

**СПЕЦКУРС**  
**ОПТИЧЕСКИЙ БИОИМИДЖИНГ**

**лекция 1**

**Турчин Илья Викторович**

*ИПФ РАН, отдел радиофизических методов в медицине*

*НижГМА, научная лаборатория флуоресцентного биомиджинга НИИ БМТ*

E-mail: [ilya@ufp.appl.sci-nnov.ru](mailto:ilya@ufp.appl.sci-nnov.ru)

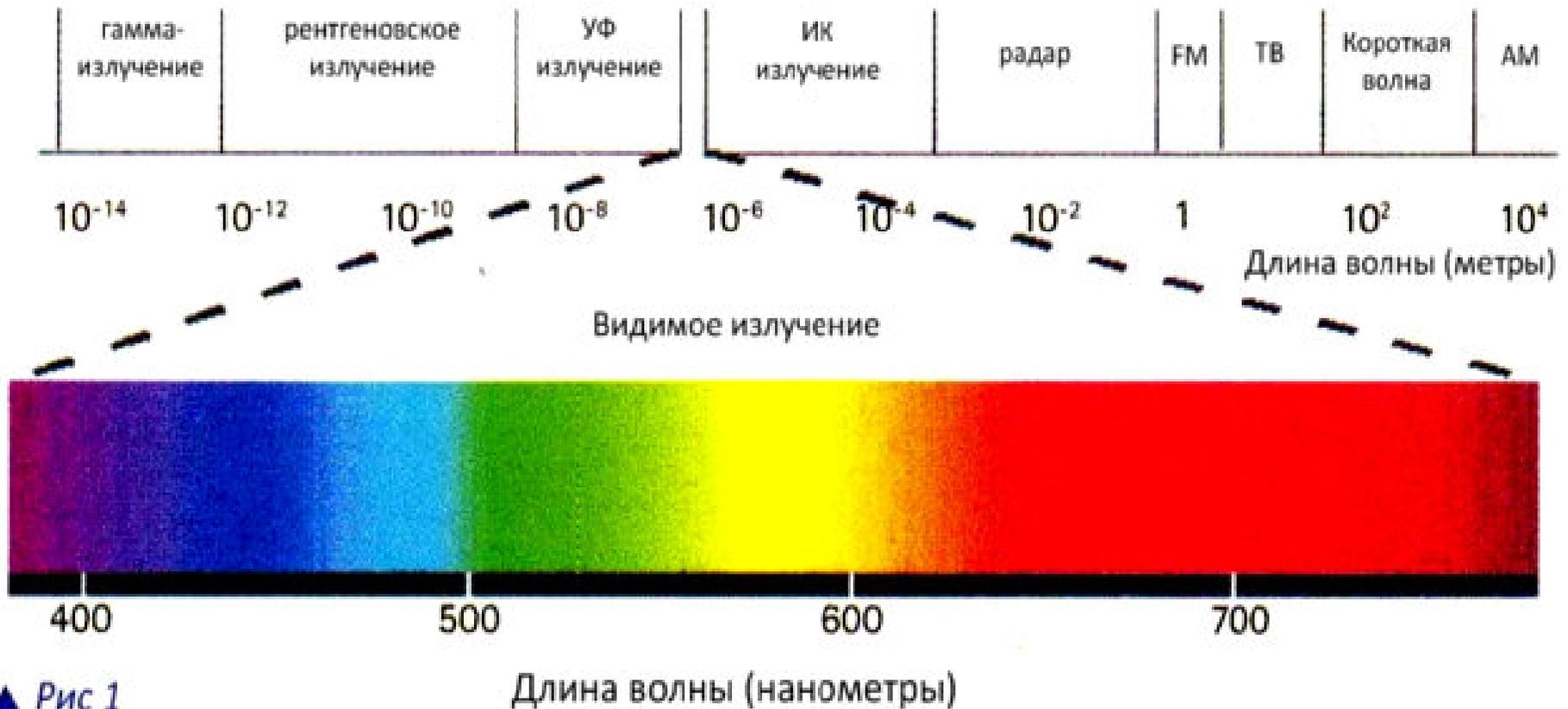
<http://bioimaging.ru/>

Тел.: 8(831)4368010

**Нижний Новгород 2013**

# Электромагнитное излучение

## Видимый и ближний инфракрасный диапазон (400-1300 нм)

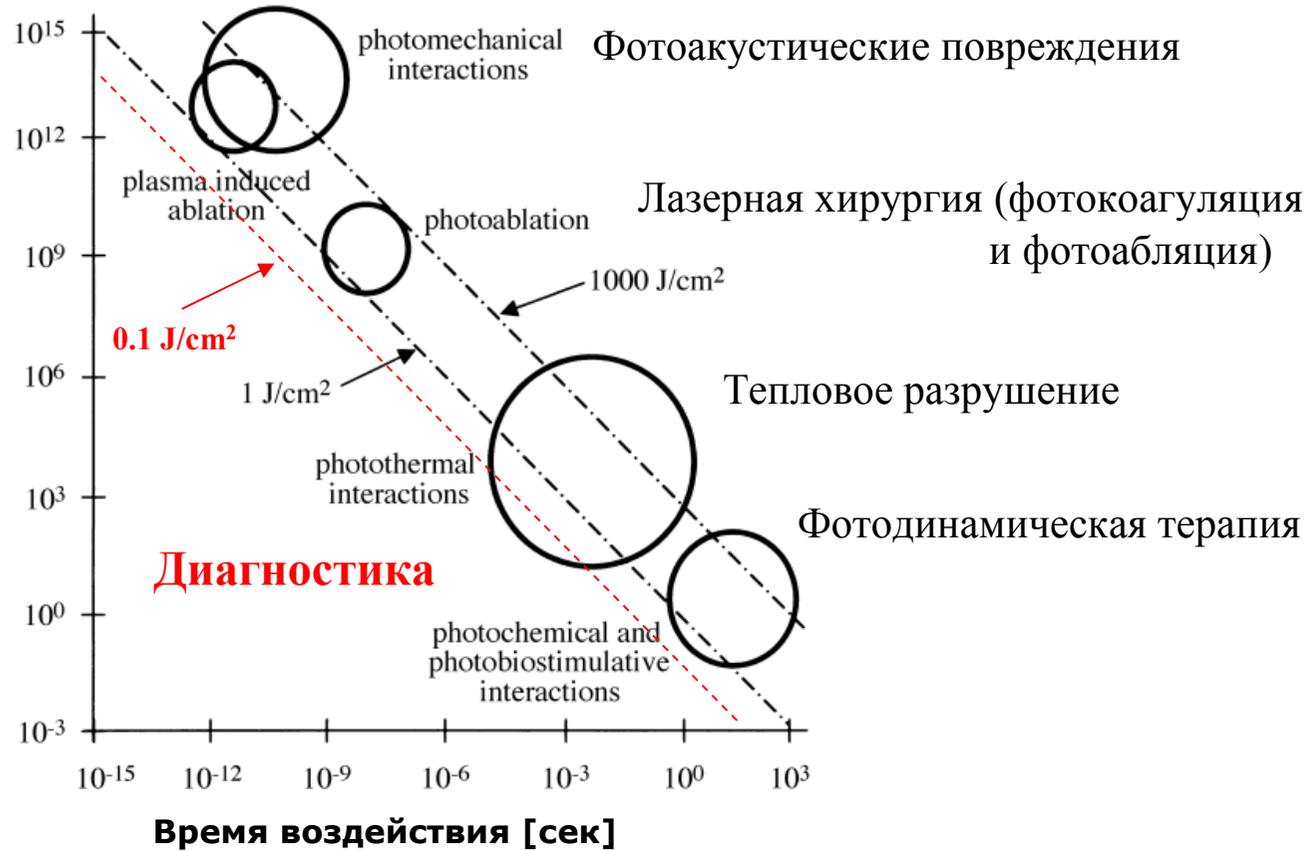


▲ Рис 1

Длина волны (нанометры)

# Виды фотовоздействия на биологические ткани

Облученность [Вт/см<sup>2</sup>]



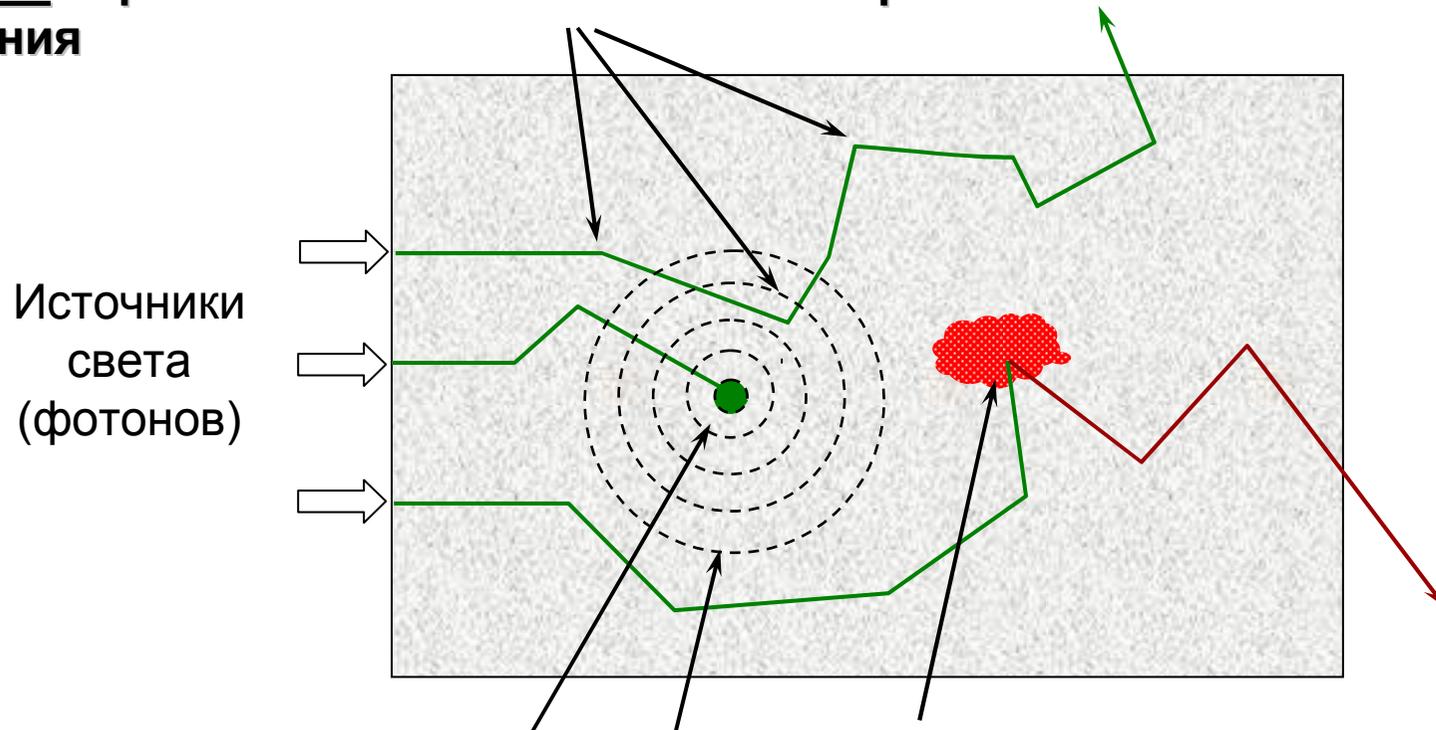
## **Диагностика биотканей оптическими методами**

**Видимый и ближний инфракрасный диапазон длин волн (400-1300 нм) в приложениях к медико-биологическим исследованиям**

- **Неинвазивность (при разумных дозах излучения)**
- **Высокое пространственное разрешение (различные виды микроскопии)**
- **Возможность визуализации на глубине (оптическая томография)**
- **Возможность определения компонентного состава биологических тканей (использование зондирующего излучения на нескольких длинах волн)**
- **Возможность использования оптических контрастов (специфическое окрашивание)**

## Распространение света в биологических тканях

- Рассеяние – фотон отклоняется от своего первоначального направления

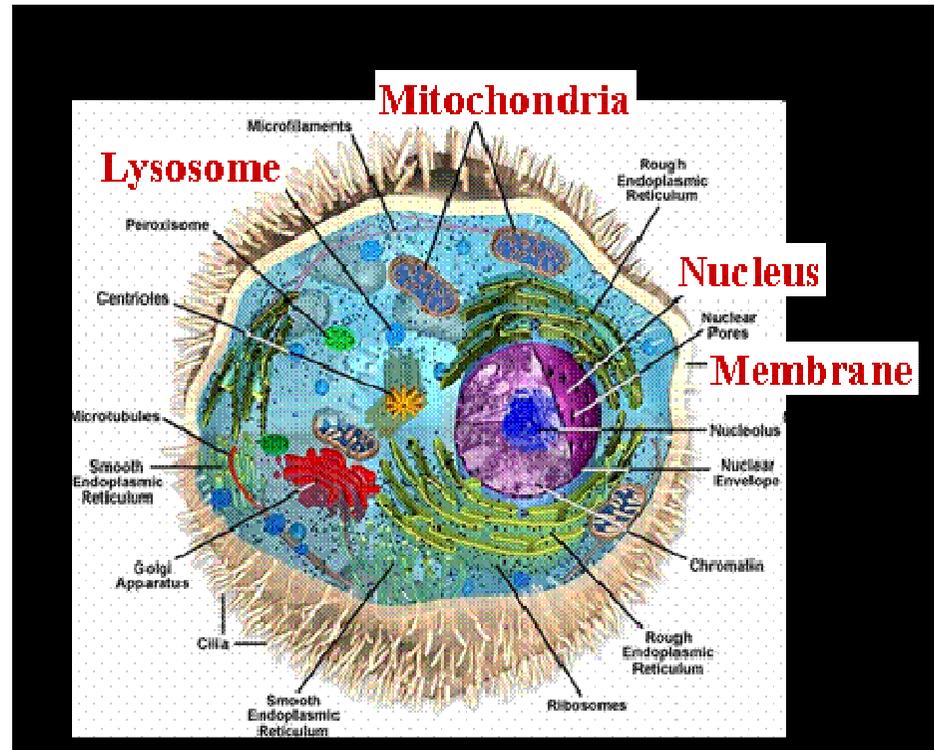


- Поглощение – фотон поглощается, выделяется тепло.

При поглощении короткого светового импульса (наносекундного) из места поглощения распространяется ультразвуковая волна

- Флуоресценция – фотон поглощается веществом (флуорофором) и переизлучается на другой длине волны

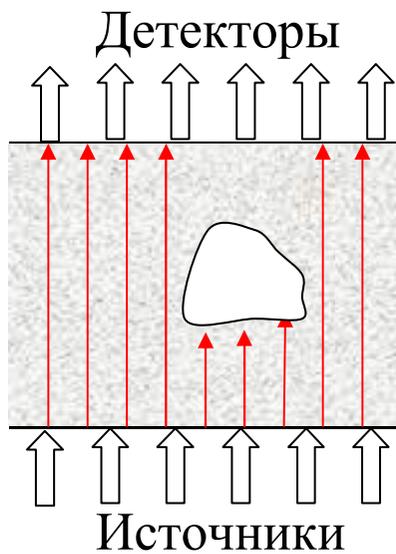
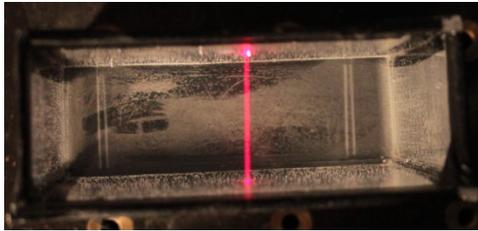
## Рассеяние в тканях обусловлено микронеоднородностями показателя преломления $n$



	$n$	Размер, $\mu\text{m}$
Клетка	1.36-1.4	5-30
Ядро	1.39-1.47	3-10
Митохондрия	1.40-1.42	0.5-3

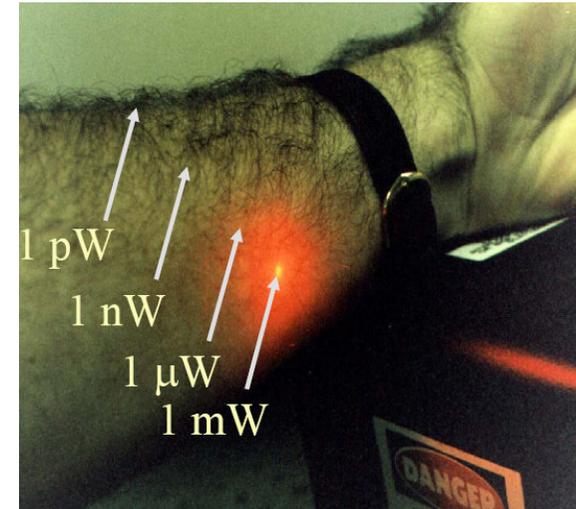
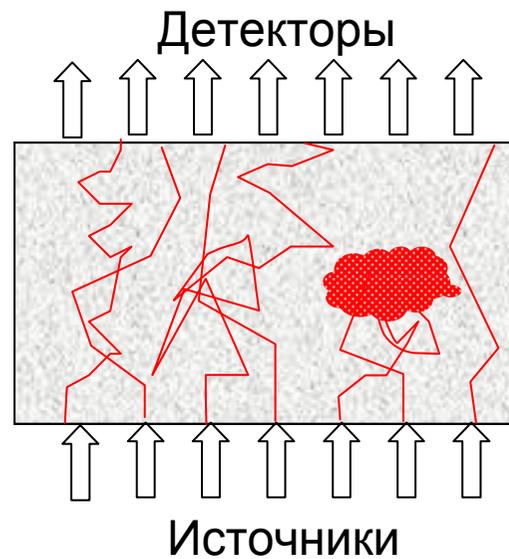
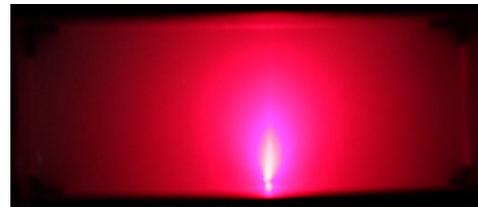
## Нерассеивающая (слабо рассеивающая среда)

*Примеры: рентгеновское излучение,  
оптическое излучение в оптически  
прозрачных объектах*

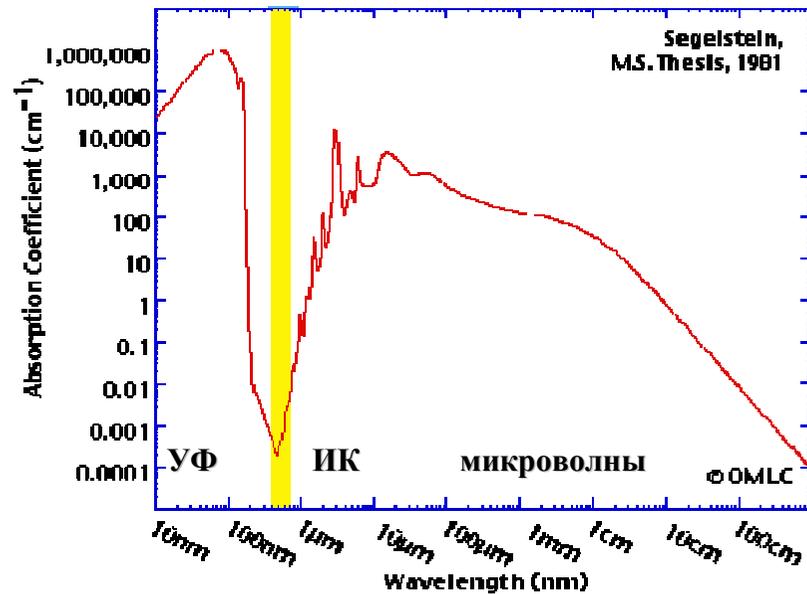


## Сильно рассеивающая среда

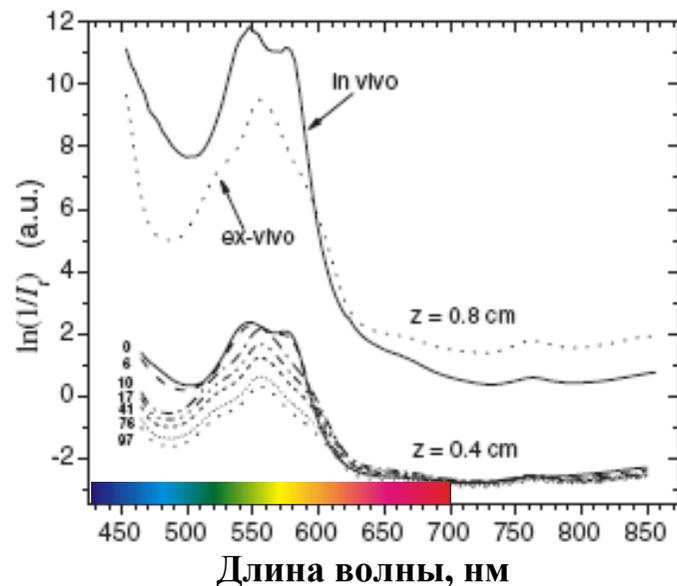
*Примеры: оптическое излучение практически  
во всех биологических тканях*



## Зависимость поглощения света в биотканях от длины волны

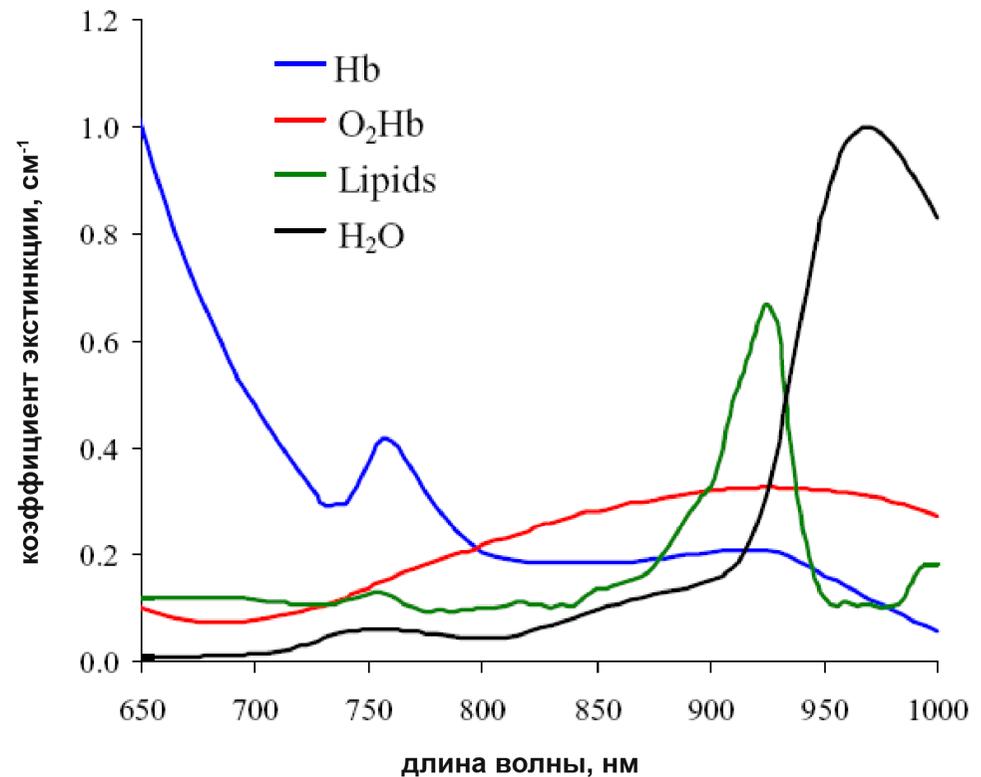


### Зависимость ослабления света от длины волны при прохождении сквозь слой биоткани



### Терапевтическое окно прозрачности биотканей, где поглощение света минимально: 600 -1200 нм

### Зависимость показателя поглощения различных компонент биологических тканей от длины волны



## Формирование оптического изображения (оптический контраст)

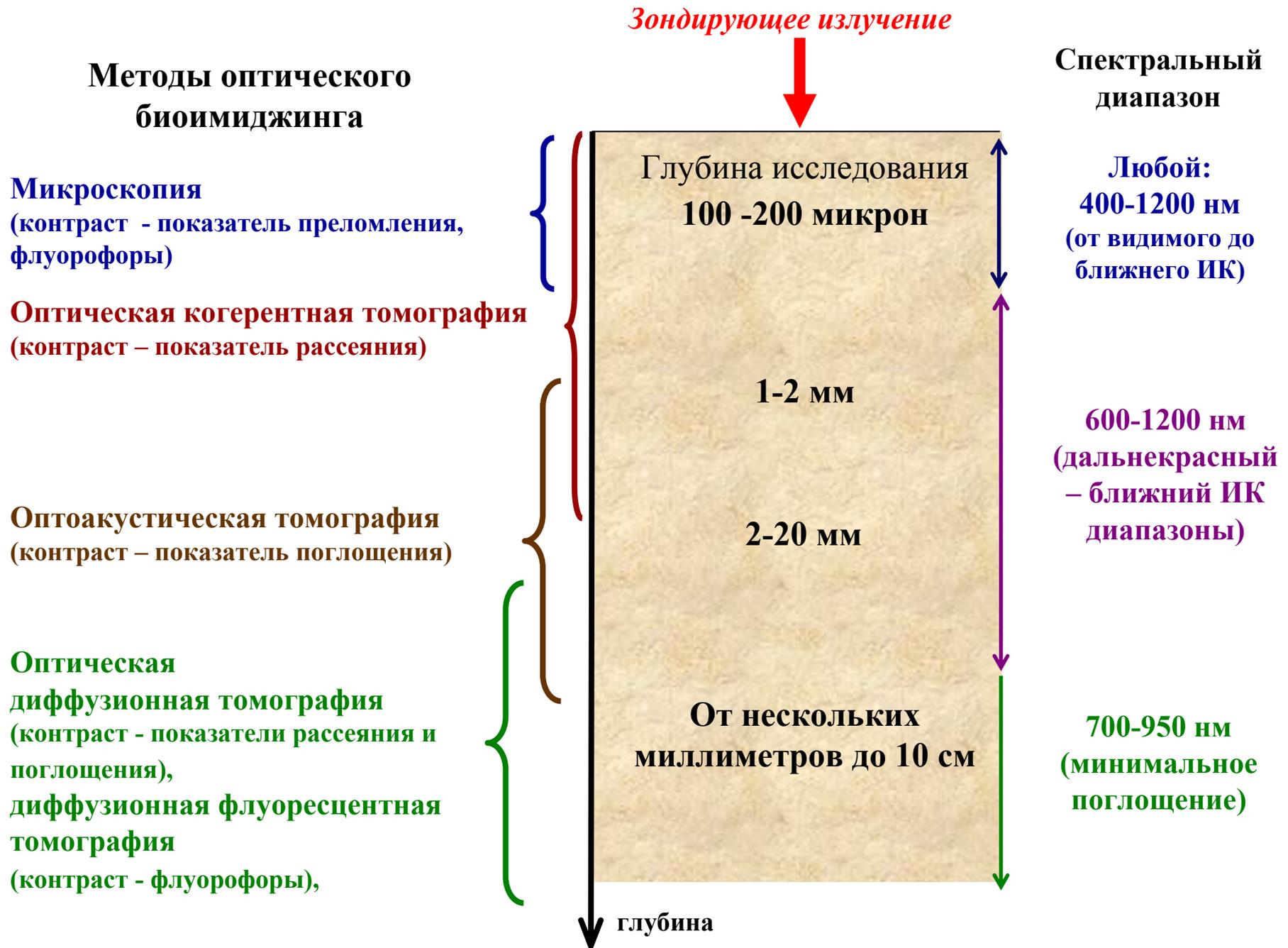
### Свойства биологических тканей:

- рассеяние,
- поглощение света,
- зависимость оптических параметров от длины волны,
- автофлуоресценция.

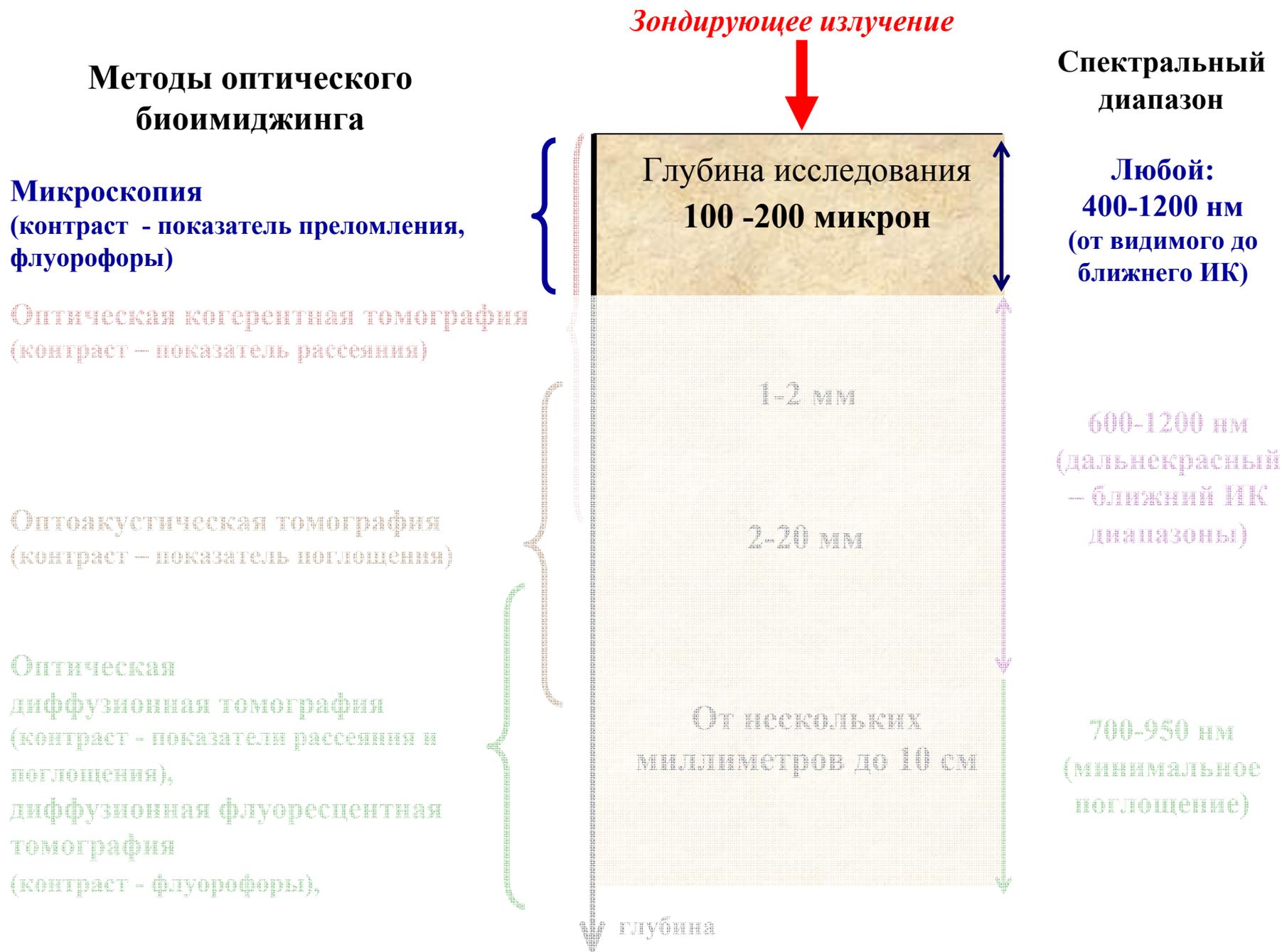
### Использование специфического окрашивания:

- флуоресцентные метки,
- биolumинесцентные метки,
- метки с высоким показателем поглощения/рассеяния.

# Исследование внутренней структуры биотканей оптическими методами

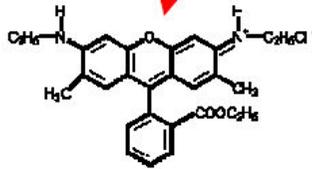
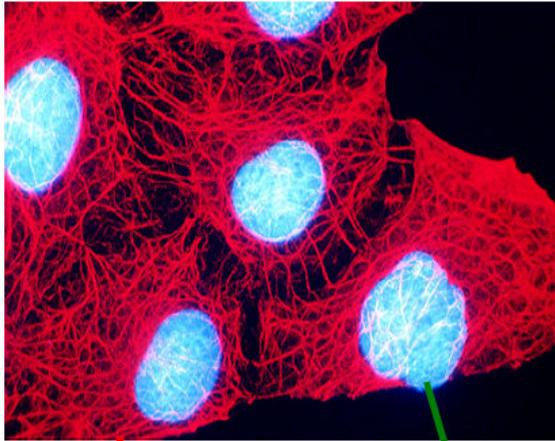


# Исследование внутренней структуры биотканей оптическими методами



## Флуоресцентная микроскопия

Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) позволяет получать флуоресцентные изображения образцов биотканей с высоким качеством с глубины до 200 микрон



Синтезированные  
флуорофоры

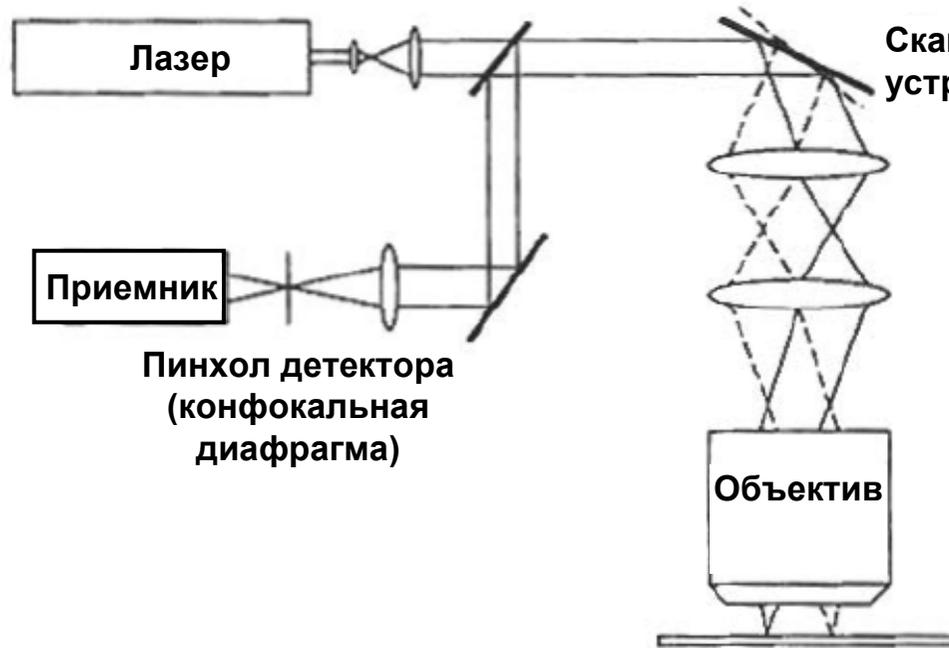


Флуоресцентные  
белки

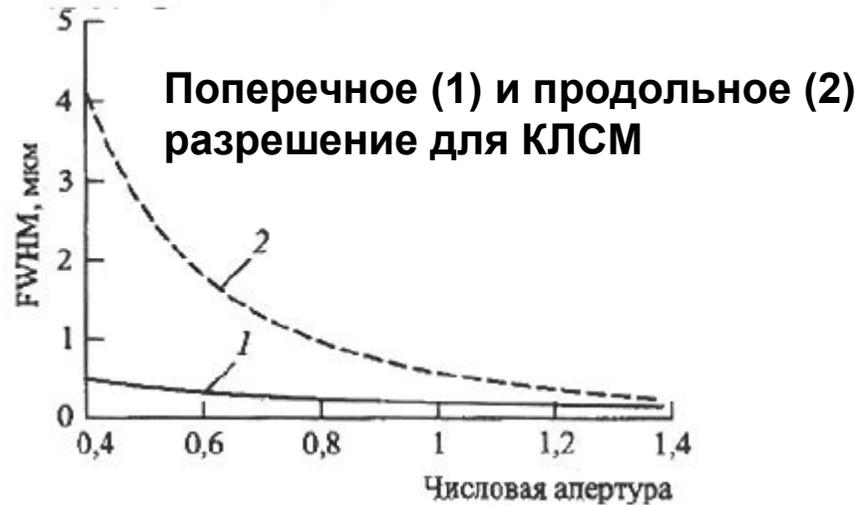
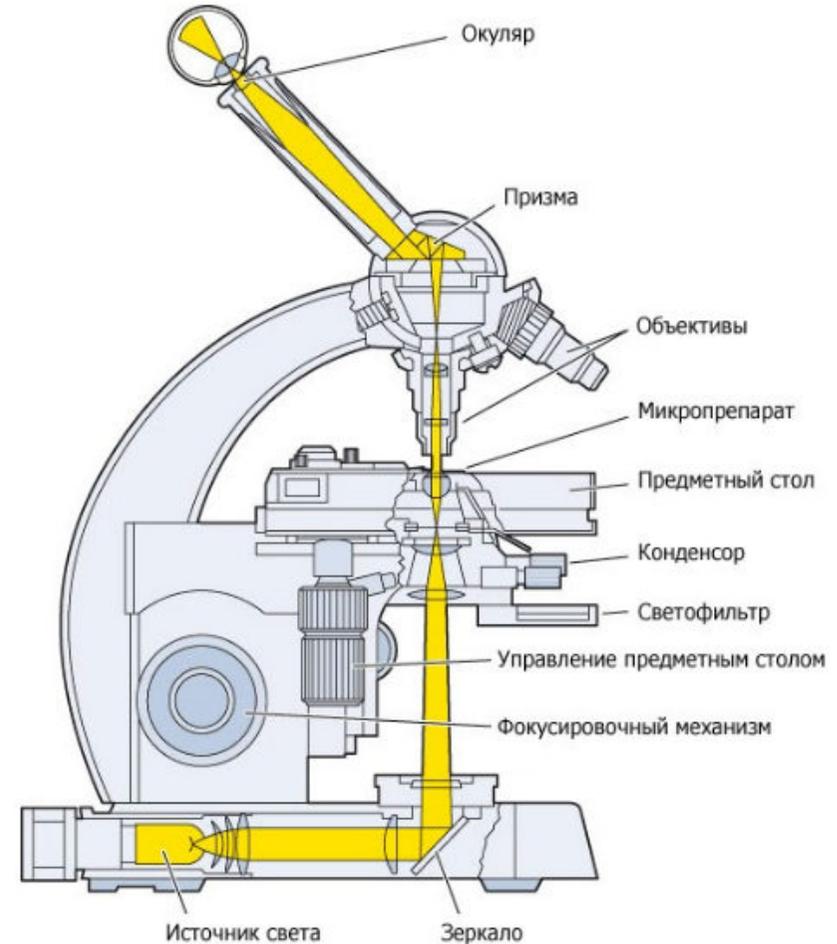
Биологический материал, как правило, сам по себе флуоресцирует крайне слабо, но благодаря применению ярких и разнообразных флуоресцентных молекул (флуорофоров), способных специфически окрашивать разные структуры тканей и клеток, метод флуоресцентной микроскопии оказался очень ценным для медико-биологических исследований.



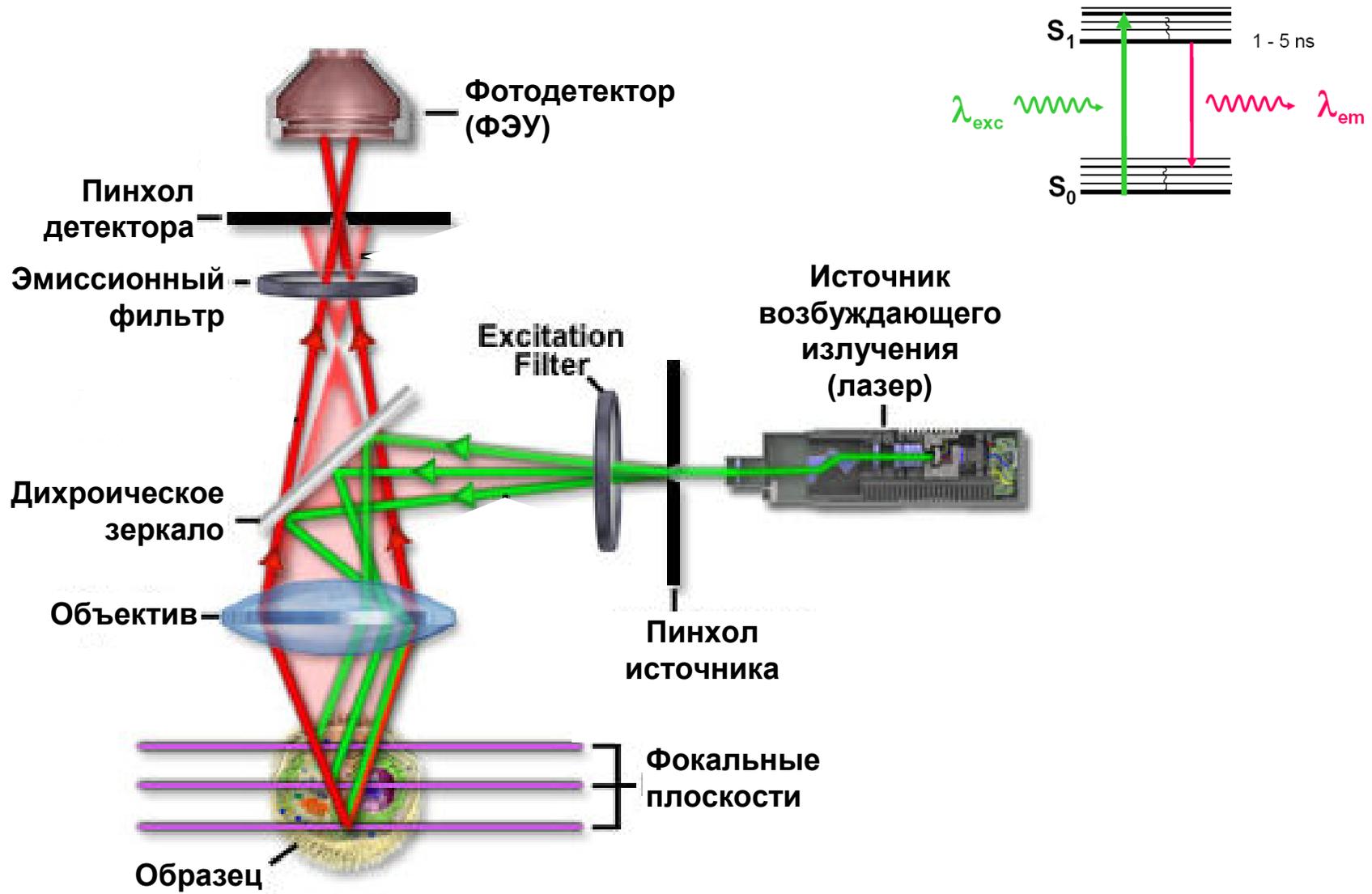
# Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия (КЛСМ) (Laser scanning microscopy (LSM))



# Широкопольная микроскопия Widefield microscopy



# Флуоресцентная КЛСМ

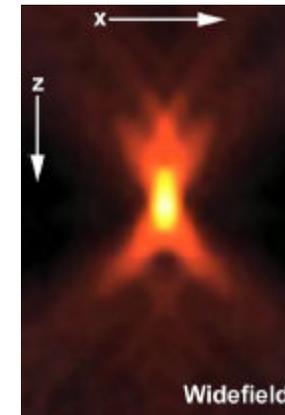
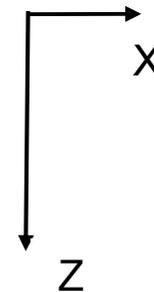
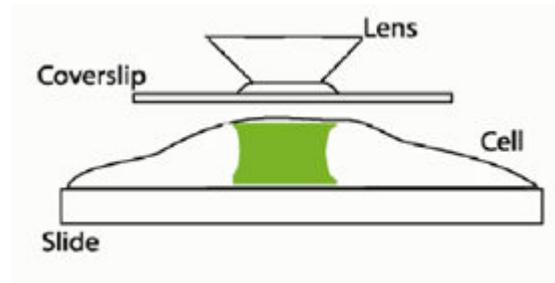


# Сравнение широкопольной микроскопии и конфокальной микроскопии

Функция размытия точки (ФРТ) – point spread function

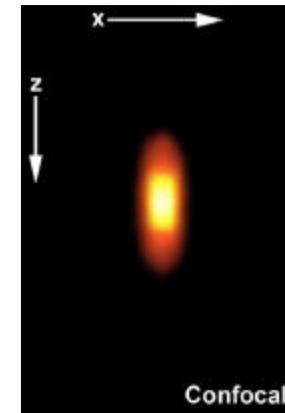
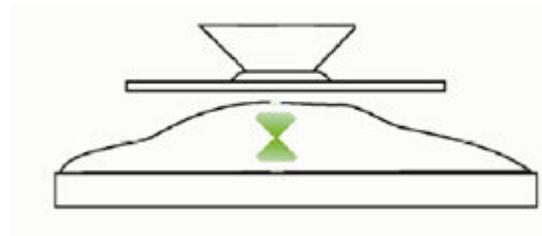
Поле подсветки

Широкопольная микроскопия (widefield microscopy)



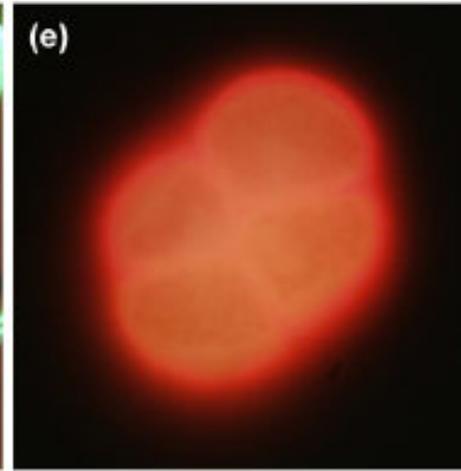
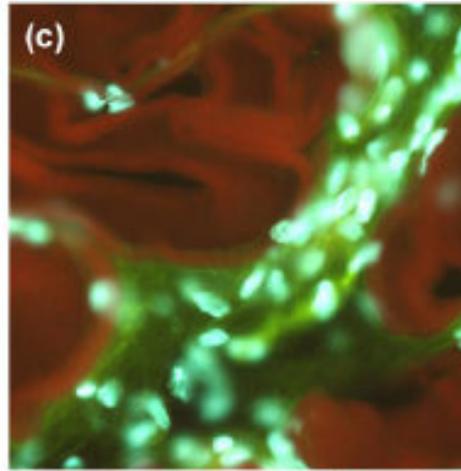
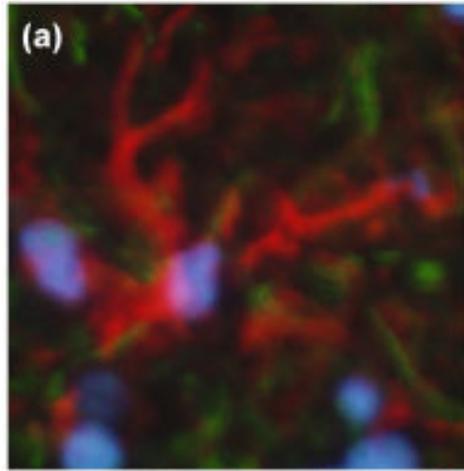
Widefield

Конфокальная микроскопия (confocal microscopy)

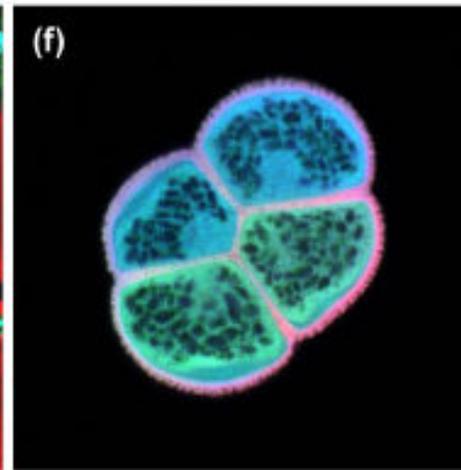
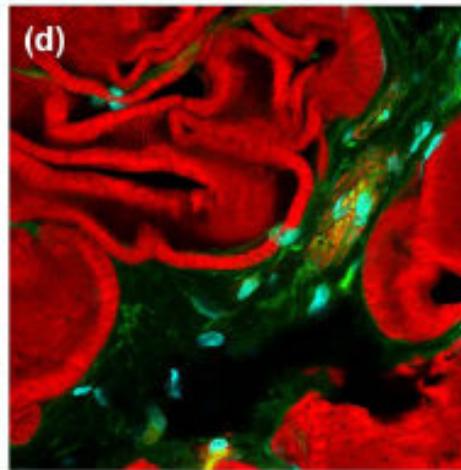
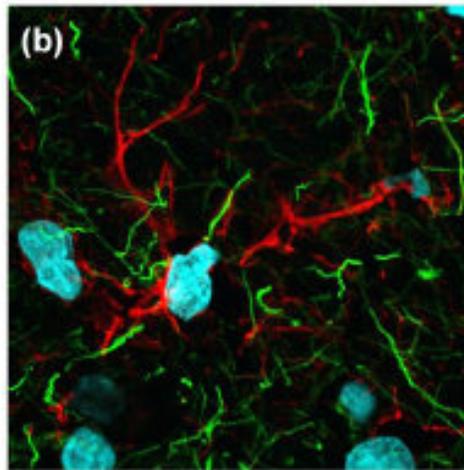


Confocal

## Сравнение широкопольной микроскопии и КЛСМ



Широкопольная  
микроскопия



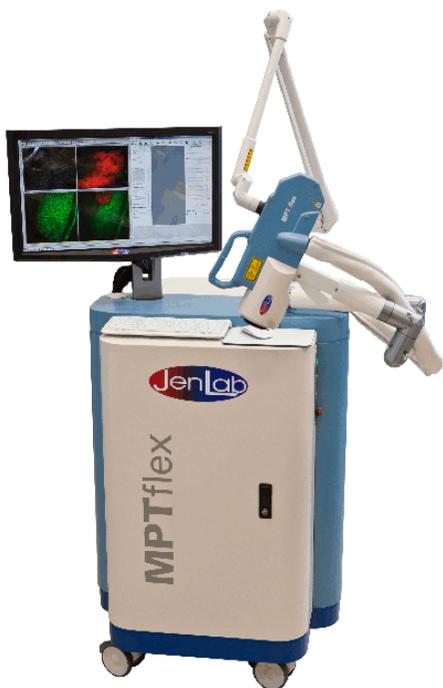
Конфокальная  
микроскопия

(a) and (b) Mouse brain hippocampus thick section treated with primary antibodies to glial fibrillary acidic protein (GFAP; red), neurofilaments H (green), and counterstained with Hoechst 33342 (blue) to highlight nuclei. (c) and (d) Thick section of rat smooth muscle stained with phalloidin conjugated to Alexa Fluor 568 (targeting actin; red), wheat germ agglutinin conjugated to Oregon Green 488 (glycoproteins; green), and counterstained with DRAQ5 (nuclei; blue). (e) and (f) Sunflower pollen grain tetrad autofluorescence.

<http://online.physics.uiuc.edu/courses/phys598om/spring12/Lectures/files/Lecture%206%20confocal%202012.pdf>

# Применение многофотонной КЛСМ в медицинской диагностике

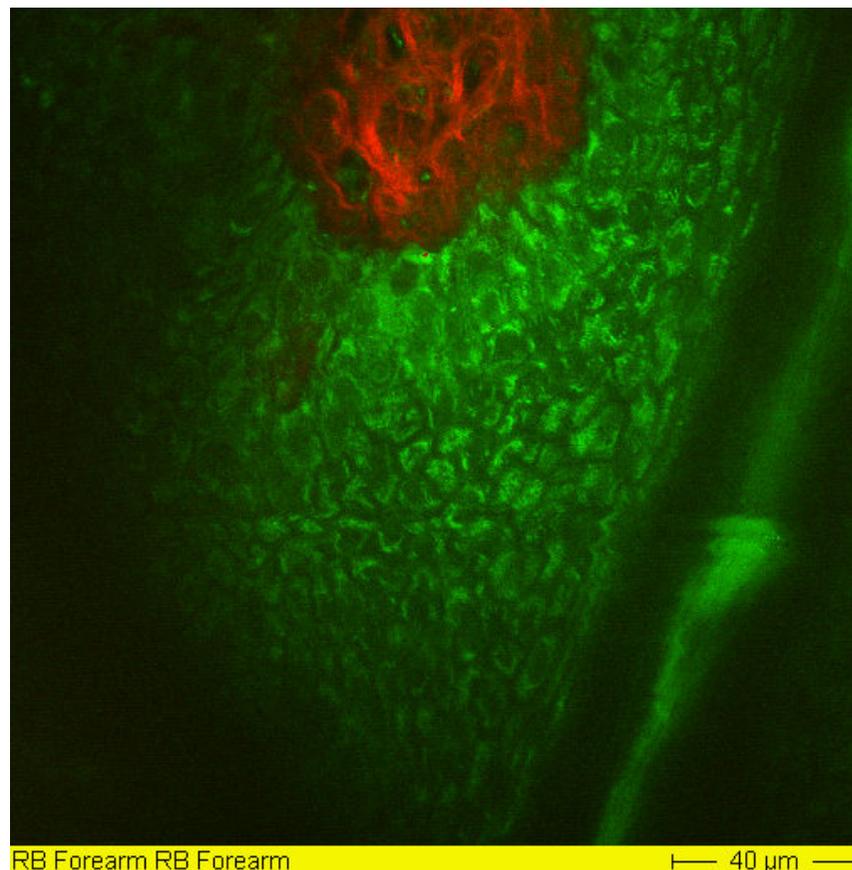
<http://www.jenlab.de/>



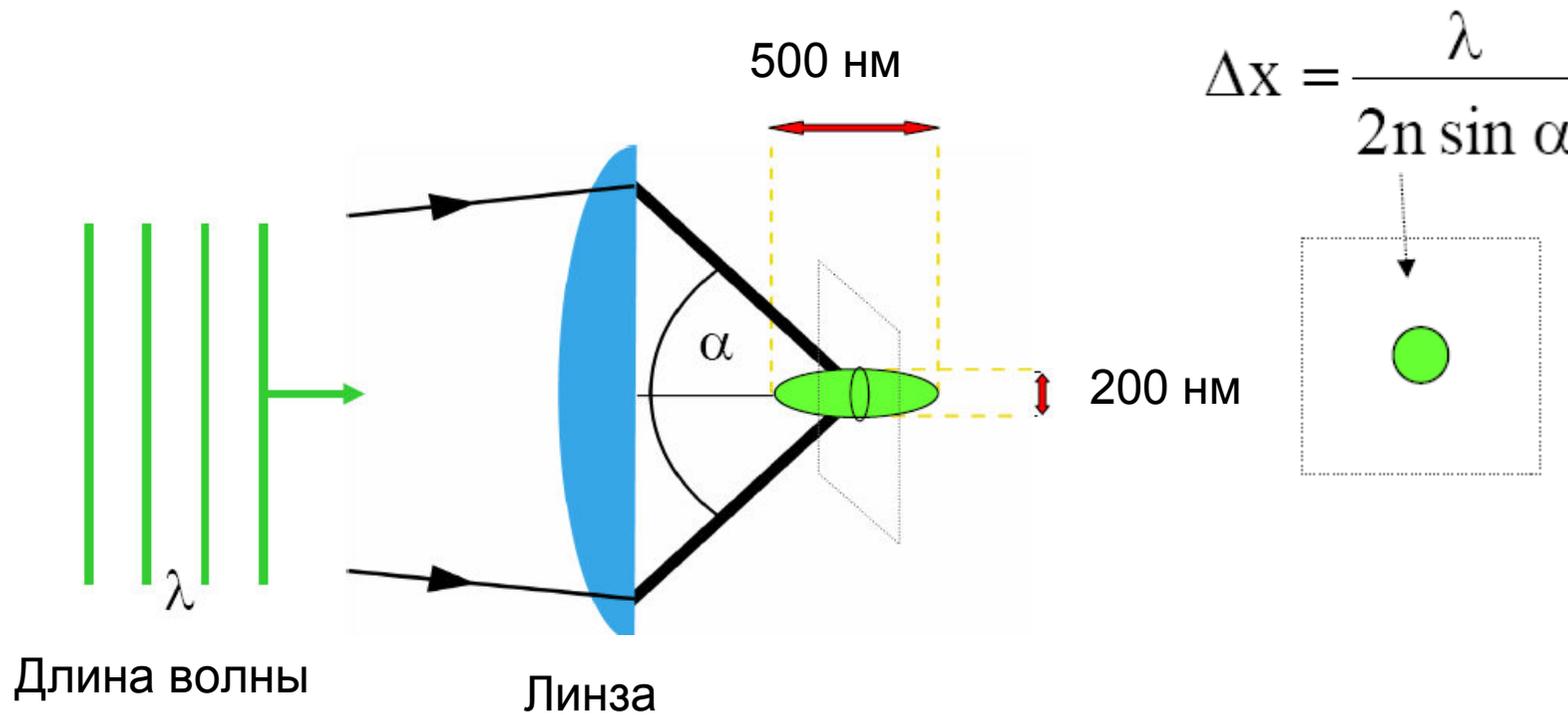
- Диагностика различных кожных заболеваний, в т.ч. раннее обнаружение злокачественных новообразований
- Тканевая инженерия
- Исследование применения косметических препаратов
- Мониторинг действия лекарственных препаратов in situ
- Исследования на лабораторных животных



Виртуальный срез кожи человека in vivo (Papilla)  
(Зеленый цвет: автофлуоресценция; красный:  
двухфотонное возбуждение)



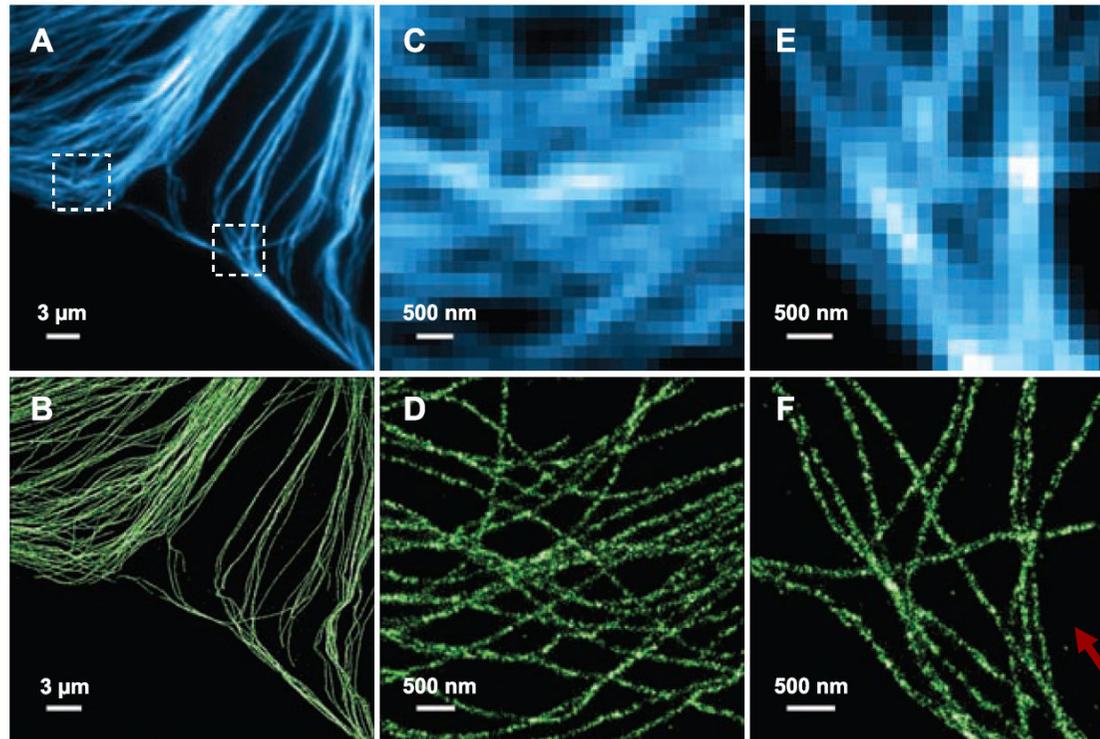
**Дифракционный предел в конфокальной микроскопии  
ограничивает разрешение метода –  
световой луч нельзя сфокусировать в пятно меньшего размера**



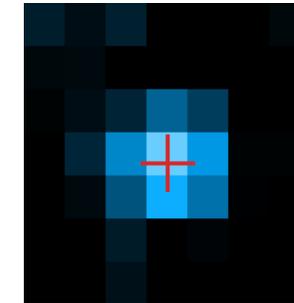
**Методы микроскопии сверхвысокого разрешения позволяют «преодолеть» дифракционный предел:**

- **Stimulated emission depletion (STED)**
- **Photoactivated Localization Microscopy (PALM)**
- **Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM)**

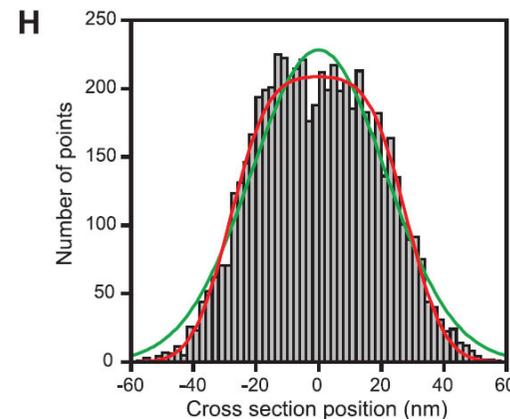
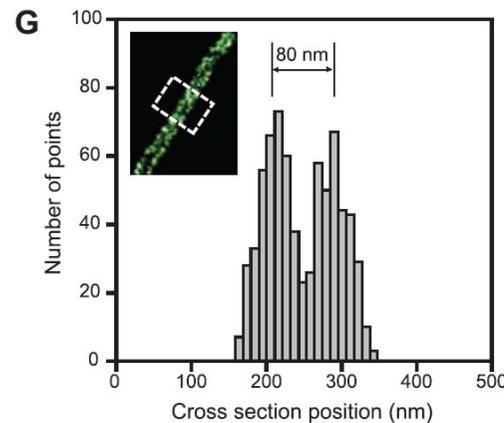
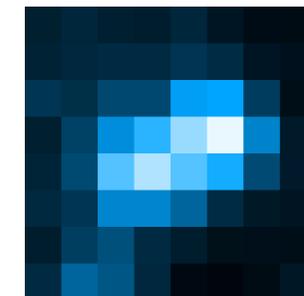
# Микроскопия сверхвысокого разрешения – Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM)



Флуоресценция одной молекулы  
и положение ее центра



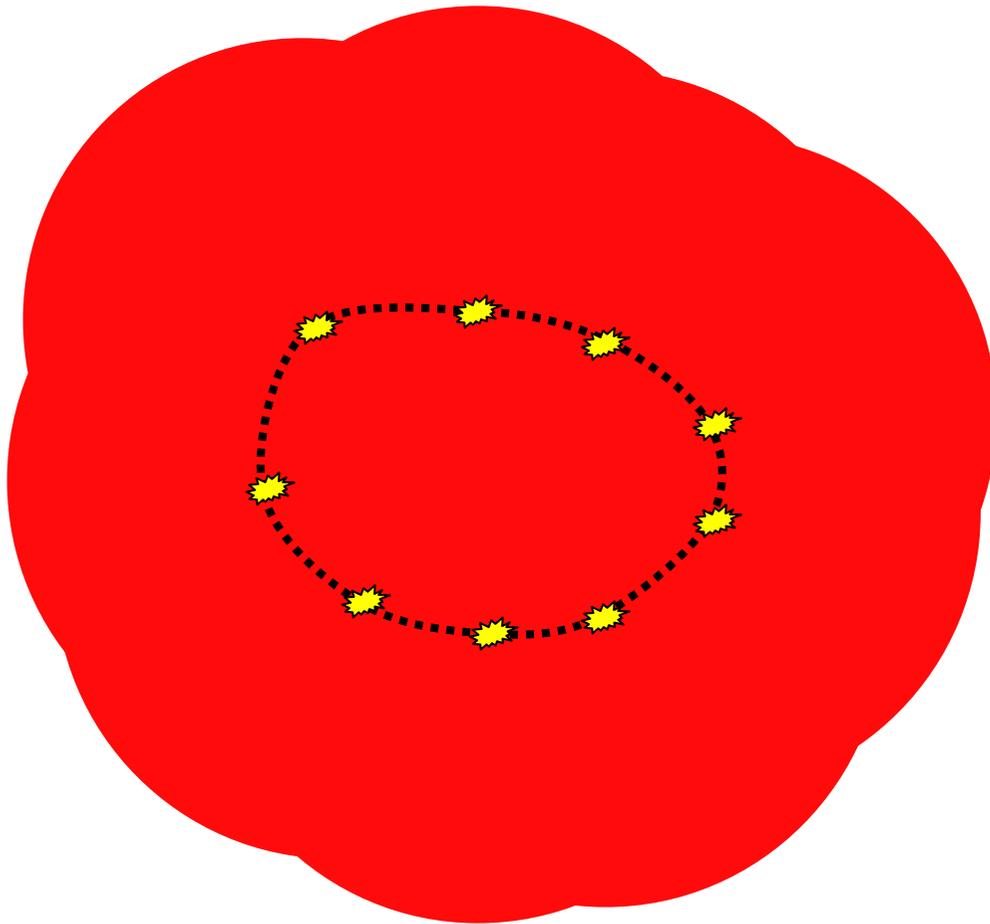
Флуоресценция нескольких близко  
расположенных молекул



Локализация молекул  
путем последовательного  
их включения

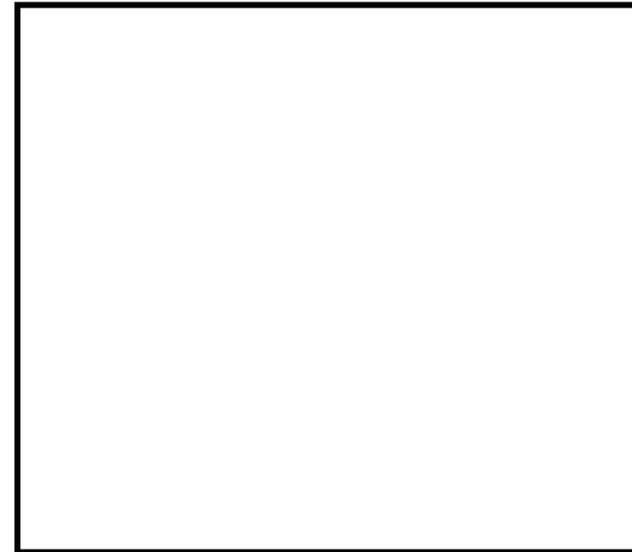
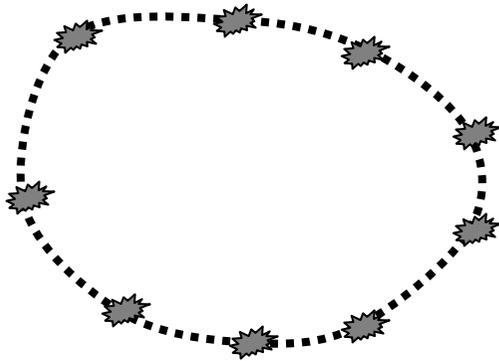
# Принцип действия STORM

Флуоресценция нескольких молекул



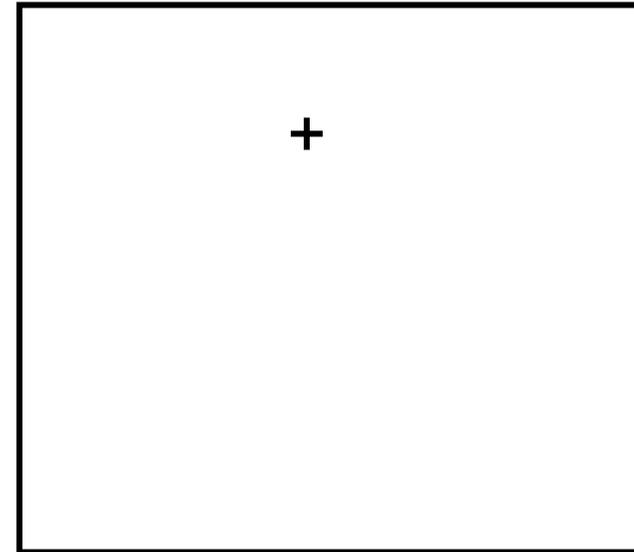
# Принцип действия STORM

1. Перевод молекул в неактивное состояние



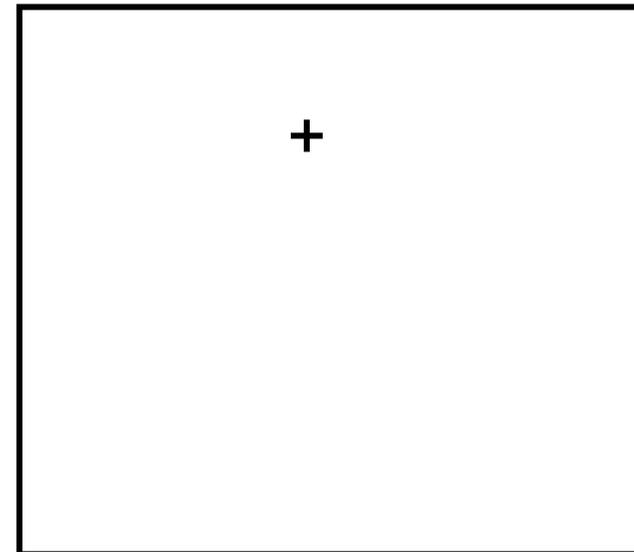
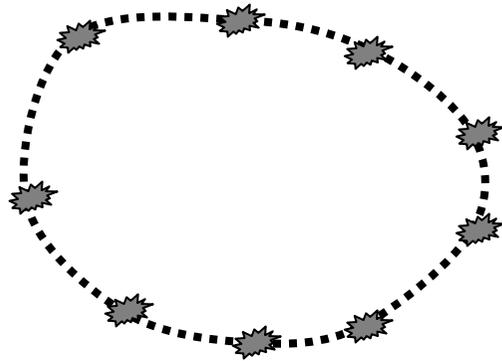
# Принцип действия STORM

2. На небольшом участке одна молекула под воздействием активирующего излучения стохастически перешла в активное состояние, в котором способна флуоресцировать



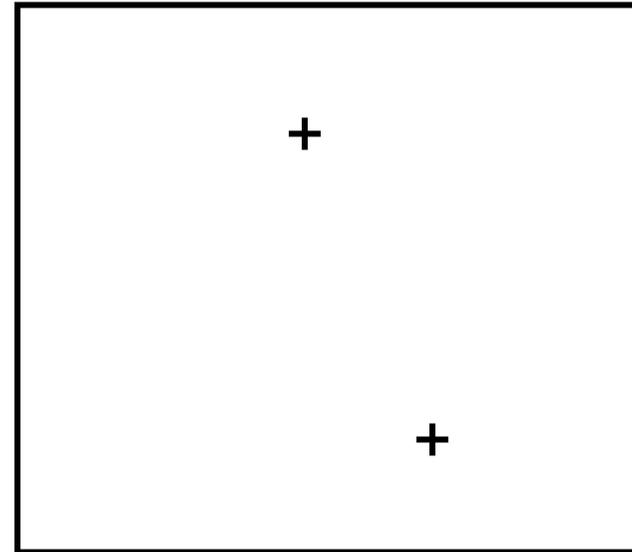
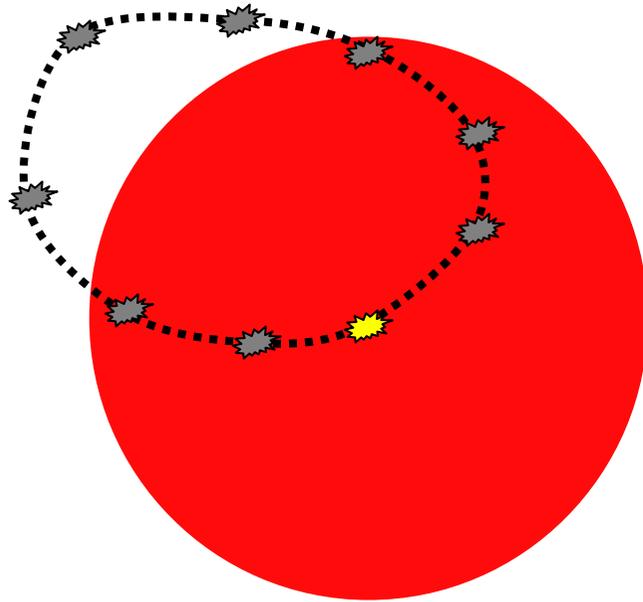
# Принцип действия STORM

3. Высвечивание молекулой большого количества фотонов привело к ее фотообесцвечиванию (либо молекула была переведена в неактивное состояние лазерным излучением)



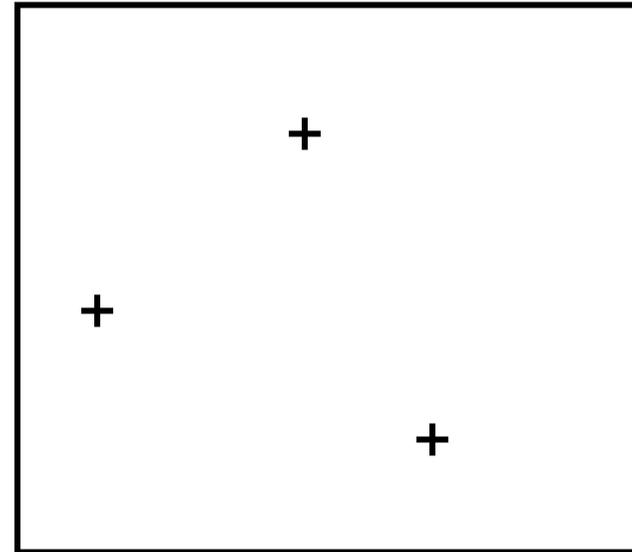
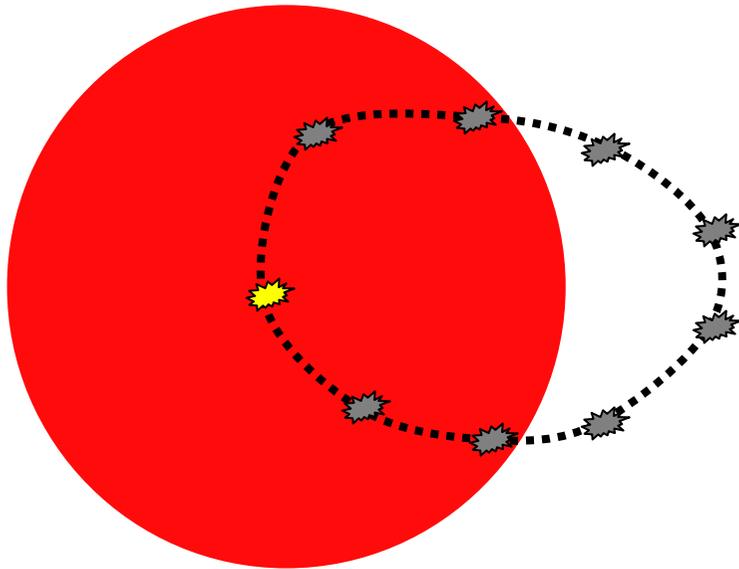
# Принцип действия STORM

4. Под воздействием активирующего света стохастически в активное состояние перешла другая молекула



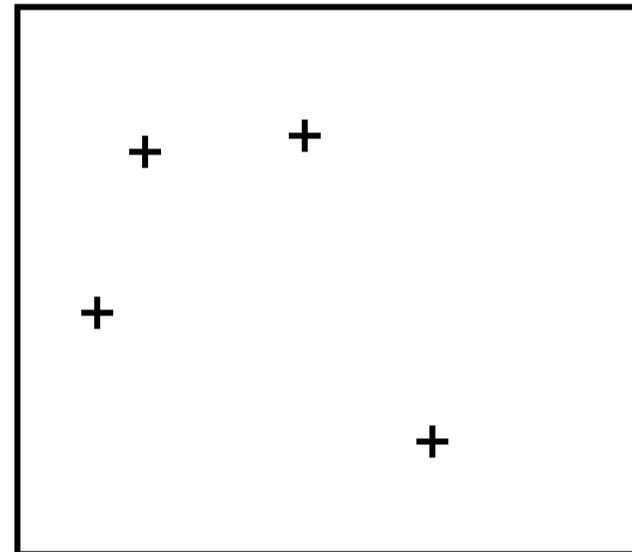
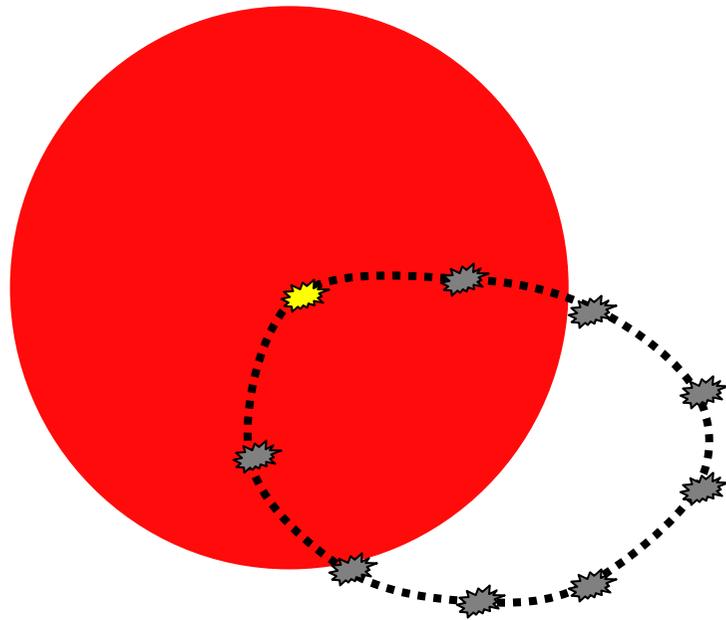
# Принцип действия STORM

5. ....потом другая



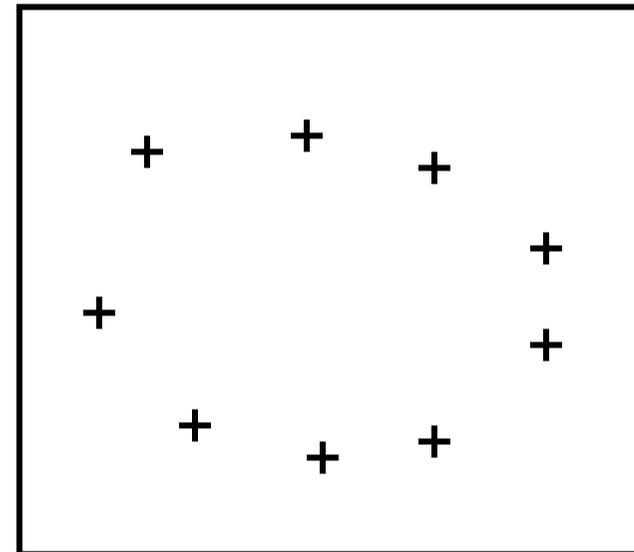
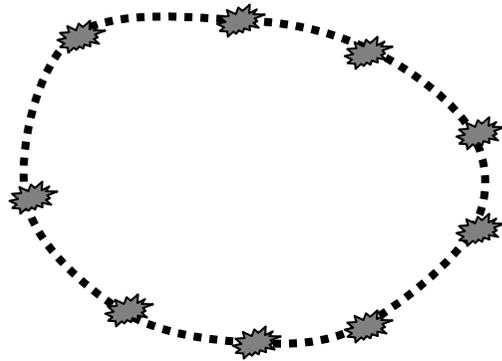
# Принцип действия STORM

....и так далее



# Принцип действия STORM

Таким образом, метод определил  
положения всех молекул в данной области с точностью,  
превышающей дифракционный предел



КЛСМ

5  $\mu\text{m}$



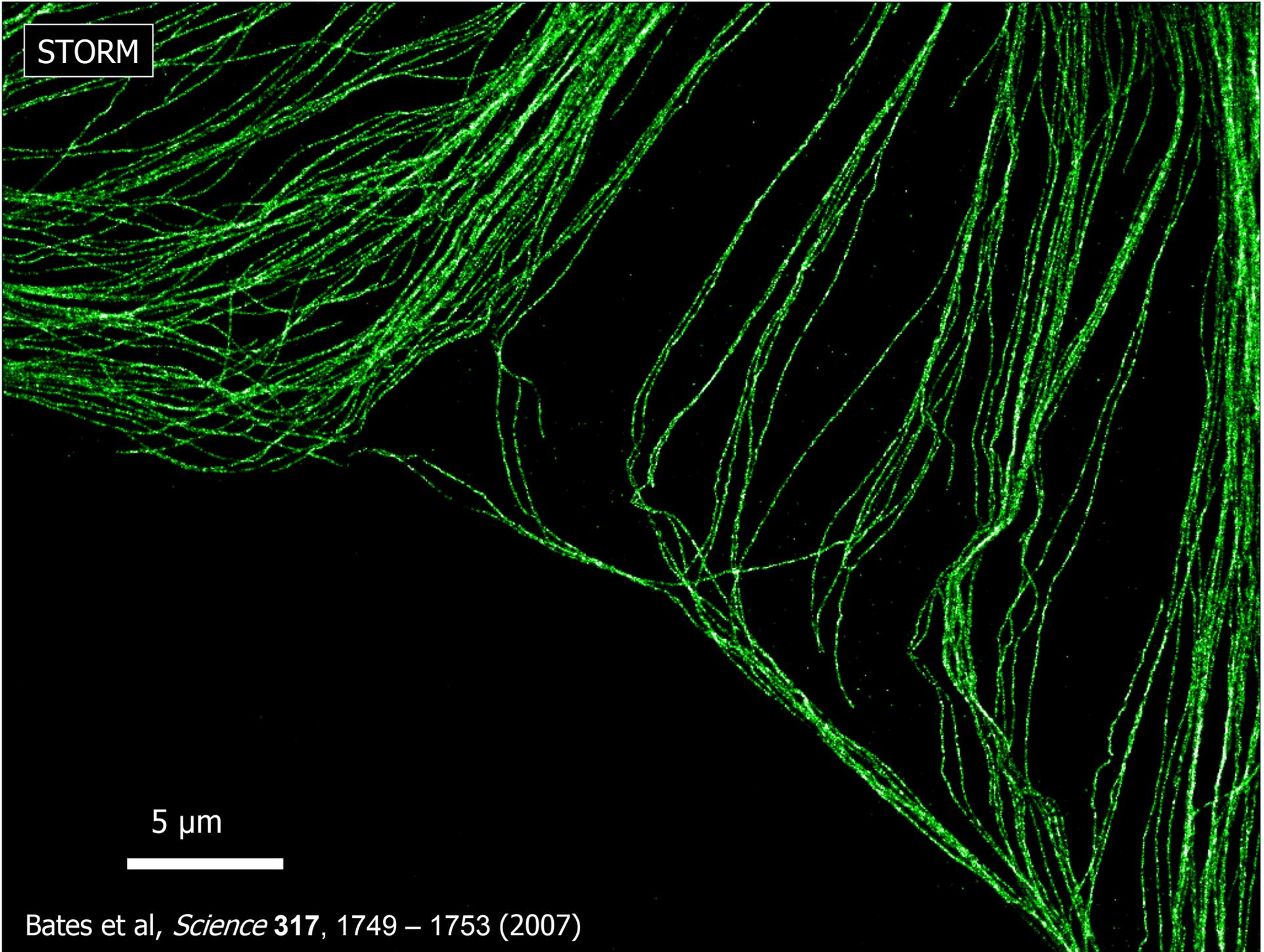
B-SC-1 cell,  
Microtubules stained with anti- $\beta$  tubulin  
Cy3 / Alexa 647 secondary antibody

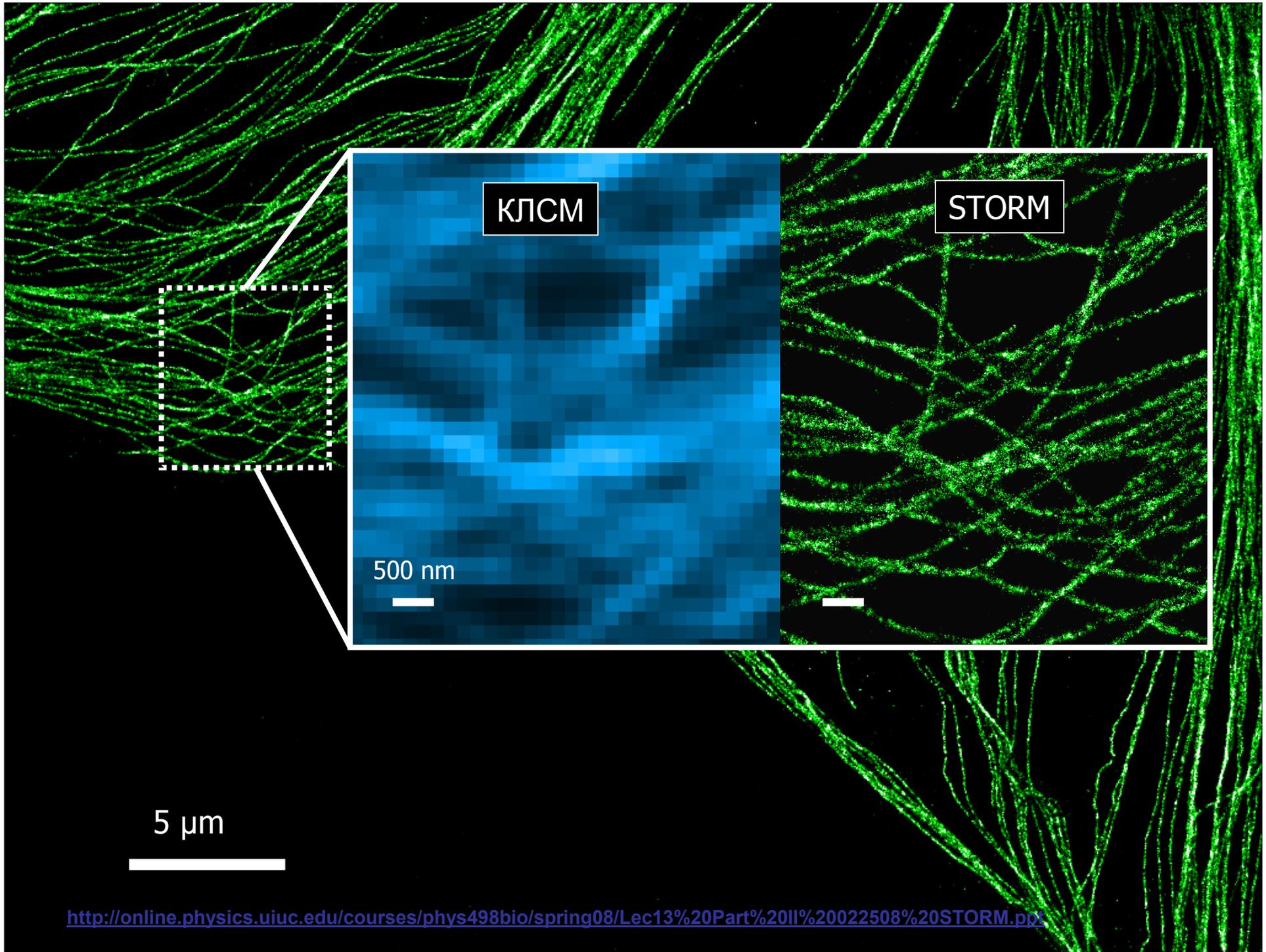
<http://online.physics.uiuc.edu/courses/phys498bio/spring08/Lec13%20Part%20II%20022508%20STORM.ppt>

STORM

5  $\mu\text{m}$

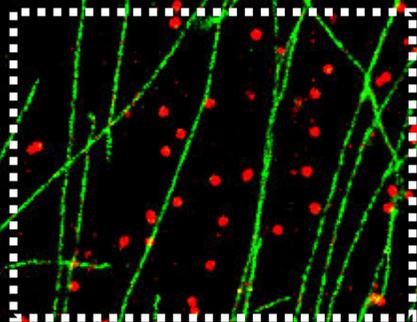
Bates et al, *Science* 317, 1749 – 1753 (2007)





STORM

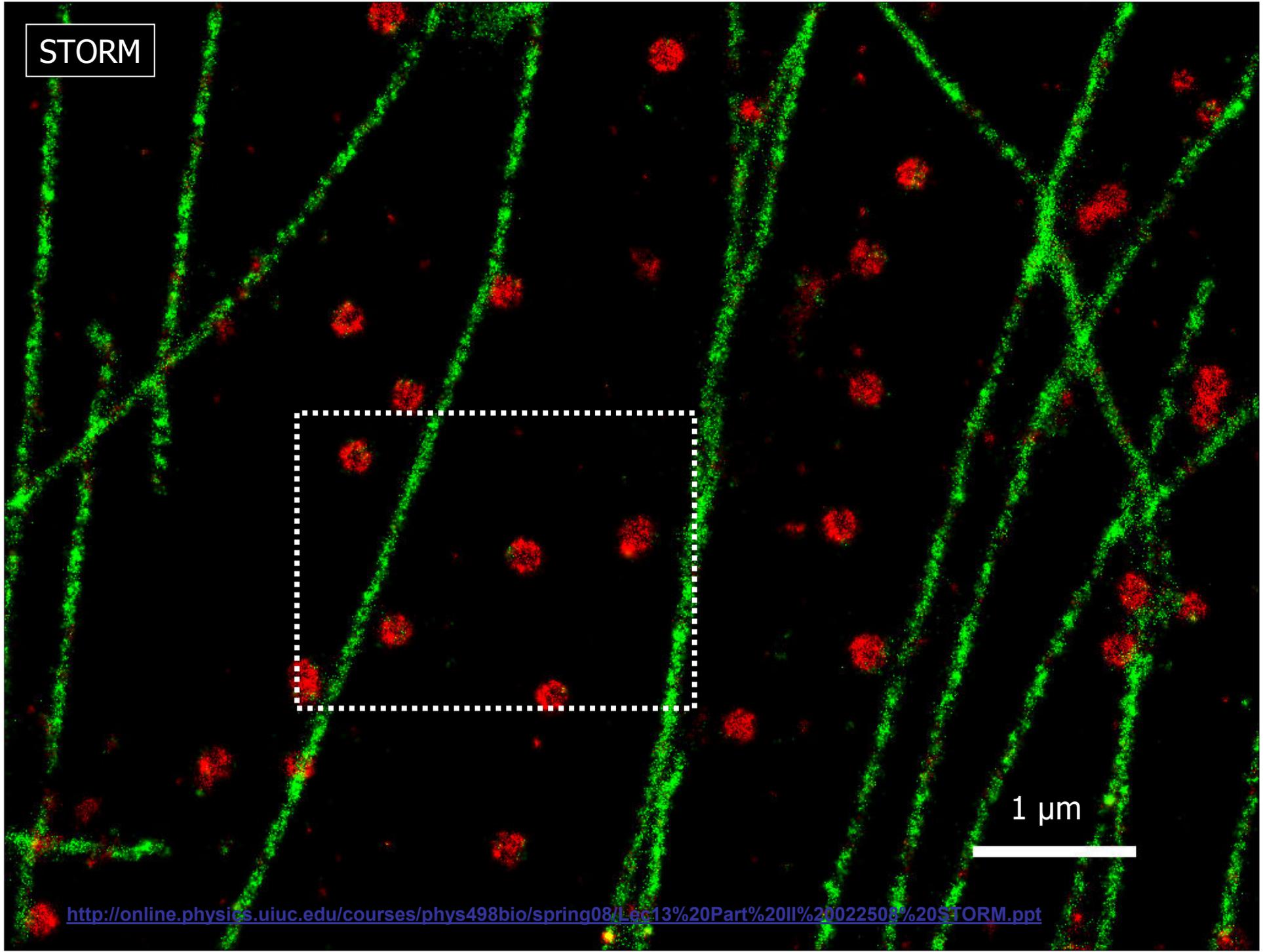
■ Cy3 / Alexa 647: Clathrin (Клатрин)  
■ Cy2 / Alexa 647: Microtubule  
(микротрубка)



5  $\mu\text{m}$

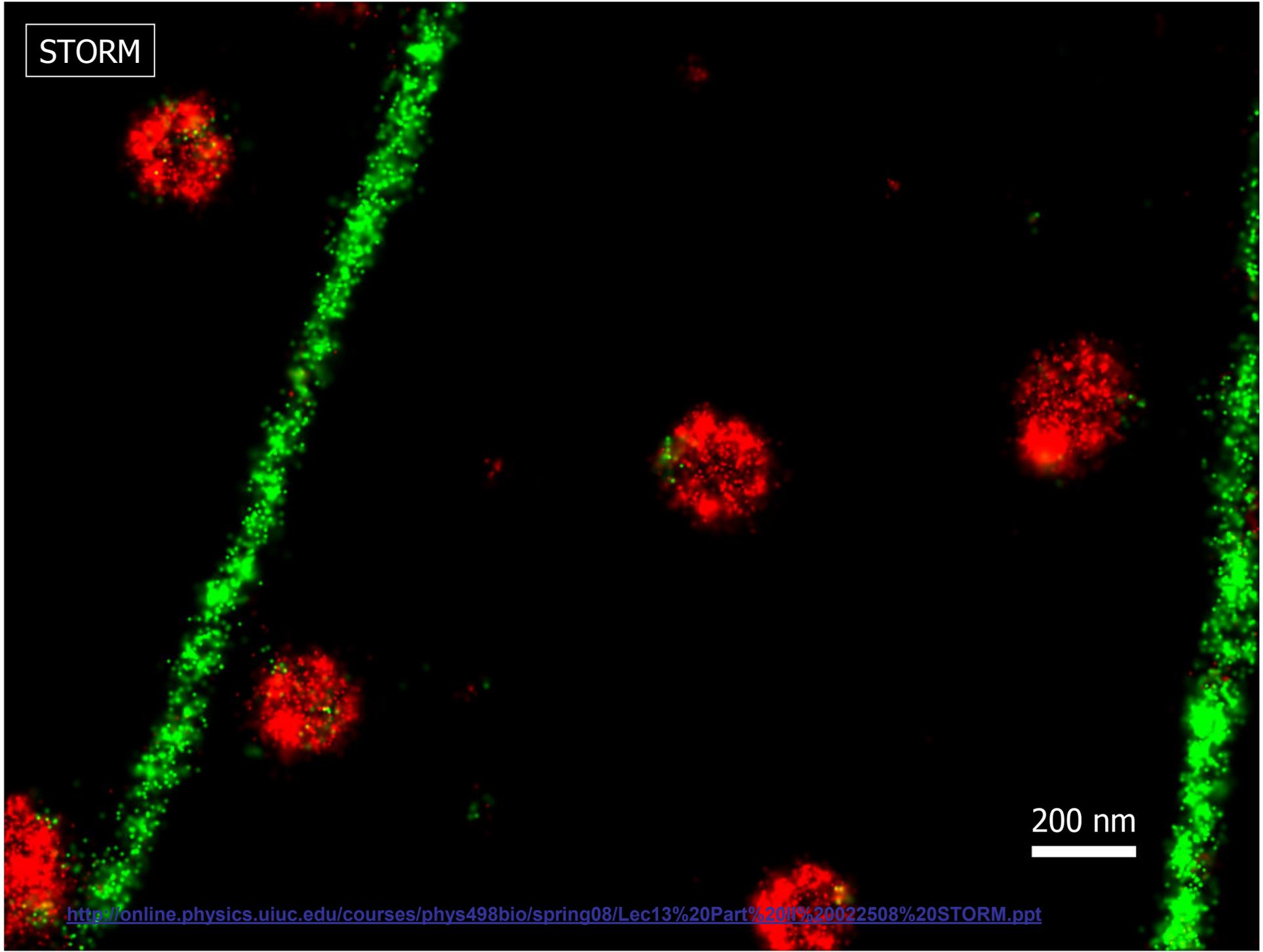
Bates et al, *Science* 317, 1749 – 1753 (2007)

STORM



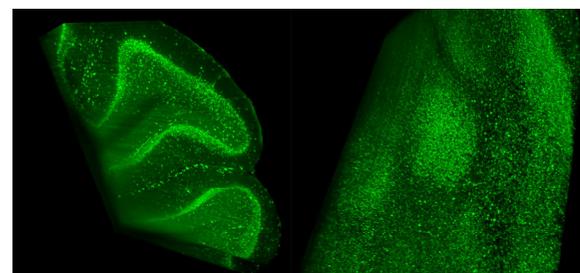
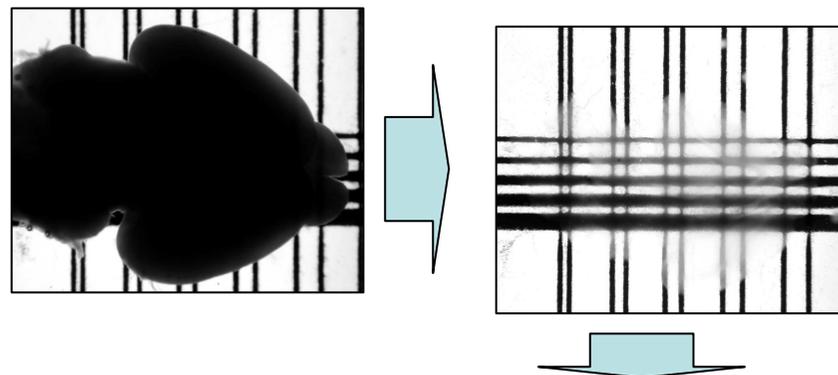
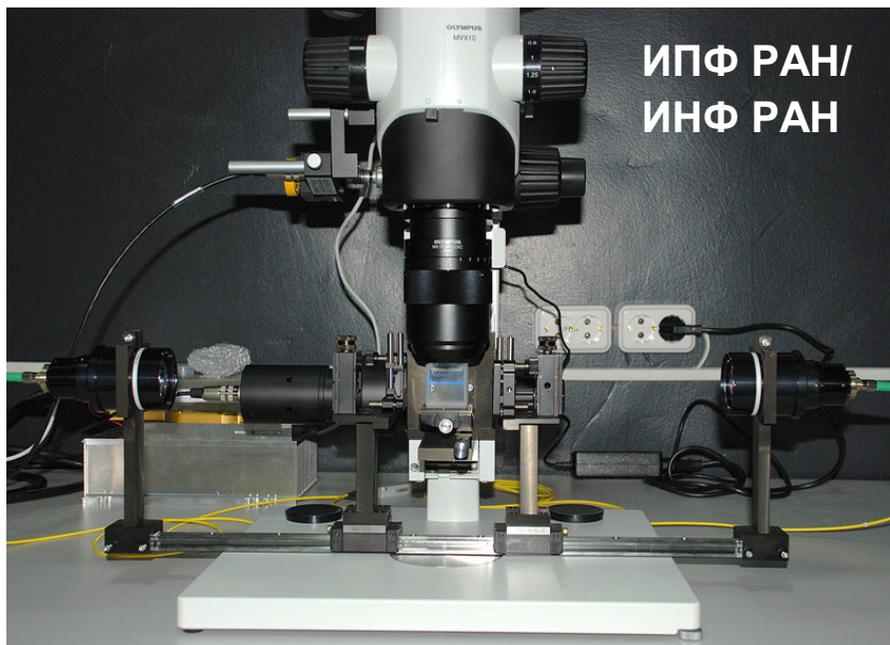
1 μm

STORM

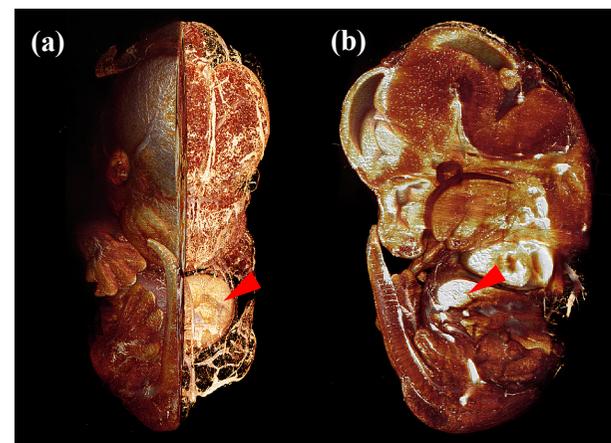
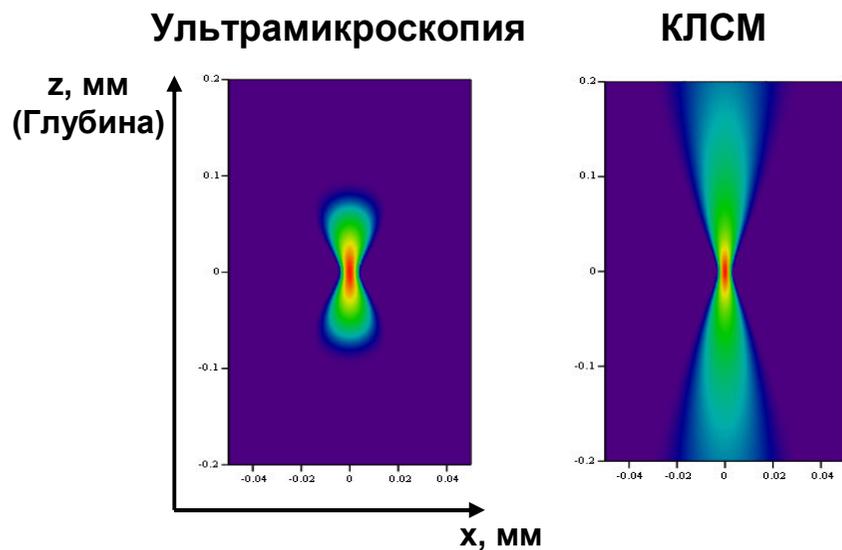


200 nm

# Флуоресцентная ультрамикроскопия просветленных образцов биоткани

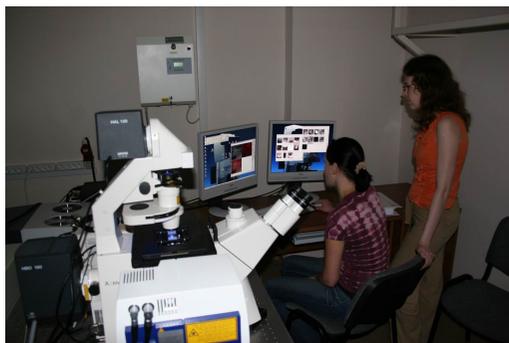


мозжечок взрослой мыши

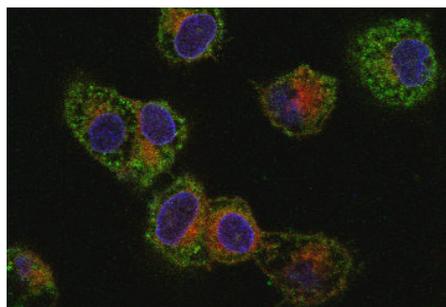


эмбрион мыши

# Институт прикладной физики РАН, лаборатория биофτονики – разработка методов оптического биоимиджинга



**микроскопия**



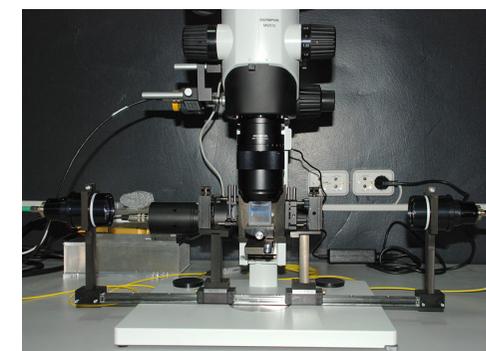
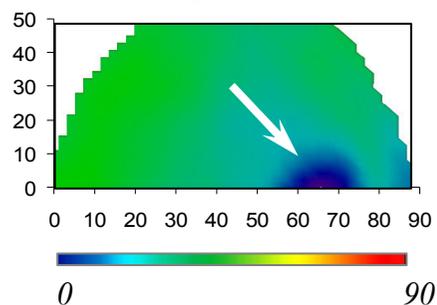
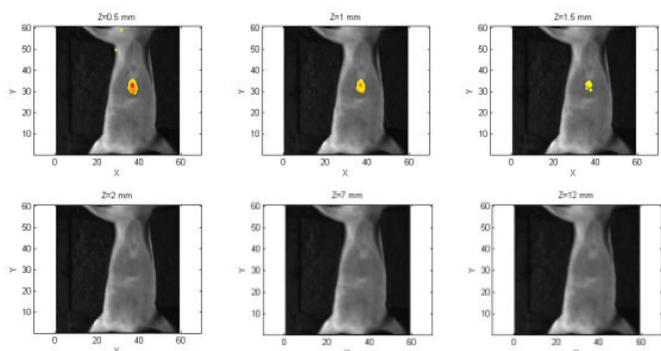
**Оптоакустика**



**Диффузионная флуоресцентная  
томография**



**Диффузионная  
спектроскопия**



**Ультрамикроскопия**

