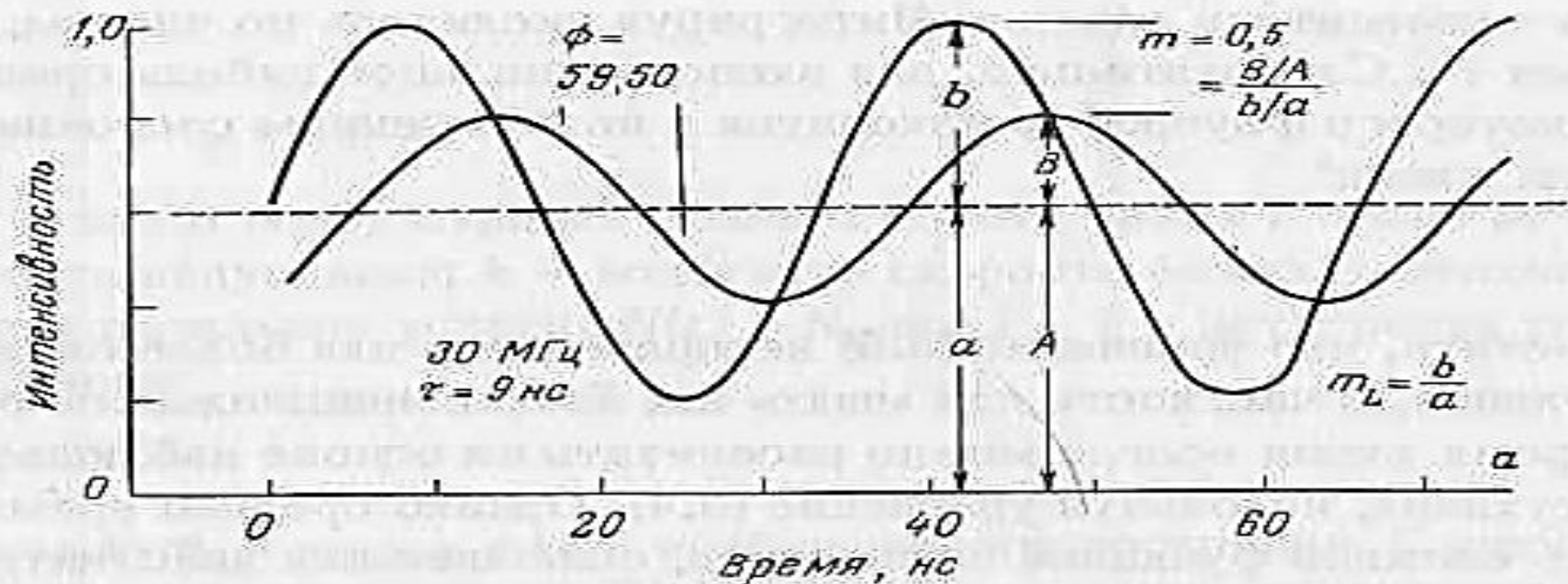


ФАЗОВЫЕ И МОДУЛЯЦИОННЫЕ ИЗМЕРЕНИЯ ВРЕМЕН ЗАТУХАНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

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 \rightarrow степень демодуляции испускания по отношению к падающему свету m используют для расчета фазового и модуляционного времени.

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

$$m = [1 + \omega^2 (\tau^m)^2]^{-1/2}; \quad \tau^m = \omega^{-1} [(1/m^2) - 1]^{1/2}$$



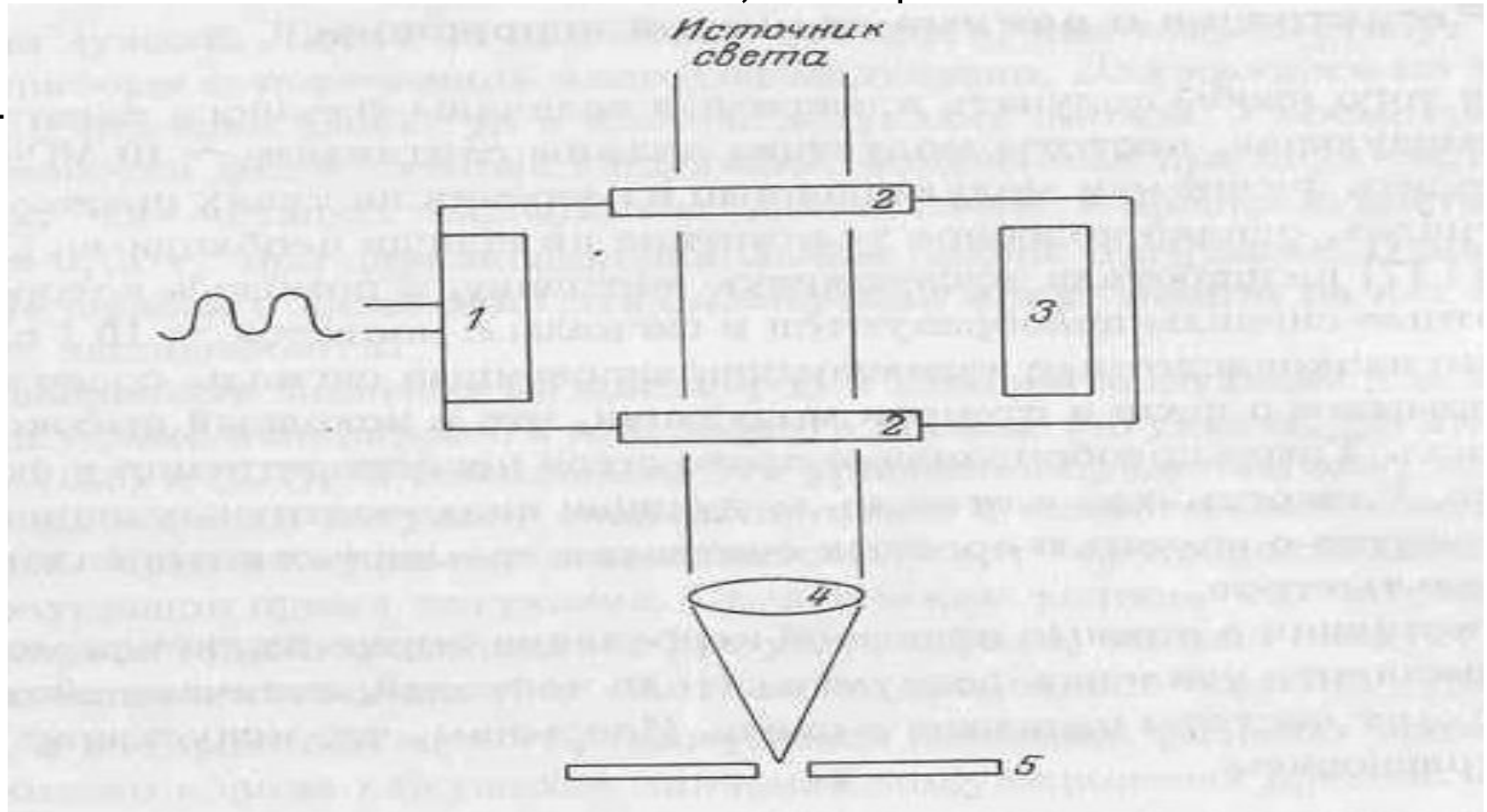
При увеличении времени жизни фазовый угол увеличивается, а коэффициент демодуляции уменьшается.

Определим связь между временем затухания флуоресценции и величинами фазового сдвига и демодуляции:

$$\frac{dN(t)}{dt} = -\frac{1}{\tau} N(t) + f(t) = \omega B \cos(\omega t - \varphi)$$

$$m = \frac{B/A}{b/a} = [1 + \omega^2(\tau m)^2]^{-1/2}$$

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 одно-экспоненциальным законом: $\operatorname{tg} \varphi = \omega\tau$; $m = (1 + \omega^2\tau^2)^{-1/2}$;

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:

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

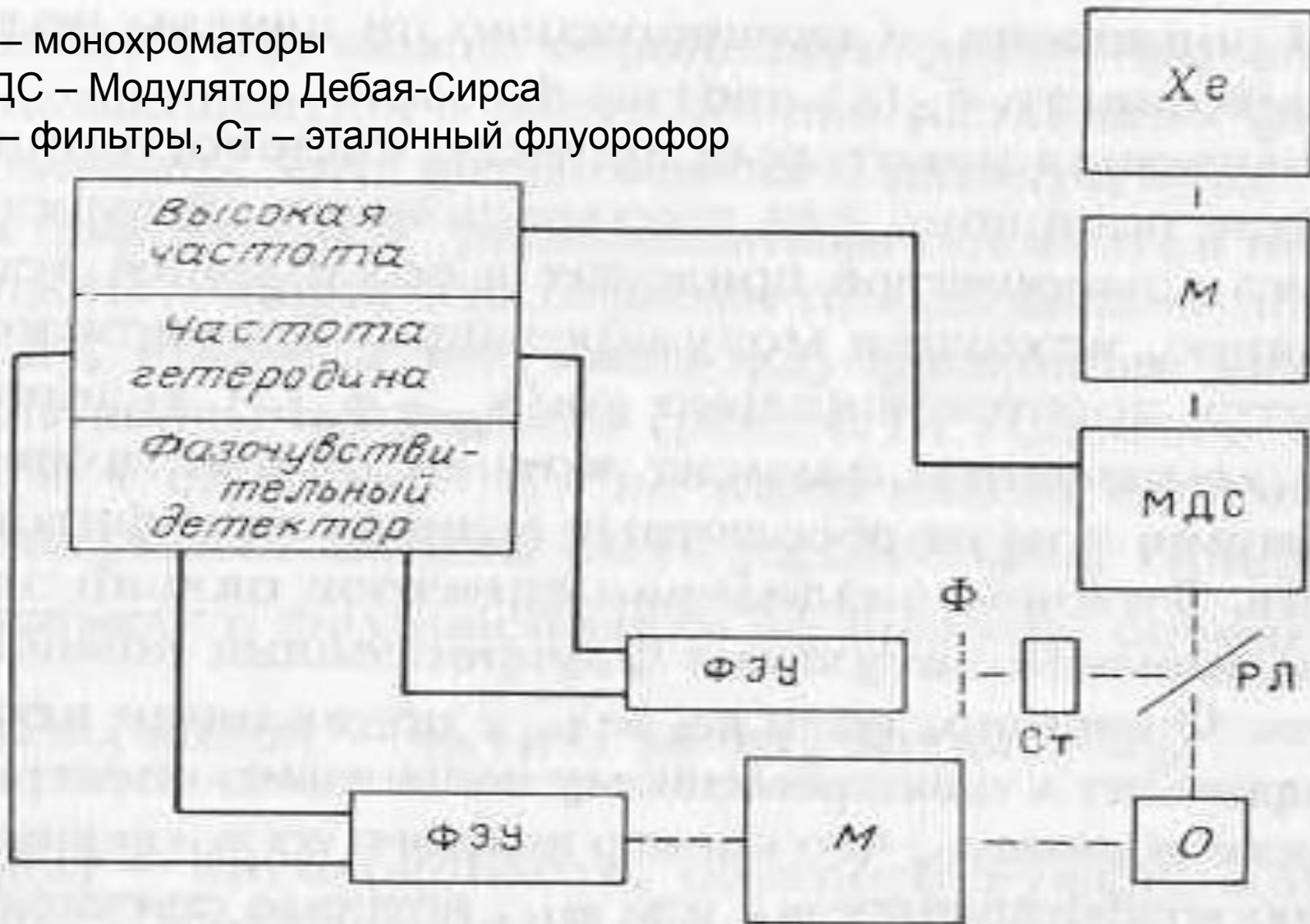
Детектор фазы подбирают в противофазе с одной из компонент.

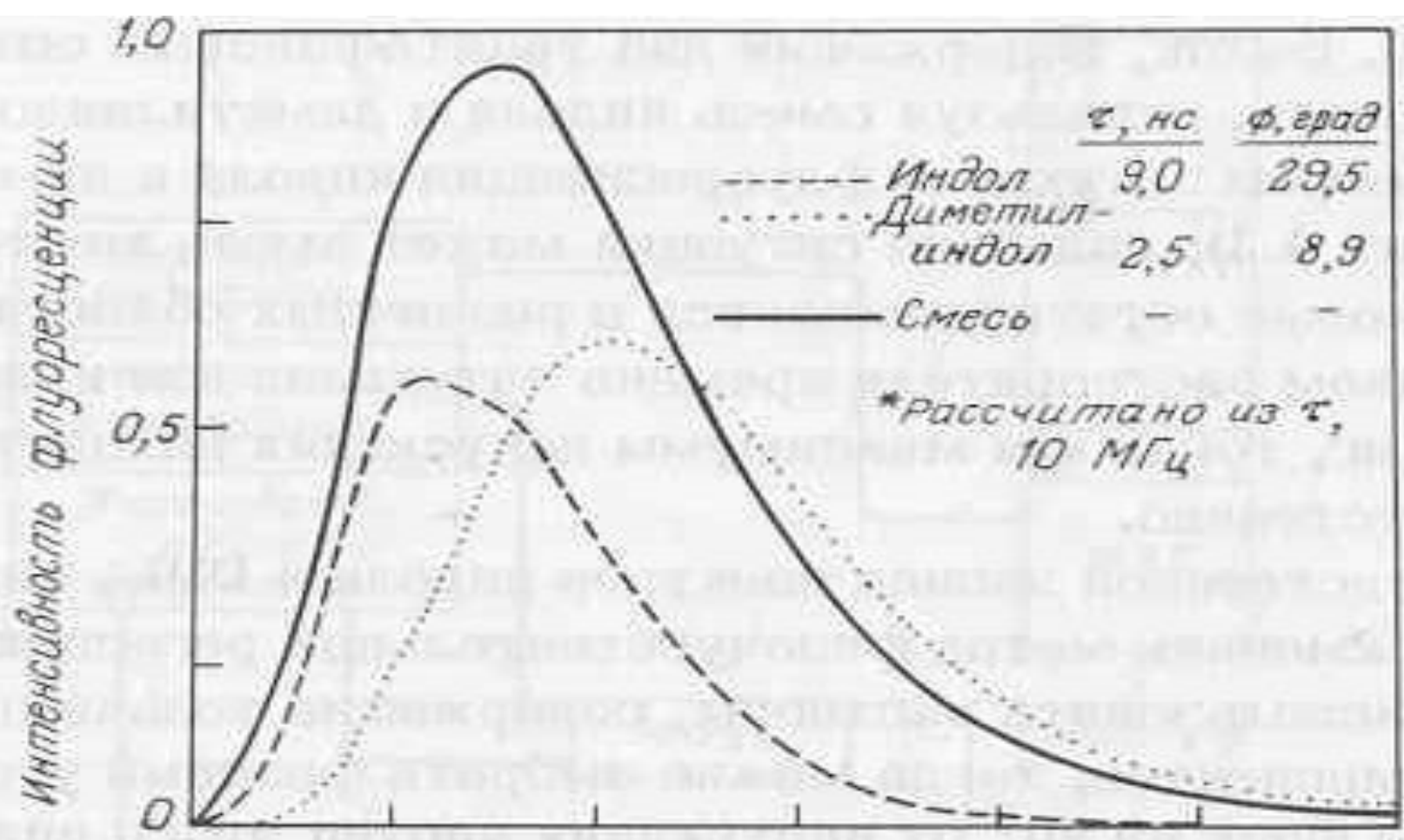
Блок-схема флуорометра с фазочувствительным детектором.

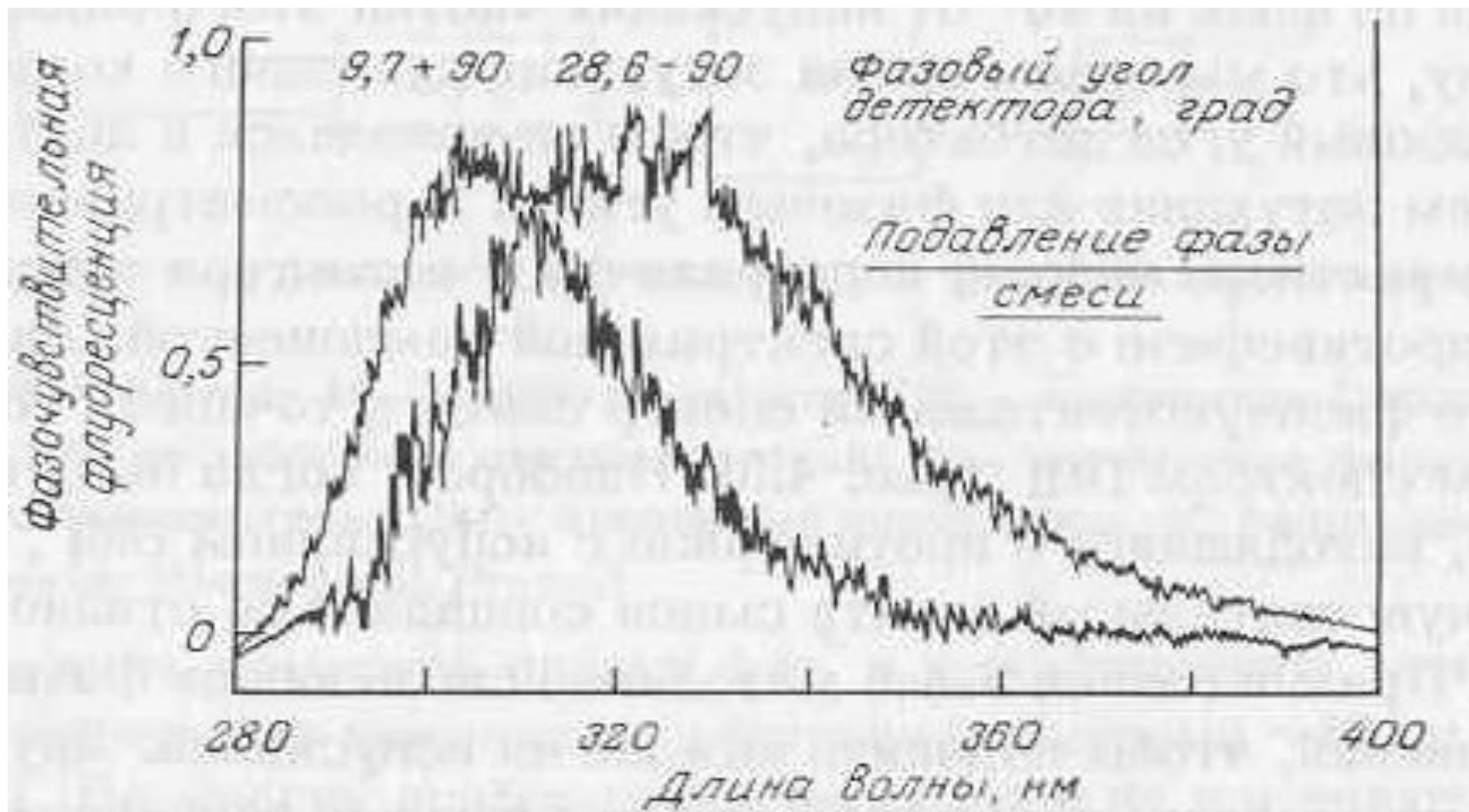
М – монохроматоры

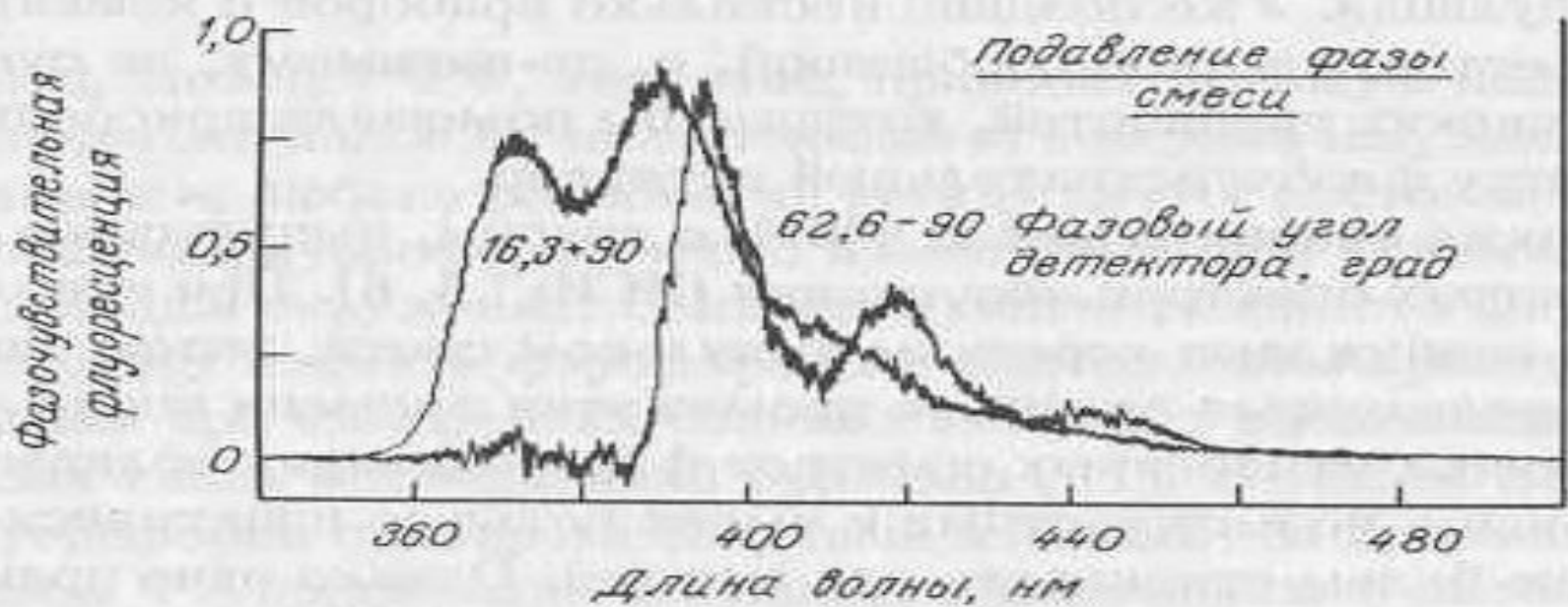
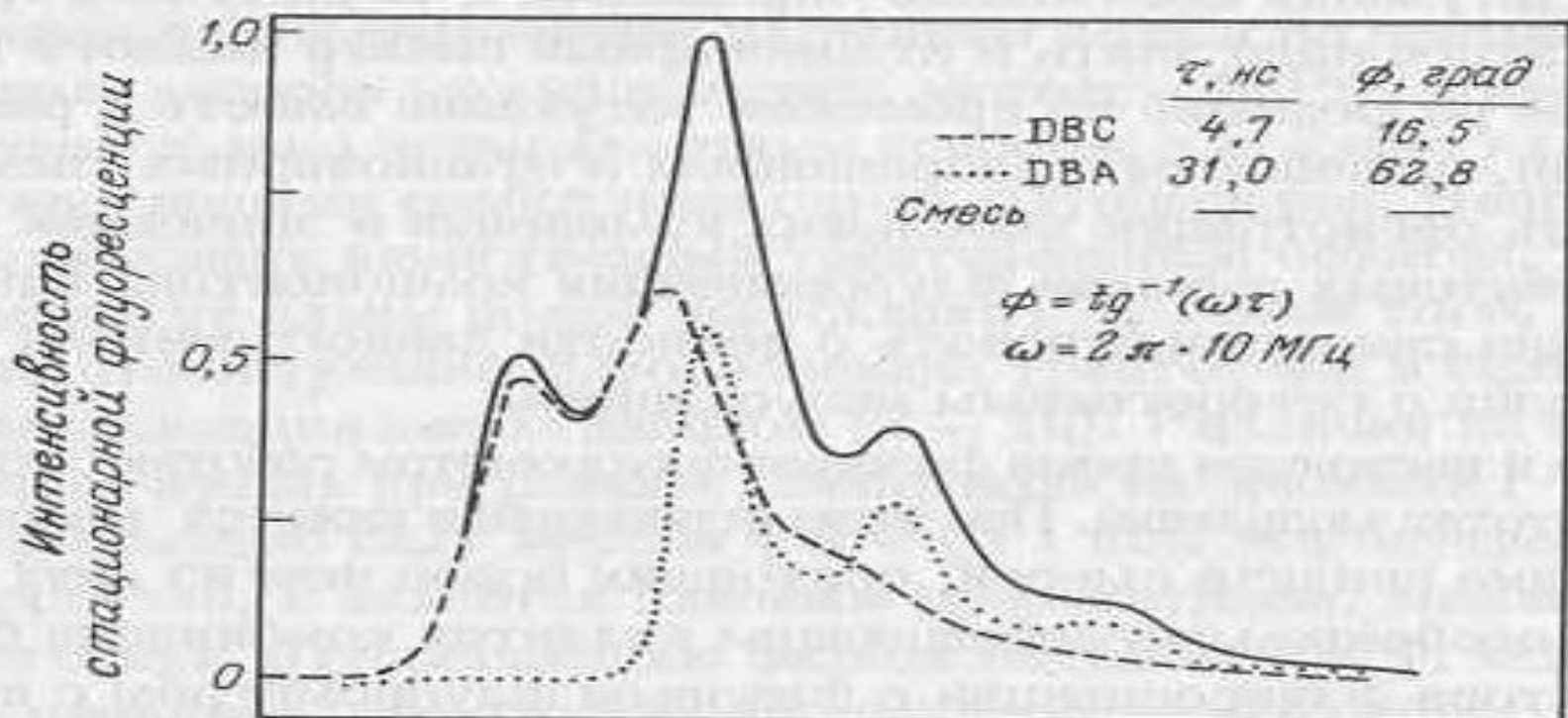
МДС – Модулятор Дебая-Сирса

Ф – фильтры, Ст – эталонный флуорофор









4-2. Предположим, что флуоресцентный зонд 1-диметиламино-5-нафталин-сульфоная 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:

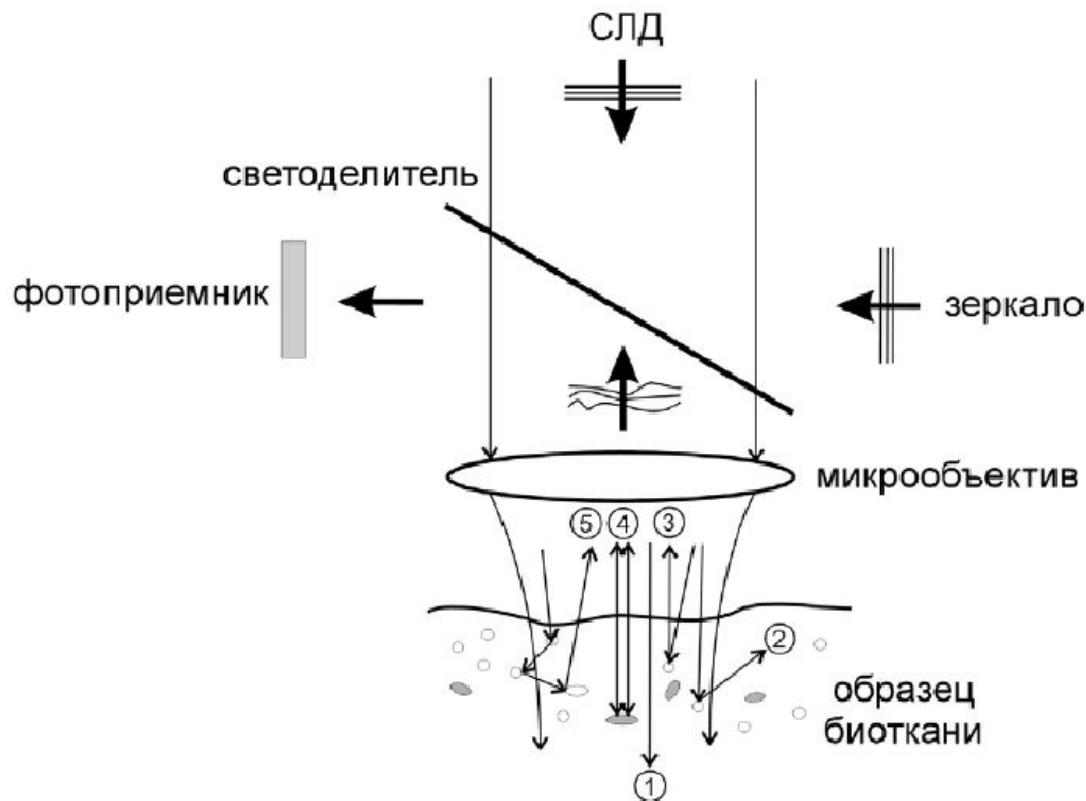
Образец	Интенсивность фазочувствительной флуоресценции при	
	$\varphi_D = 17,4^\circ + 90^\circ$	$\varphi_D = 32,1^\circ - 90^\circ$
DNS (10^{-5} M)	0	1,0
DNS (10^{-5} M) + избыток BSA	1,776	0
DNS (10^{-5} M) + 10^{-6} M BSA	0,886	0,50

Дж. Лакович

Л. 1

ОСНОВЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Типы рассеивающих взаимодействий света с биотканью



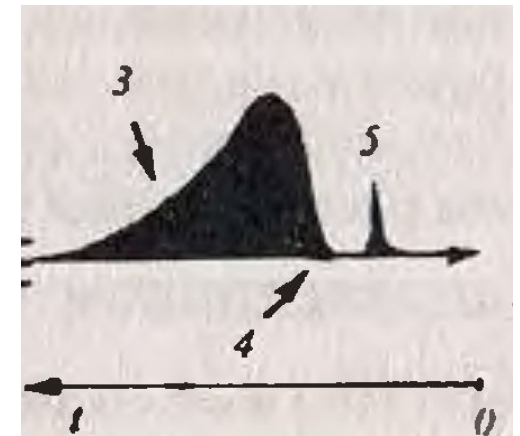
- 1 - баллистические фотоны (проходящие без рассеяния),
- 2 - рассеяние под большими углами,
- 3 - однократное рассеяние назад,
- 4 - отражение строго назад, при котором происходит искажение фазового фронта волны за счет перепада показателя преломления среды,
- 5 - рассеяние под малыми углами

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:

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

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:

$$\frac{1}{c} \frac{\partial I(\mathbf{r}, t, \mathbf{e}_s)}{\partial t} + \mathbf{e}_s \cdot \nabla I(\mathbf{r}, t, \mathbf{e}_s) + (\mu_a + \mu_s) I(\mathbf{r}, t, \mathbf{e}_s) = \mu_s \int_{4\pi} f(\mathbf{e}_s, \mathbf{e}_s') I(\mathbf{r}, t, \mathbf{e}_s') d^2 \mathbf{e}_s' + q(\mathbf{r}, t, \mathbf{e}_s)$$

Временное диффузионное уравнение:

$$\frac{1}{c} \frac{\partial \phi(\mathbf{r}, t)}{\partial t} - \nabla \cdot \mathbf{k}(\mathbf{r}) \nabla \phi(\mathbf{r}, t) + \mu_a \phi(\mathbf{r}, t) = q_0(\mathbf{r}, t) \quad \text{где} \quad \phi(\mathbf{r}, t) = \int_{4\pi} I(\mathbf{r}, t, \mathbf{e}_s) d^2 \mathbf{e}_s$$

Упрощенная диффузионная модель при освещении незатухающей волной (CW):

$$\mu_a \phi(\mathbf{r}) - \nabla \cdot \mathbf{k}(\mathbf{r}) \nabla \phi(\mathbf{r}) = q_0(\mathbf{r})$$

$$\phi_o = \frac{\phi_i}{4\pi D |\mathbf{r} - \mathbf{r}_s|} \exp(-\mu_{eff} |\mathbf{r} - \mathbf{r}_s|) - \frac{\phi_i}{4\pi D |\mathbf{r}_s' - \mathbf{r}|} \exp(-\mu_{eff} |\mathbf{r}_s' - \mathbf{r}|)$$

Основное диффузионное уравнение для получения изображ

$$\nabla D(\mathbf{r}) \nabla \Phi - \left(\mu_a \Phi + \frac{i\omega}{c} \right) \Phi = -S_0 \delta$$

$$\Phi = \frac{S_0}{4\pi D r} e^{-\left[\frac{3\mu_a}{D} + \frac{i\omega}{cD} \right] r}$$

$$\begin{cases} \Phi(\mathbf{r}, \omega) \\ S_0(\omega) \\ \delta(\mathbf{r} - \mathbf{r}_0) \end{cases} \quad D = \frac{1}{\mu_s'}$$

- 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

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

Применение флуоресценции в клинической практике

□ фотодинамическая
терапия

□ флуоресцентная
диагностика

Метод флуоресцентной диагностики основан на:

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

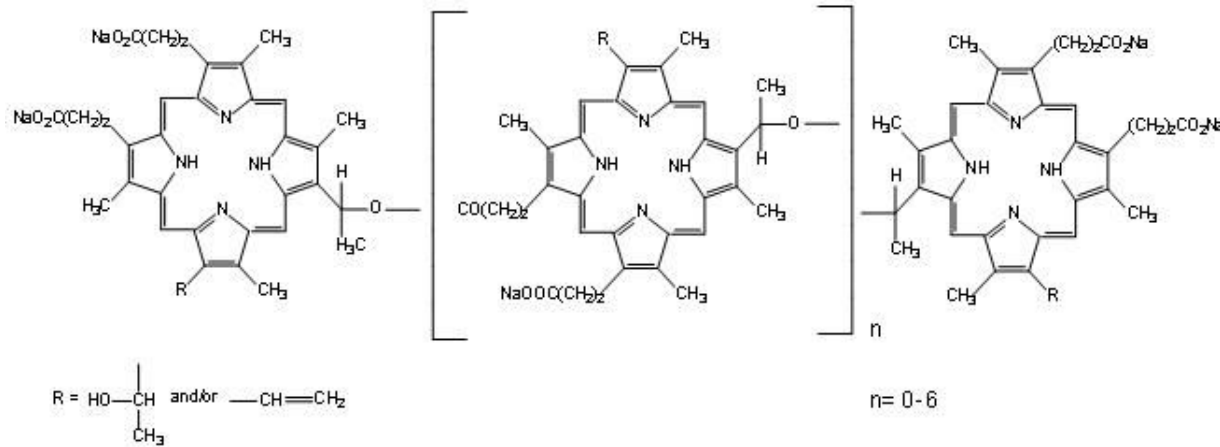
Методы анализа флуоресценции биологических тканей:

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

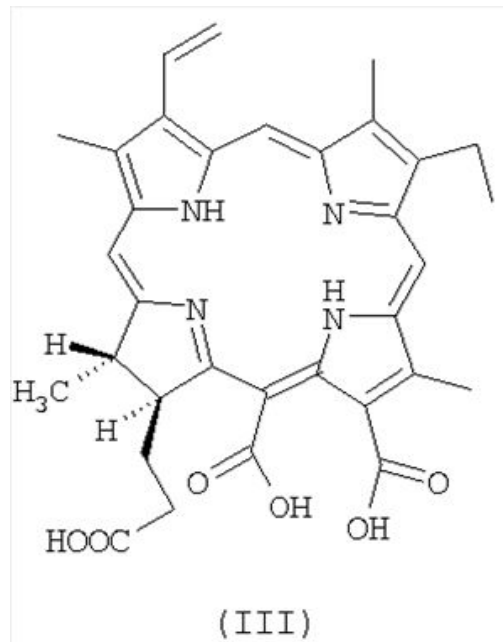
Главные хромофоры тканей

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
МочевUrosanic 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	Да	Ex: 445; Em: 530
Сшивки коллагена	УФ	Да	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

Самые используемые фотосенсибилизаторы



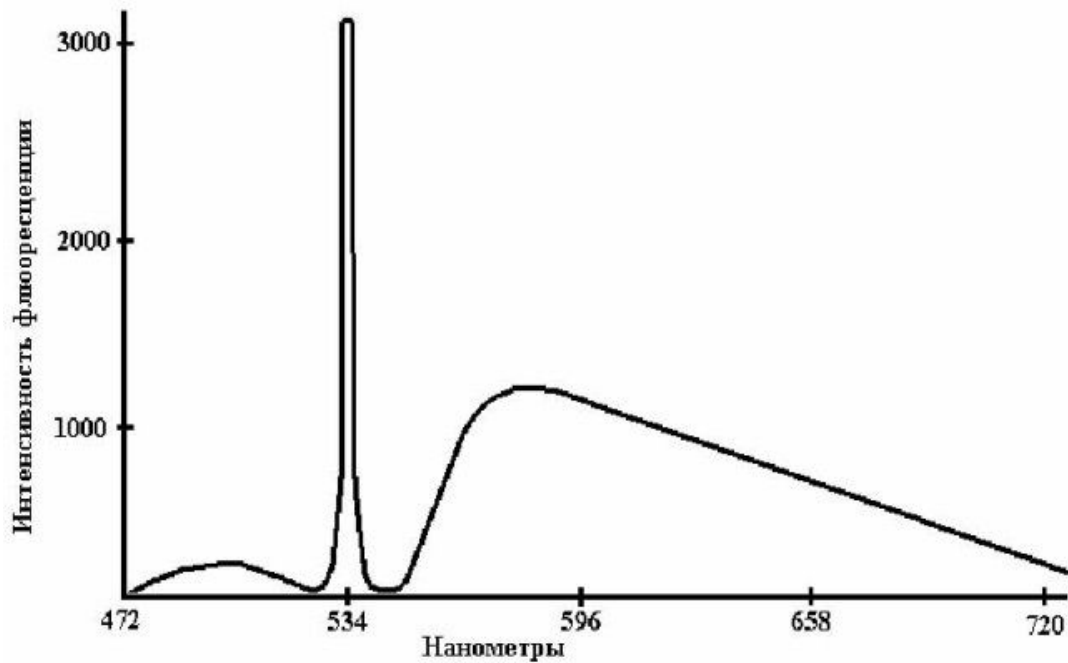
фотофрин



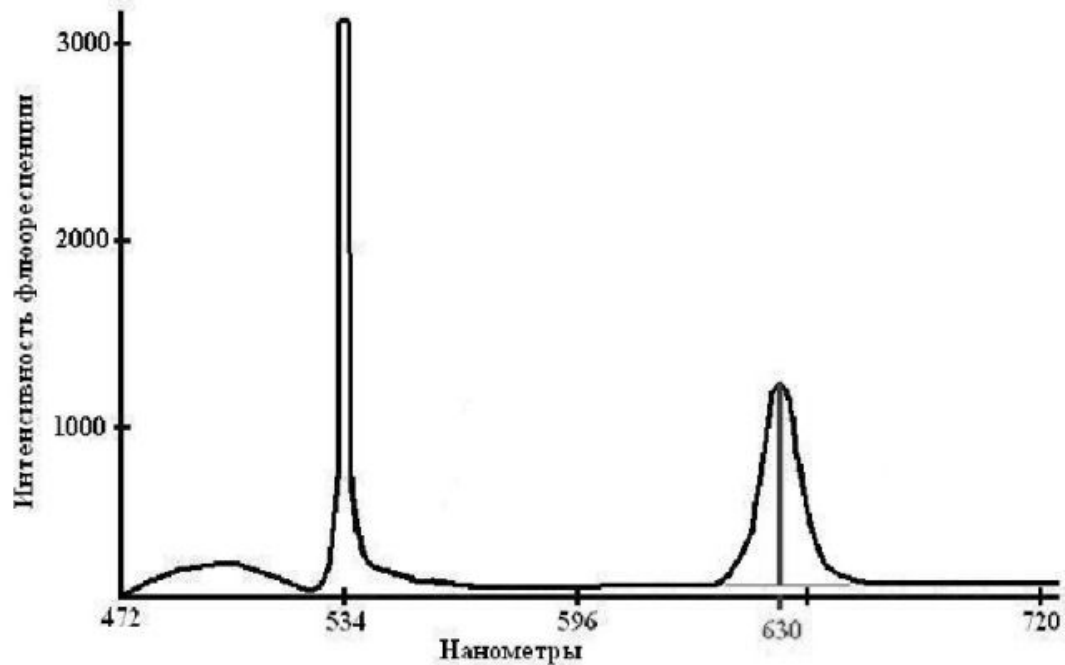
радахлорин

аласенс





Спектр флюоресценции
здоровой ткани

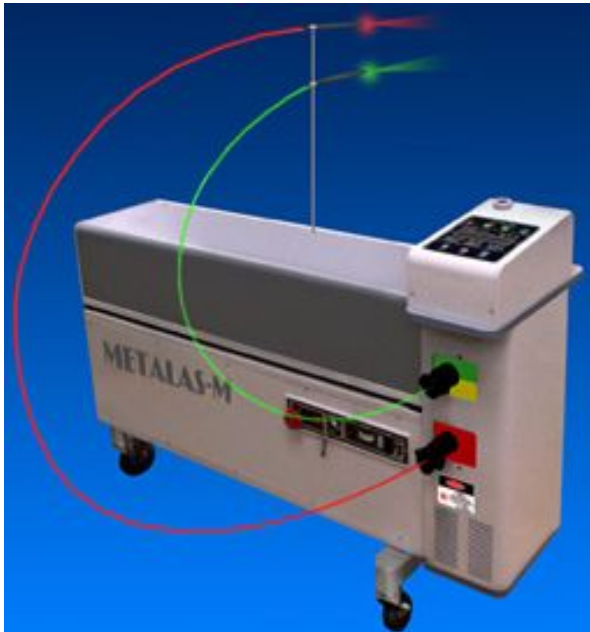


Спектр флюоресценции
участка с избыточным
накоплением
фотосенсибилизатора

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).

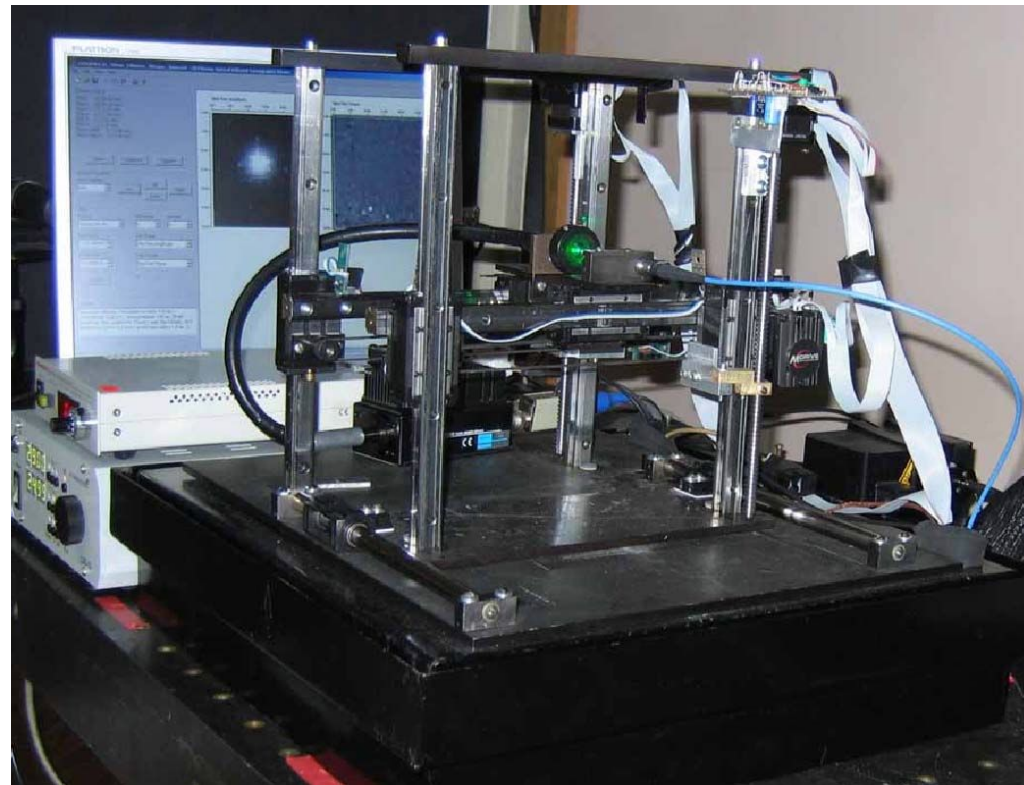
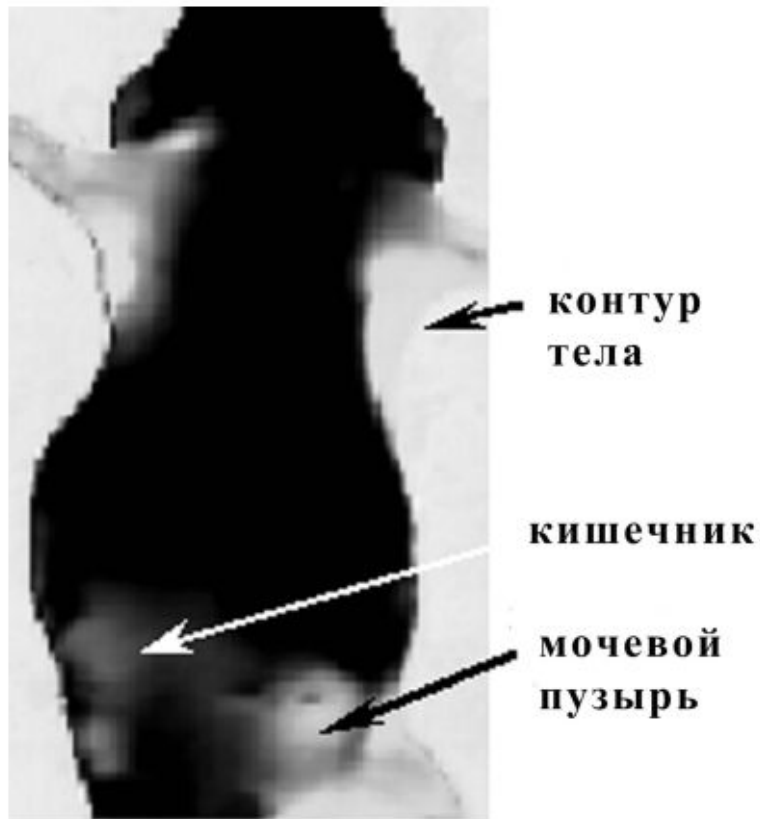


Рис. 2. Прижизненное ДФТ-изображение мыши. Светлые области соответствуют высокому, а темные – низкому уровню сигнала

Внешний вид блока сканирования опытного образца ДФТ-установки.

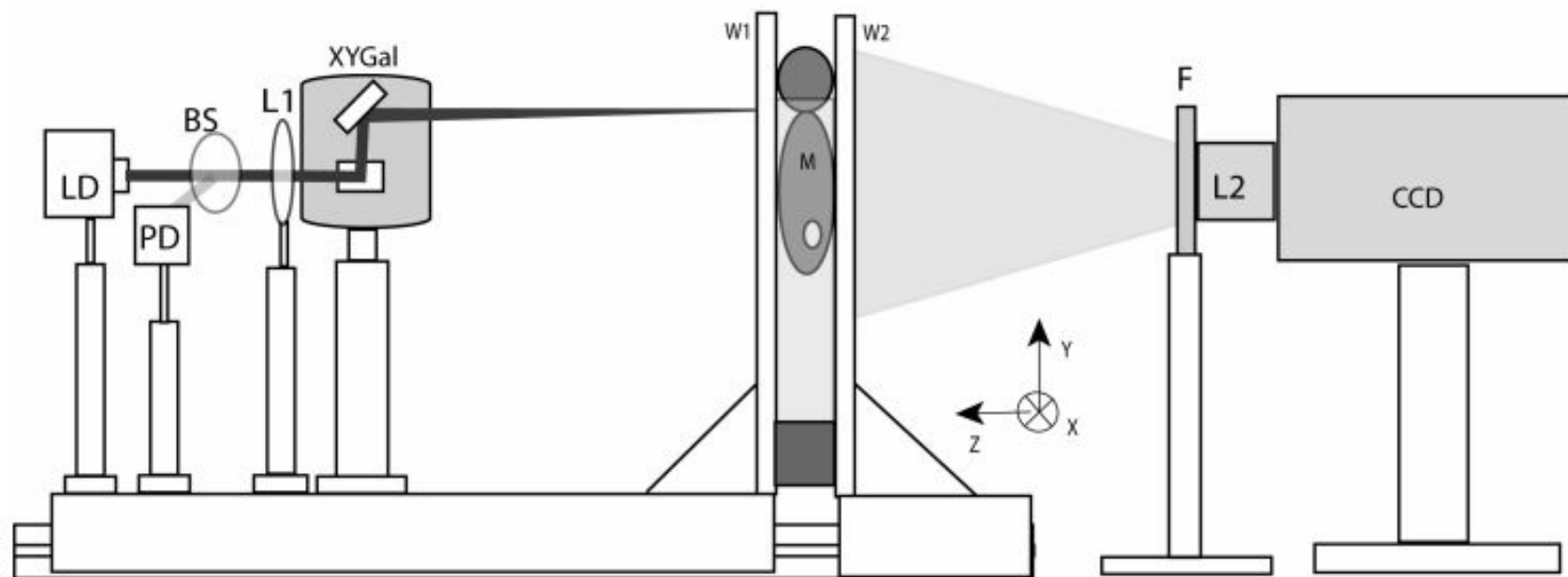


Fig. 1. Fast scanning fluorescence tomography system. The mouse subject is suspended and held in light compression between two movable windows (W1 and W2). Light from a laser diode at 785 nm (LD) is collimated and passes through a 95/5 beam splitter (BS). A reference Photodiode (PD) collects 5% of the 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).

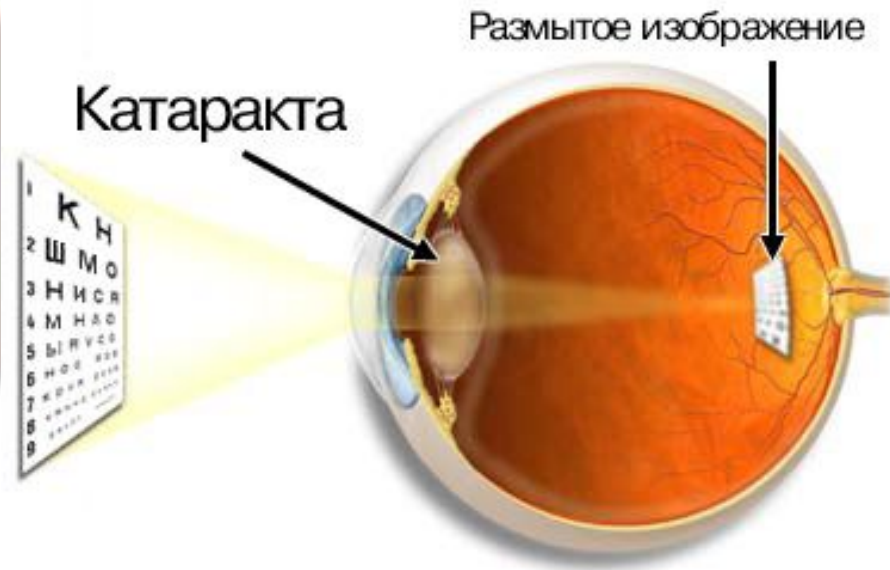
ЛАЗЕРНО-ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ ДИАГНОСТИКА СТАДИЙ ВОЗРАСТНОЙ КАТАРАКТЫ



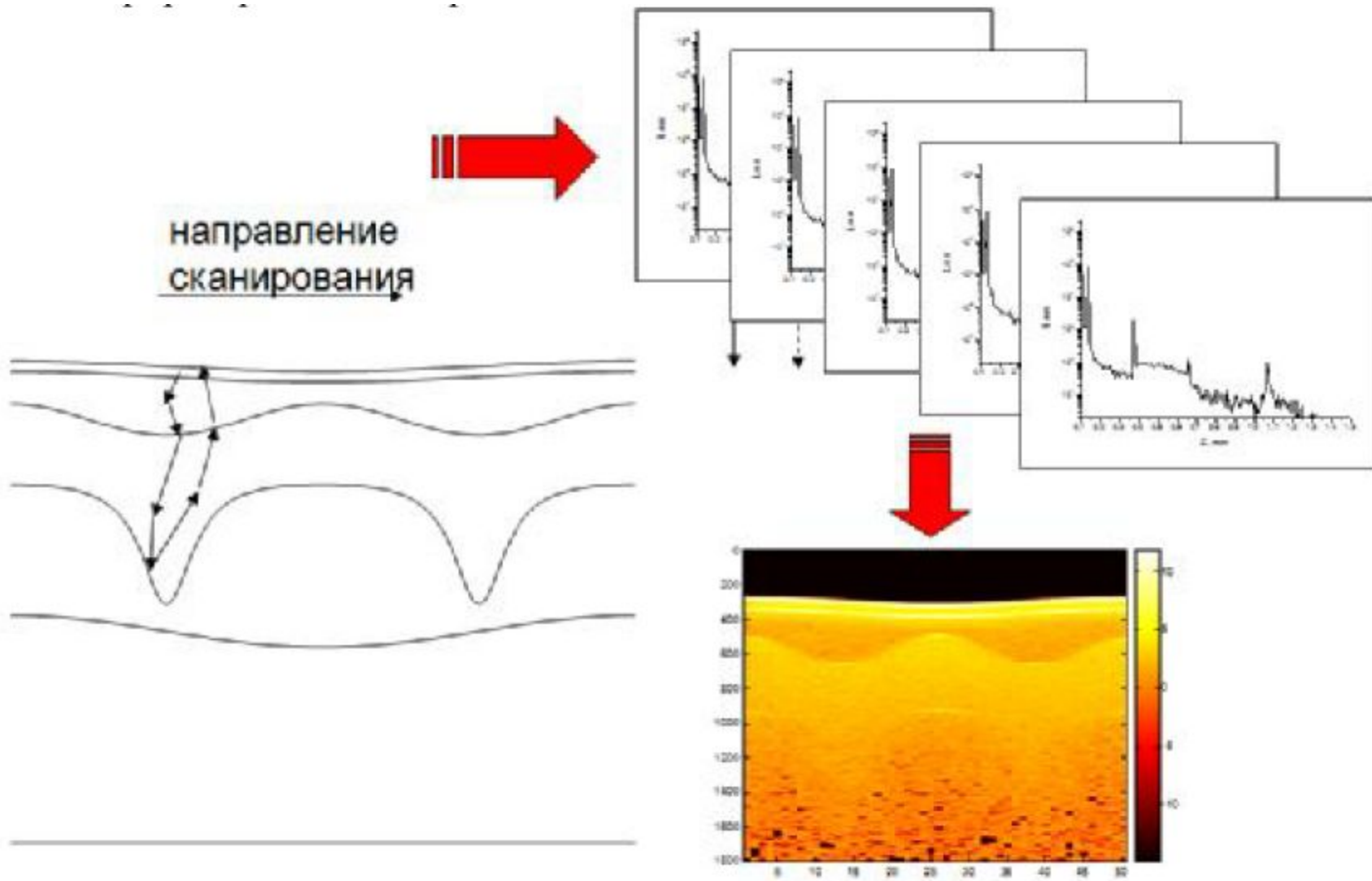
здоровый глаз



глаз с катарактой



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 дезокси-гемоглобина.

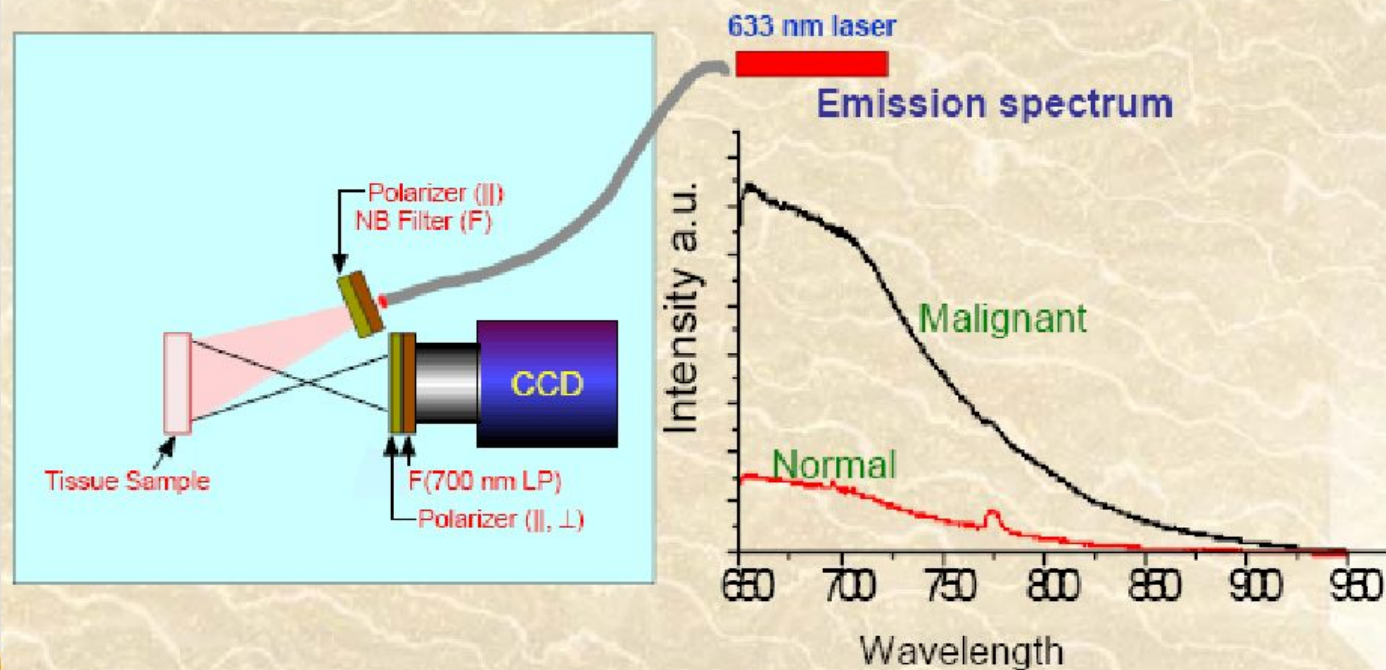
Характеристики канцерогенеза:

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

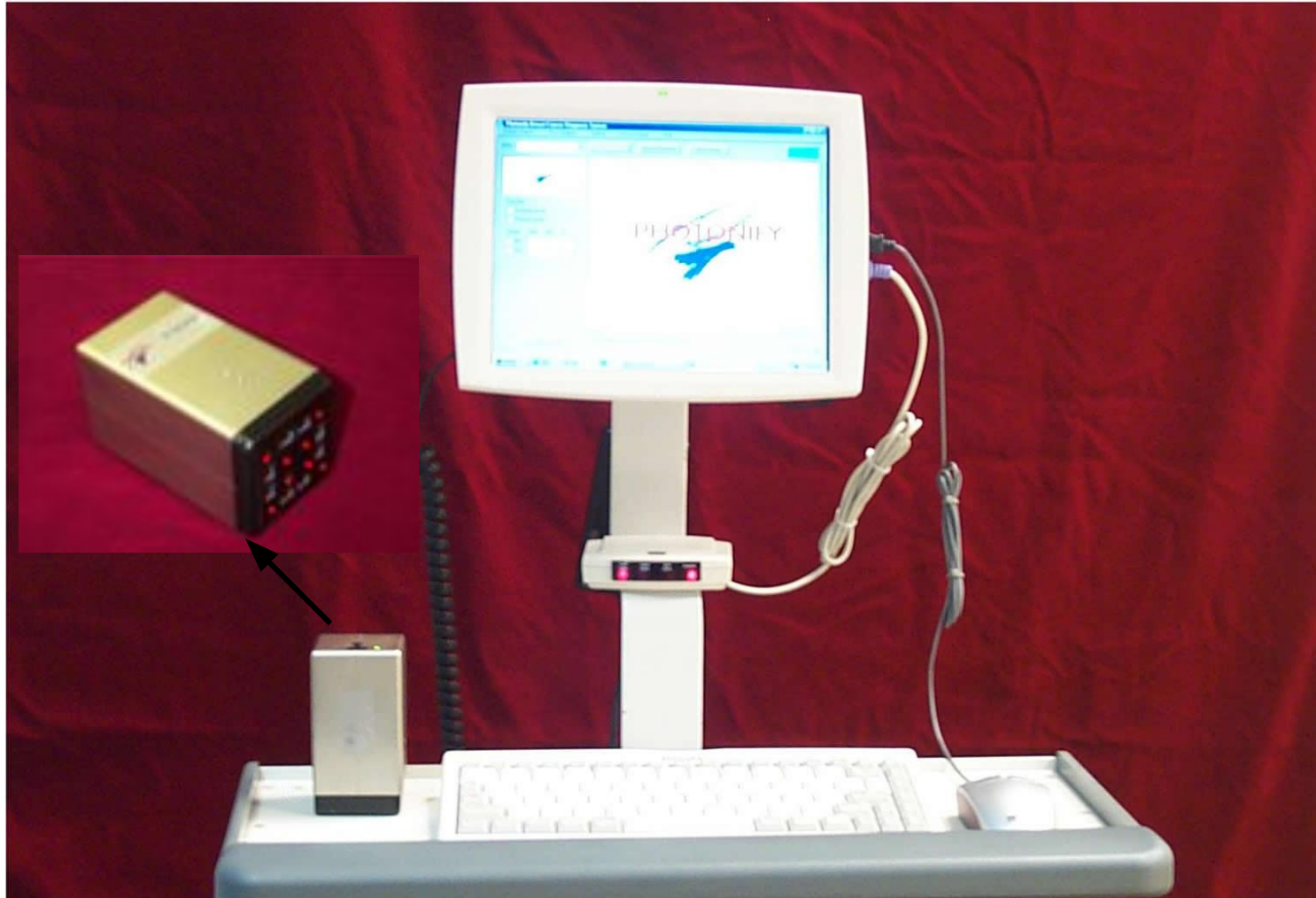
NIR Imaging spectrometer

Diagnosis

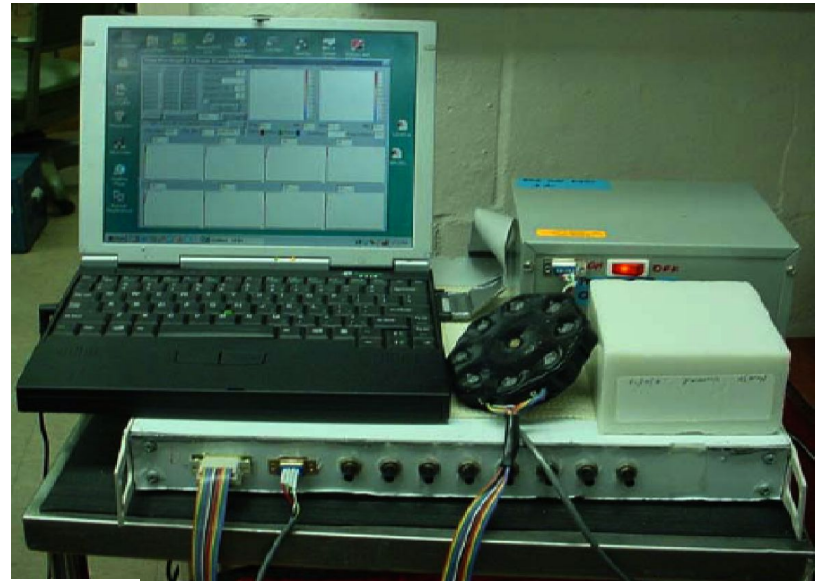
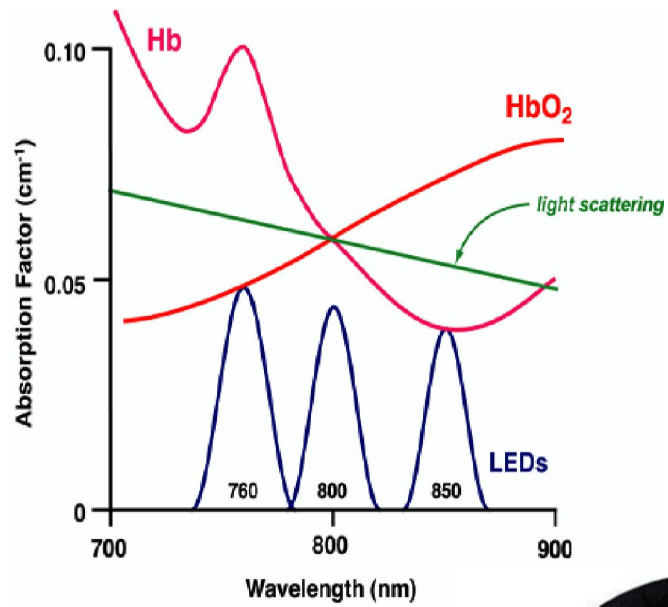
Near Infra-Red Imaging as a cancer diagnostic



A Portable Near Infrared Imager for Breast Cancer Diagnosis



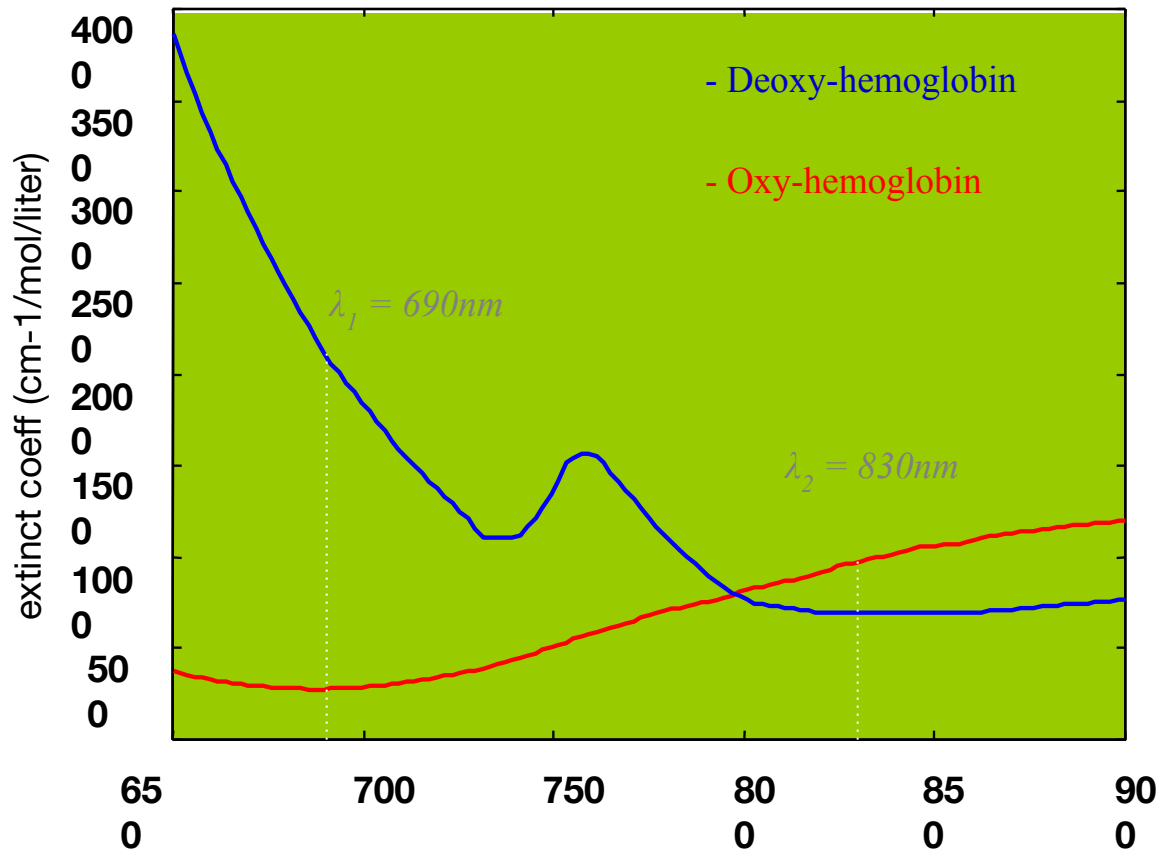
Cheng, X., X. Xu, et al., Optical imaging system with direct image reconstruction, US patent, 09/778,617, 2001.



Грудной зонд



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.



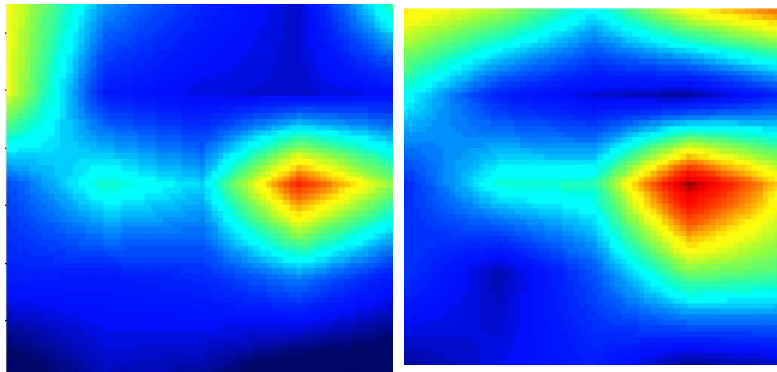
$$[Hb] = \frac{\epsilon_{HbO}^{\lambda 2} \mu_a^{\lambda 1} - \epsilon_{HbO}^{\lambda 1} \mu_a^{\lambda 2}}{\left(\epsilon_{Hb}^{\lambda 1} \epsilon_{HbO}^{\lambda 2} - \epsilon_{Hb}^{\lambda 2} \epsilon_{HbO}^{\lambda 1} \right)}$$

$$[HbO] = \frac{\epsilon_{Hb}^{\lambda 1} \mu_a^{\lambda 2} - \epsilon_{Hb}^{\lambda 2} \mu_a^{\lambda 1}}{\left(\epsilon_{Hb}^{\lambda 1} \epsilon_{HbO}^{\lambda 2} - \epsilon_{Hb}^{\lambda 2} \epsilon_{HbO}^{\lambda 1} \right)}$$

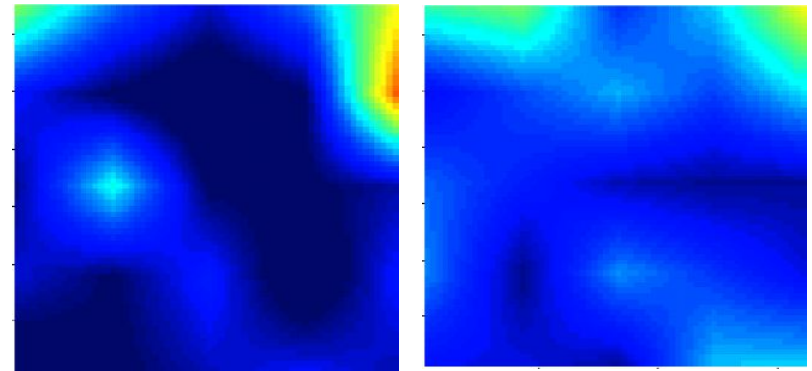
$$[HbT] = [Hb] + [HbO]$$

$$SO_2 = \frac{[HbO]}{[HbT]}$$

правая

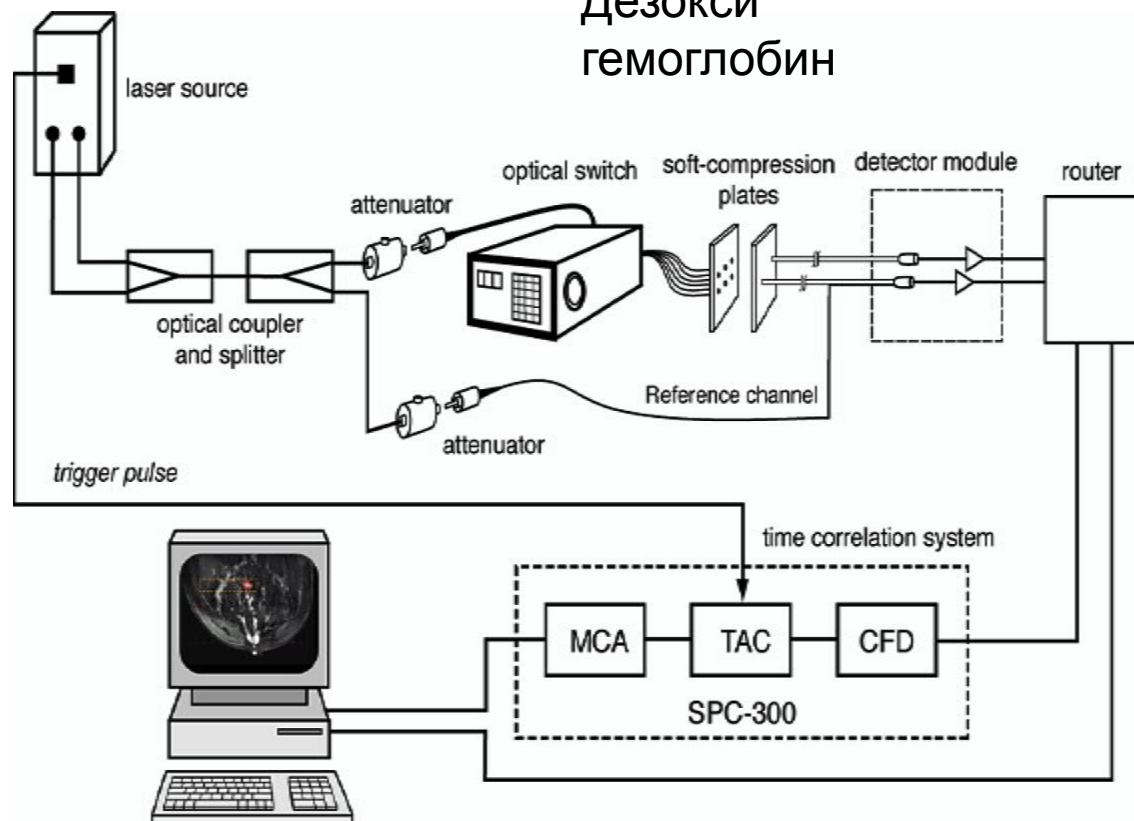


левая

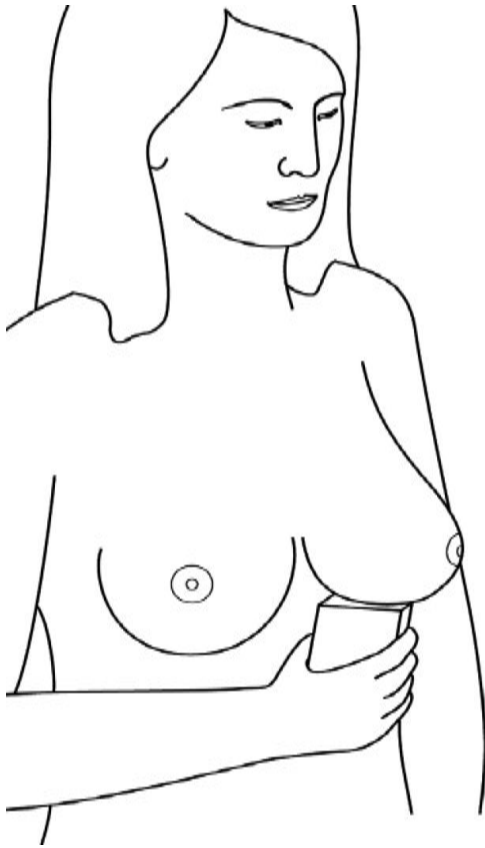


Дезокси
гемоглобин

Дезокси
гемоглобин



Персональный детектор рака груди



Dual Wavelength LED Silicon Diode Detector

