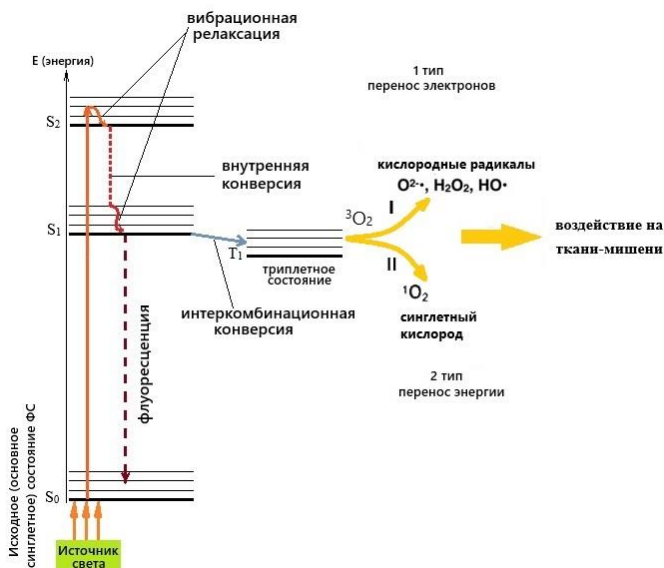


МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ЯДЕРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ «МИФИ»

ОСНОВЫ ВИДЕОФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Учебное пособие



Москва 2025

УДК 615.4 / 535.21 / 53.07 / 53.08
ББК 55.6 / 58 / 22.3с / 22.34
О 75

Основы видеофлуоресцентной диагностики / Н.А. Калягина, А.М. Удеев, Е.В. Блинова, М.В. Лощенов, А.А. Филькова, А.А. Гармаш: Учебное пособие. [Электронный ресурс]. М.: НИЯУ МИФИ, 2025. 48 с.

Учебное пособие содержит теоретические и практические аспекты видеофлуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии. Приведены концептуальные принципы работы оборудования для флуоресцентной диагностики. В лабораторных работах показаны примеры изготовления жидкостных флуоресцирующих оптических фантомов.

Учебное пособие предназначено для студентов, обучающихся по специальности 2.2.12 «Приборы, системы и изделия медицинского назначения», а также студентов, обучающихся по инженерно-физическим специальностям по направлению подготовки 03.03.02, 03.04.02, 03.05.02 «Физика», «Фундаментальная и прикладная физика», 12.03.03, 12.04.03 «Фотоника и оптоинформатика», 12.03.04, 12.04.04 «Биотехнические системы и технологии», 31.05.01 «Лечебное дело» в рамках курса по физике; по укрупнённым группам специальностей: 03 – физические науки, 12 – приборостроение, 31 – лечебное дело.

Рецензенты:

Савранский В.В. – канд. физ.-мат. наук, заведующий лабораторией Лазерной физики ФГБУН ФИЦ «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук» ИОФ РАН;

Линьков К.Г. – канд. техн. наук, старший научный сотрудник лаборатории Лазерной биоспектроскопии ФГБУН ФИЦ «Институт общей физики им. А.М. Прохорова Российской академии наук» ИОФ РАН

ISBN 978-5-7262-3202-7

© НИЯУ МИФИ, 2025

Редактор *Т.В. Волвенкова*

Подписано в печать 04.12.2025. Формат 60×84 1/16.
Печ. л. 3,0. Изд. № 003-3. Тираж 100 экз. Заказ № 58.

Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ».
Типография НИЯУ МИФИ. 115409, Москва, Каширское ш., 31.

Содержание

Предисловие	5
ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ	6
ОБНАРУЖЕНИЕ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ОБЪЕКТОВ И ИЗМЕРЕНИЕ ИНДЕКСА ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ ФД И ФДТ ПРИ ФИОЛЕТОВОМ ВОЗБУЖДЕНИИ	8
Детектирование и визуализация флуоресценции с помощью видеокамеры	8
Преимущества ФД с помощью цветной камеры	8
Пример установки для ФД	8
Подавление фоновой засветки	11
Повышение контраста	12
Количественное измерение флуоресценции	13
Алгоритм работы экспериментальной установки	14
Графический пользовательский интерфейс экспериментальной установки	15
Лабораторная работа № 1 Ознакомление с минимальными условиями обнаружения флуоресценции различных фотосенсибилизаторов	17
Лабораторная работа № 2 Обнаружение флуоресцирующих объектов и измерение индекса флуоресценции при ФД и ФДТ злокачественных новообразований при фиолетовом возбуждении (на фантомах)	18
Лабораторная работа № 3 Обнаружение различных флуоресцирующих веществ при возбуждении на длинах волн 635 нм и 780 нм. Измерение индексов флуоресценции	19
ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ ФАНТОМЫ (МОДЕЛИ)	21
Особенности создания флуоресцентных фантомов на примере метиленового синего	21

Лабораторная работа № 4	
Создание жидкостных флуоресцирующих фантомов и изучение фотообесцвечивания на примере метиленового синего	24
ЭФФЕКТ КАУТСКОГО	26
Флуоресценция хлорофилла	26
Лабораторная работа № 5	
Наблюдение эффекта Каутского	28
ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ПРИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКЕ	29
Лабораторная работа № 6	
Исследование биоэлектрических сигналов при флуоресцентной диагностике и ФДТ с использованием системы ВЮРАС	32
ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ	34
Лабораторная работа № 7	
Исследование клеточных структур методом флуоресцентной микроскопии	35
УЛЬТРАЗВУКОВАЯ АППАРАТУРА В ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ	37
Лабораторная работа № 8	
Ультразвуковая диагностика структурных и сосудистых изменений при ФДТ	38
Тестовые вопросы для контроля знаний	40
Список литературы	47
Ответы на тестовые вопросы	48

Предисловие

В пособии приведены основные понятия и принципы видеофлуоресцентной диагностики, изложены основы проведения фотодинамической терапии, показаны основные принципы и подходы к приготовлению оптических фантомов с флуоресцентными свойствами, изложены основы применения электрофизиологических методов, ультразвуковой диагностики и флуоресцентной микроскопии. Приведены некоторые принципы формирования, передачи, обработки и регистрации флуоресцентных сигналов, регистрируемых видеокамерой. Пособие содержит восемь лабораторных работ по изучаемой тематике: по одной или несколько в каждом разделе.

ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКИ И ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Флуоресцентная диагностика (ФД) и фотодинамическая терапия (ФДТ) или комбинированная фототерапевтика (тераностика: терапия + диагностика) предназначены, соответственно, для определения точной локализации опухоли, ее терапии или комбинации этих целей с возможностью контроля терапии.

Принципы ФД и ФДТ проиллюстрированы на рис. 1. Классическое объяснение механизма ФДТ предполагает применение фотосенсибилизатора (ФС) – нетоксичного красителя, молекулы которого под действием поглощенных квантов света (как правило, видимого диапазона длин волн) частично переходят в возбужденное короткоживущее синглетное состояние, при возврате из которого обратно в основное испускают квант света (флуоресценция) или тепло (внутренняя конверсия). Другая часть молекул может превращаться в гораздо более долгоживущее возбужденное триплетное состояние (T₁, T₃). В возбужденном триплетном состоянии молекулы ФС могут: а) реагировать с молекулярным кислородом путем переноса энергии с образованием синглетного кислорода (процесс, который называется реакцией типа II); б) подвергаться реакции переноса электрона с образованием ионов-радикалов ФС, которые, в свою очередь, реагируют с кислородом с образованием цитотоксических соединений, таких как супероксид, перекись водорода и/или гидроксильные радикалы (что называется реакцией типа I). Синглетный кислород или другие активные формы кислорода (АФК) могут вызывать повреждение бактериальных клеток или других микробов посредством нескольких механизмов. К ним относятся окисление мембранных липидов и аминокислот в белках, сшивание белков и окислительное повреждение нуклеиновых кислот с последующим нарушением нормального функционирования возбудителя [1, 2].

Поскольку фотосенсибилизатор селективно накапливается в опухолях, а облучение производится именно в область опухоли, разрушаются, в основном, патологические клетки. Также селективное накопление позволяет точно обнаруживать положение и уточнять границы новообразований. Тетрапиррольные структуры, такие как порфирины, хлорины, бактериохлорины и фталоцианины обладают

уникальными свойствами и часто применяются в ФДТ [3, 4]. В Российской Федерации разрешены к применению фотосенсибилизаторы на основе хлорина-е6 и прекурсора протопорфирина-IX (5-АЛК).

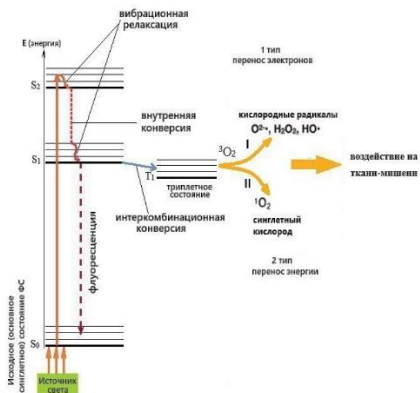


Рис. 1. Диаграмма Яблонского. Принцип действия фотодинамической терапии (ФДТ)

Для проведения ФДТ и фотодиагностики (ФД) вначале пациенту вводят ФС (например, внутривенно, рис. 2). После чего молекулы ФС с кровотоком или лимфотоком (в некоторых случаях остаются на поверхности – при методе аппликации) начинают распределяться по телу пациента. По прошествии специфичного для каждого ФС времени молекулы препарата накапливаются в новообразованиях с максимальным относительно здоровых тканей контрастом концентрации.

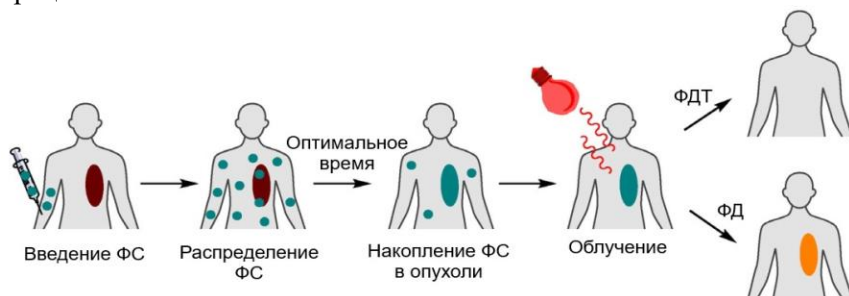


Рис. 2. Последовательность действий и явлений при проведении ФД и ФДТ [5]

Поскольку молекулы ФС проявляют флуоресцентные свойства, то ткани, накопившие препарат, (опухоли) под воздействием внешнего возбуждающего излучения начинают флуоресцировать, что позволяет по картине флуоресценции локализовать их положение и уточнить границы.

ОБНАРУЖЕНИЕ ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИХ ОБЪЕКТОВ И ИЗМЕРЕНИЕ ИНДЕКСА ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ПРИ ФД И ФДТ ПРИ ФИОЛЕТОВОМ ВОЗБУЖДЕНИИ

Детектирование и визуализация флуоресценции с помощью видеокамеры

Преимущества ФД с помощью цветной камеры

Известно, что здоровые ткани флуоресцируют в зеленой области спектра благодаря содержанию коллагена, НАДН, флавинов и липо-пигментов [6–8] (рис. 3,*з*). Наиболее широко применяемые фотосенсибилизаторы, такие как Себ и индуцированный с помощью 5-ALA РrIX, флуоресцируют в красной области спектра (рис. 3,*з*). Соответственно, новообразования, накопившие препараты, также флуоресцируют в красной области спектра. Таким образом, флуоресценцию эндогенных флуорофоров можно зарегистрировать зеленым каналом цветной камеры, а флуоресценцию опухолей – красным. Спектральные отклики каналов камеры представлены на рис. 3,*а*. Спектры поглощения и флуоресценции хлорина-еб, являющегося действующим веществом во многих фотосенсибилизаторах, зарегистрированных в Российской Федерации, показаны на рис. 3,*б*.

Пример установки для ФД

Установка, представленная на рис. 4, включает в себя один светодиод с центральной длиной волны 405 нм (совпадает с одним из пиков поглощения Себ и РrIX) и оптической мощностью 200 мВт для возбуждения флуоресценции ФС; один светодиод с центральной длиной волны 635 нм для возбуждения Себ, РrIX, метиленового синего (МС), фталоцианинов алюминия и цинка (AlPc и ZnPc); один светодиод с центральной длиной волны 785 нм и оптической мощ-

ностью 200 мВт для возбуждения флуоресценции индоцианина зеленого (ICG) и один белый светодиод мощностью 200 мВт для создания предсказуемого и повторяемого паттерна подсветки операционного поля в целях вычитания фона из флуоресцентного изображения.

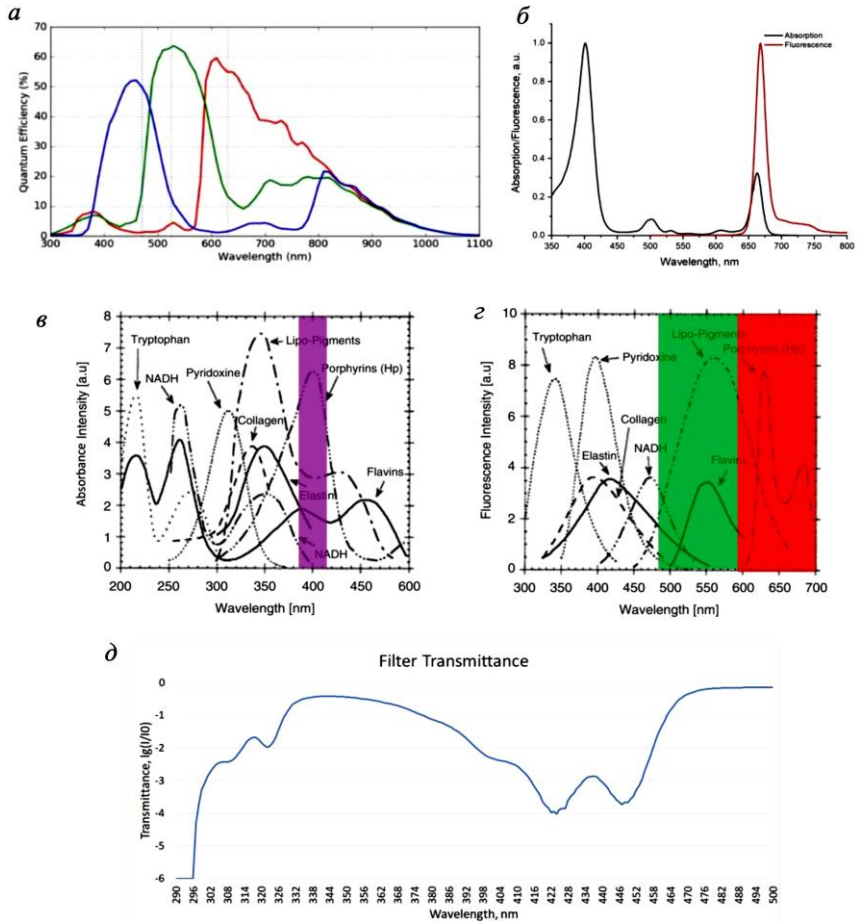


Рис. 3. Спектральный отклик каналов камеры [9] (а), спектры поглощения и флуоресценции СеВ [10] (б), спектры поглощения эндогенных флуорофоров (в), спектры флуоресценции эндогенных флуорофоров (z), спектр пропускания примененного фильтра (д); ((в), (z) адаптировано из [11])

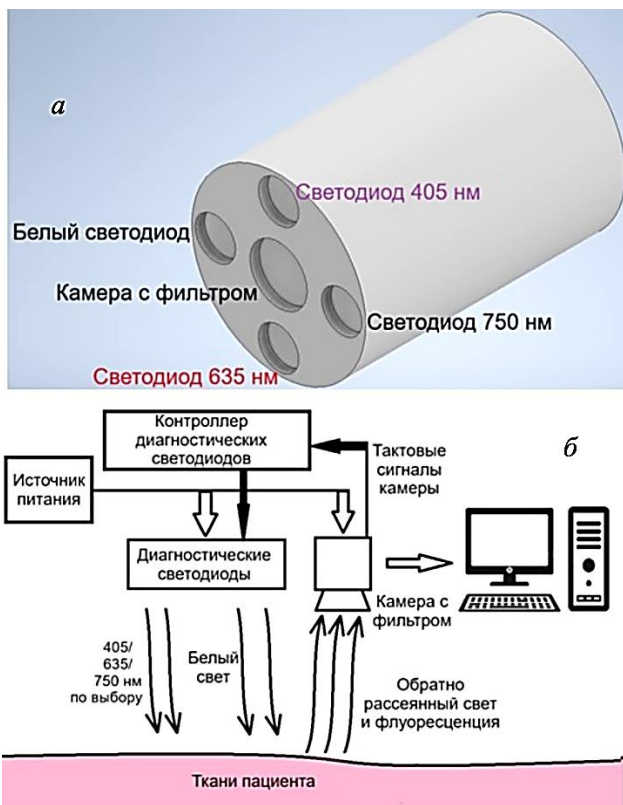


Рис. 4. Экспериментальная установка: а) внешний вид; б) концепция

Режимами работы светодиодов через интегральные драйверы LDD-700L управляет контроллер на базе Raspberry Pi Pico. Применяется по одному драйверу для каждого из четырех светодиодов. Контроллер получает стробирующие импульсы от камеры и передает на драйверы стартовые импульсы и ШИМ сигнал для управления яркостью светодиодов. Перед камерой установлен фильтр, который подавляет фиолетовое излучение для возбуждения флуоресценции, не давая ему поступить в матрицу. Большая часть излучения белого светодиода для подсветки операционного поля проходит через фильтры. Спектр пропускания фильтра для подавления возбуждающего излучения с длиной волны 405 нм представлен на рис. 3, д. Излучение красного и ИК-светодиодов фильтруется полосовыми

интерференционными фильтрами для того, чтобы «хвосты» их спектров излучения не попадали в камеру и не перекрывали сигнал флуоресценции. Установка также содержит 12-вольтовый вентилятор для принудительного воздушного охлаждения.

Подавление фоновой засветки

Для уменьшения влияния внешней засветки на результаты флуоресцентной диагностики применяется времяразрешенный метод подавления фонового сигнала.

Иллюстрация его работы приведена на рис. 5.

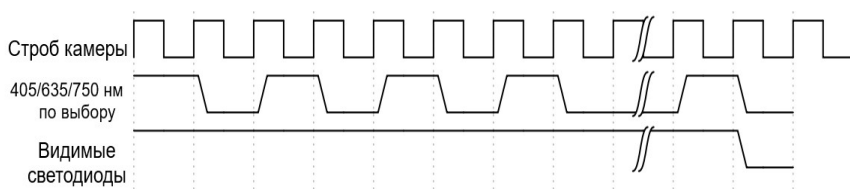


Рис. 5. Временные диаграммы работы светодиодов

После инициализации экспериментальной установки камера на каждом кадре начинает генерировать тактирующие импульсы длительностью, равной времени выдержки. По каждому второму импульсу контроллер включает и выключает сигнал широтно-импульсной модуляции (ШИМ-сигнал), идущий на драйвер светодиодов возбуждения, который в соответствии со значением ШИМ включает и выключает светодиоды возбуждения с заданной яркостью. Тем самым получают пары кадров с флуоресценцией и без нее, что позволяет вычесть кадр без флуоресценции из кадра с флуоресценцией, тем самым подавив внешнюю фоновую засветку. Яркость белого светодиода, создающего предсказуемый паттерн освещенности операционного поля, также задается с помощью ШИМ, белые светодиоды горят постоянно. Временные диаграммы работы светодиодов возбуждения показаны на рис. 5.

Если контраст опухоли по отношению к здоровым тканям недостаточен, необходимо применить один из двух методов повышения контраста, предусмотренных в экспериментальной установке.

Повышение контраста

Данные методы применимы с возбуждающим излучением с длиной волны 405 нм. Идея методов повышения контраста флуоресцентных изображений основана на известном эффекте, когда «зеленая» флуоресценция биотканей уменьшается при переходе от здоровых тканей к тканям опухоли, накопившей ФС, а «красная», наоборот, возрастает [6–8], (рис. 6). Линейное изменение красной и зеленой флуоресценции на рис. 6 имитирует все возможные соотношения красного и зеленого сигналов. Также на рис. 6 представлены соответствующие этим соотношениям сигналов величины R/G и $R-G$ (синий и желтый графики соответственно). Отношение R/G медленно возрастает до момента, когда зеленый сигнал становится близок к нулю. Разность $R-G$ линейно возрастает и приобретает положительные значения в области, где $R > G$. Значения графика $R-G$ превышают значения графика R/G в переходной области, что позволяет в режиме $R-G$ визуализировать границы опухоли более уверенно и детально.

Следует помнить, что метод $R-G$ не показывает сигналы в областях, где красная флуоресценция тусклее зеленой, что связано с применением в программе установки для отображения яркости пикселей типа представления данных `uint8`. Поэтому есть риск недооценить размер опухоли (рис. 6).

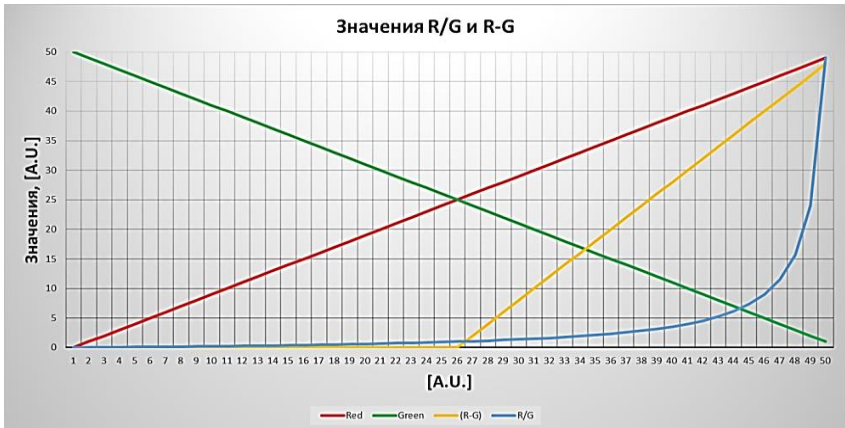


Рис. 6. Теоретические основы двух подходов повышения контраста

Уравнение значений пикселей результирующих кадров при методе повышения контраста R/G :

$$Image_{result}^{R/G}[i, j] = \frac{|I_{fluor}^{red}[i, j] - I_{background}^{red}[i, j]|}{|I_{fluor}^{green}[i, j] - I_{background}^{green}[i, j]|} + I_{Background}^{green}[i, j]. \quad (1)$$

Уравнение значений пикселей результирующих кадров при методе повышения контраста $R-G$:

$$Image_{result}^{R-G}[i, j] = \left| |I_{fluor}^{red}[i, j] - I_{background}^{red}[i, j]| - |I_{fluor}^{green}[i, j] - I_{background}^{green}[i, j]| \right| + I_{Background}^{green}[i, j], \quad (2)$$

где $|I_{fluor}^{red}[i, j] - I_{background}^{red}[i, j]|$ и $|I_{fluor}^{green}[i, j] - I_{background}^{green}[i, j]|$ – разности по модулю между величинами яркости пикселей кадра-разности кадров с флуоресценцией и без нее, а $I_{Background}^{green}[i, j]$ – значения пикселей зеленого канала кадра без флуоресценции.

Количественное измерение флуоресценции

Помимо картирования распределения флуоресценции по тканям необходима количественная метрика интенсивности флуоресценции для более объективной оценки концентрации фотосенсибилизатора в исследуемых тканях.

В качестве такой метрики в представленной установке применен индекс флуоресценции FI :

$$FI_B = \frac{\sum_{cursor} I_{fluor}^{red} - \sum_{cursor} I_{background}^{red}}{\sum_{cursor} I_{red}^{background}}, \quad (3)$$

где $\sum_{cursor} I_{fluor}^{red}$ – сумма интенсивностей пикселей красного канала кадра с флуоресценцией внутри курсора, а $\sum_{cursor} I_{background}^{red}$ – сумма интенсивностей пикселей красного канала кадра без флуоресценции внутри курсора.

Алгоритм работы экспериментальной установки

Пример алгоритма работы установки представлен на рис. 7.

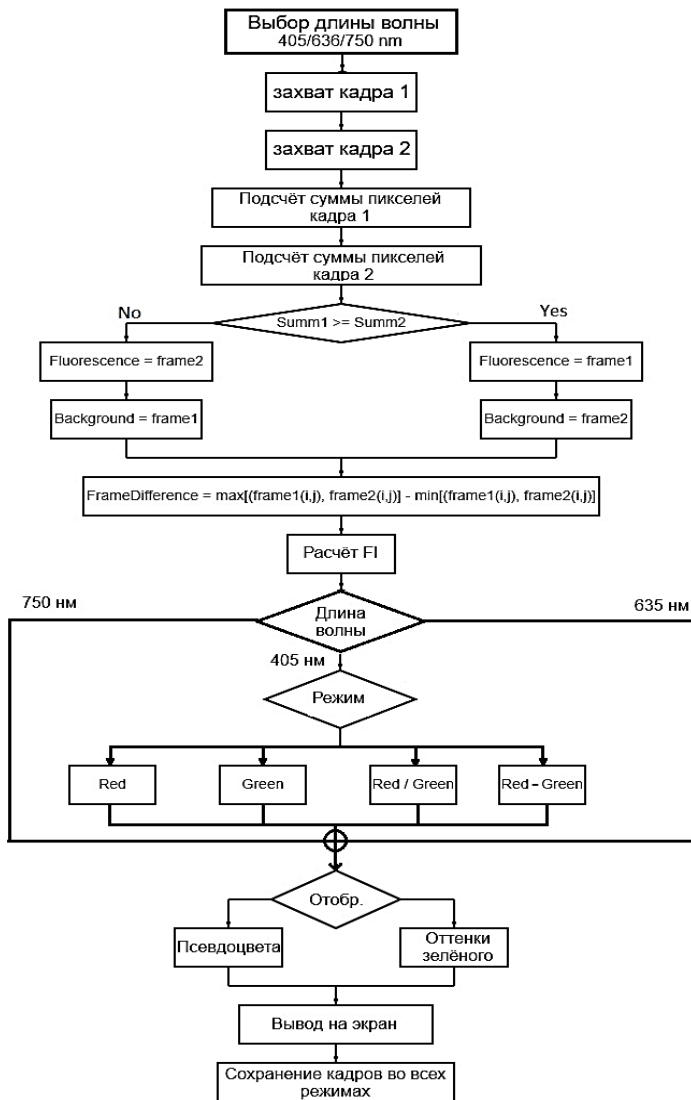


Рис. 7. Алгоритм работы установки для ФД

1. Перед началом работы или в процессе работы программы выбирается длина волны возбуждающего излучения.

2. На первом этапе алгоритма камера захватывает пары кадров (один – с включенными светодиодами возбуждения и, соответственно, с флуоресценцией, другой – только с включенными белыми светодиодами подсветки операционного поля (в этом кадре нет флуоресценции)).

3. Затем выбирается кадр с максимальной суммой значений (яркости) пикселей. Из него попиксельно вычитается кадр с меньшей суммой значений пикселей.

4. Далее вычисляется индекс флуоресценции в области прицела 10×10 пикселей в центре экрана по формуле (3). Индекс флуоресценции показывается в левом верхнем углу экрана.

5. На экране демонстрируется видеоряд согласно выбранному режиму визуализации: визуализация интенсивности пикселей красного или зеленого канала. Если выбрана длина волны возбуждения 405 нм, то становится полезной визуализация величины соотношений пикселей высококонтрастных режимов R/G или $R-G$.

6. Интенсивность флуоресценции накладывается на фоновый кадр оттенками зеленого или в псевдоцветах по выбору пользователя.

7. При нажатии кнопки «Save» сохраняются следующие кадры: фоновый кадр без флуоресценции, кадр с флуоресценцией, кадры с интенсивностью красного и зеленого канала, наложенной оттенками зеленого на фоновый кадр, а также кадры с величинами $R-G$ и R/G , наложенные оттенками зеленого на фоновый кадр. При выборе режима отображения в псевдоцветах все кадры, кроме фонового и флуоресцентного, отображаются в псевдоцветах.

Графический пользовательский интерфейс экспериментальной установки

Графический пользовательский интерфейс (ГПИ) установки показан на рис. 8.

Группа радиокнопок «длина волны» служит для выбора длины волны возбуждающего излучения.

Включение или выключение захвата видео осуществляется при нажатии кнопок «Start» и «Stop» соответственно. Продвинутые

настройки камеры можно найти, нажав кнопку «Props». Яркость отображения флуоресцентного сигнала можно регулировать с помощью слайдера. Он отвечает за коэффициент, на который домножается сигнал выбранного канала камеры или величин R/G и $R-G$. Радиокнопки ниже позволяют выбрать режим работы прибора: красный канал, зеленый канал, высококонтрастные режимы R/G и $R-G$, а также режимы визуализации фонового кадра, например, в оттенках серого, в цвете или в псевдоцветах.

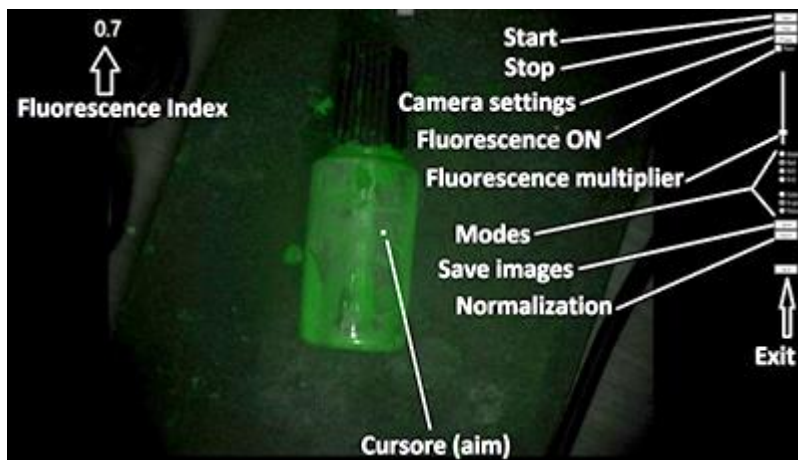


Рис. 8. Графический пользовательский интерфейс программы установки

Для нормировки индекса флуоресценции служит кнопка «Norm». Для этого нужно навести прицел-курсор на заведомо здоровую ткань и нажать на данную кнопку. После этого индекс флуоресценции в выбранной точке будет равным 1,0. Для сохранения интересных кадров необходимо нажать на кнопку «Save». Для выхода из программы нажмите «Quit».

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 1

Ознакомление с минимальными условиями обнаружения флуоресценции различных фотосенсибилизаторов

Цель: обнаружить флуоресценцию различных фотосенсибилизаторов, например, с действующим веществом хлорин-е6 (Ce6) или флуоресценцию вещества протопорфирина-IX, участника цикла клеточного дыхания, повышенное образование которого наблюдается в опухолях из-за отличного от здоровых клеток метаболизма и которое можно усилить с помощью препаратов с веществом 5-АЛК, а также оценивать чувствительность камеры (в т.ч. смартфона) к флуоресценции.

Задачи

1. Ознакомиться с применяемым оборудованием.
2. Выполнить работу согласно разделу «Порядок выполнения работы».

Оборудование

1. Светодиодный фонарь с длиной волны около 395 нм для возбуждения флуоресценции.
2. Набор фантомов с различными концентрациями фотосенсибилизаторов (Ce6/PrIX/ возможно др.)
3. Фильтры оптические.
4. Камера смартфона или другая камера.
5. Канцелярская резинка.

Порядок выполнения работы

1. С помощью канцелярской резинки закрепить фильтр на смартфоне/камере. **(ИСКЛЮЧИТЬ РИСК ЦАРАПАНИЯ ФИЛЬТРА ТВЕРДЫМИ ДЕТАЛЯМИ СМАРТФОНА/КАМЕРЫ).**

2. Расположить фантомы в порядке возрастания концентрации.
3. Подсветить ряды фантомов светодиодным фонарем для возбуждения флуоресценции.
4. Подобрать подходящий оптический фильтр, с помощью которого будет детектироваться флуоресценция.
5. Сфотографировать флуоресцирующие фантомы и сделать вывод о способности камеры смартфона обнаруживать различные концентрации фотосенсибилизаторов. (При недостаточной чувствительности камеры повысить ее.)

Примечание: возможна ситуация, когда флуоресценция одного фантома будет подсвечивать соседние. При обнаружении этого эффекта отодвиньте фантомы подальше друг от друга.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 2

Обнаружение флуоресцирующих объектов и измерение индекса флуоресценции при ФД и ФДТ злокачественных новообразований при фиолетовом возбуждении (на фантомах)

Цель: ознакомиться с практическими аспектами обнаружения флуоресценции фотосенсибилизаторов, возбуждаемых фиолетовым излучением.

Задачи

1. Ознакомиться с применяемым оборудованием.
2. Выполнить работу согласно разделу «Порядок выполнения работы».

Оборудование

1. Универсальный диагностический модуль (УДМ)
2. ПК, с программным обеспечением для работы с УДМ.
3. Жидкостные фантомы фотосенсибилизаторов Себ и/или РrIX.

Порядок выполнения работы

1. Ознакомьтесь подробно с интерфейсом программы, опираясь на рис. 7.

2. Получите флуоресцентные изображения фантомов на фоне ногтей в разных режимах работы прибора: регистрация флуоресценции красным каналом/ зеленым каналом и обоими высококонтрастными режимами. Для этого поместите 1–2 фантома между кончиками пальцев так, чтобы в кадр установки попадали ногти, кожа и фантомы. Подберите множитель интенсивности флуоресценции так, чтобы прибор подсвечивал флуоресценцию фантомов и не подсвечивал аутофлуоресценцию кожи и ногтей. (Примечание: в случае флуоресцентного лака для ногтей существует вероятность, что флуоресценция лака не будет подавлена).

3. Измерить индексы флуоресценции каждого фантома из ряда для фотосенсибилизаторов (например, РрIX и Се6) и занести в таблицу.

Концентрация, мг/кг	0	0.1	0.25	0.5	1	2	5
ФС1							
ФС2							

4. Согласно полученным результатам, построить графики (на тетрадном листе или в Excel-подобной программе) для обоих фотосенсибилизаторов.

5. Измерить зависимость индекса флуоресценции от расстояния d до фантома для одного из фотосенсибилизаторов.

d , см	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30
Значение FI											

6. Построить зависимость индекса флуоресценции от расстояния до фантома (на тетрадном листе или в Excel-подобной программе) для одного из фотосенсибилизаторов.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 3

Обнаружение различных флуоресцирующих веществ при возбуждении на длинах волн 635 нм и 780 нм.

Измерение индексов флуоресценции

Цель: ознакомиться с практическими аспектами обнаружения фотосенсибилизаторов, возбуждаемых излучением с длинами волны 635 и 780 нм.

Задачи

1. Ознакомиться с применяемым оборудованием.

2. Выполнить работу согласно разделу «Порядок выполнения работы».

Оборудование

1. Универсальный диагностический модуль (УДМ).
2. ПК, с программным обеспечением для работы с УДМ.
3. Жидкостные фантомы фотосенсибилизаторов MB или AlPc или ICG.

Порядок выполнения работы

1. Ознакомьтесь с теорией флуоресцентной диагностики (ФД), устройством и алгоритмом работы экспериментальной установки по описанию из раздела «Основные принципы флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии».

2. Получите флуоресцентные изображения фантомов на фоне ногтей при разных длинах волны возбуждающего излучения: 405/635/750 нм. Опираясь на выданные спектры фотосенсибилизаторов, определить, какой препарат находится в выданных фантомах.

3. Переключая длину волны между 405, 635 и 780 нм, сделать вывод о возможности обнаружения ФС на разных глубинах специального фантома при облучении светом из различных спектральных диапазонов.

4. Измерить индексы флуоресценции какого-либо из рядов фантомов одного типа.

5. Результаты записать в таблицу.

Концентрация, мг/кг	0	0.1	0.25	0.5	1	2	5
Индекс флуоресценции							

6. Согласно полученным результатам построить графики (на тетрадном листе или в Excel-подобной программе) для обоих фотосенсибилизаторов.

ФЛУОРЕСЦИРУЮЩИЕ ФАНТОМЫ (МОДЕЛИ)

Особенности создания флуоресцентных фантомов на примере метиленового синего

Физические (оптические) фантомы (или модели) представляют собой имитацию биологической ткани по оптическим свойствам. При проведении биофизических экспериментов с помощью фантомов можно моделировать распространение света в биологической ткани, в том числе, процессы флуоресценции.

В случае работы с оборудованием для ФД флуоресцентные фантомы зачастую необходимы для проверки чувствительности и калибровки приборов, регистрирующих флуоресценцию.

Оптические фантомы могут быть жидкостными, гелеобразными и твердыми, в зависимости от решаемых задач, а также состоять из различных компонентов, обладающих свойствами рассеяния, поглощения и флуоресценции при взаимодействии с оптическим излучением с определенными длинами волн (интралипиды, молоко, красители, полистироловые микросферы, ФС, желатиновые матрицы и т.д.).

В данном разделе рассматривается пример создания жидкостных фантомов. Для имитации рассеивающих свойств кожи в состав фантома добавляется интралипид с итоговой концентрацией в полученном растворе 1 % (1–2 %). Для получения сигналов флуоресценции в фантом добавляется метиленовый синий в качестве ФС.

Спектры поглощения/флуоресценции метиленового синего представлены на рис. 9.

Для расчета дозировок веществ, входящих в состав фантомов, необходимы следующие формулы:

$$V_{\text{треб}} = \frac{V_{\text{р-ра}} * \rho_{\text{треб}}}{\rho_{\text{исх}}}, \quad (4)$$

где $\rho_{\text{треб}}$ – необходимая массовая концентрация вещества; $\rho_{\text{исх}}$ – исходная массовая концентрация вещества.

Суммарный объем всех компонентов: метиленового синего, интралипида и воды равен:

$$V_{\text{р-ра}} = \sum_i V_{i(\text{треб})}. \quad (5)$$

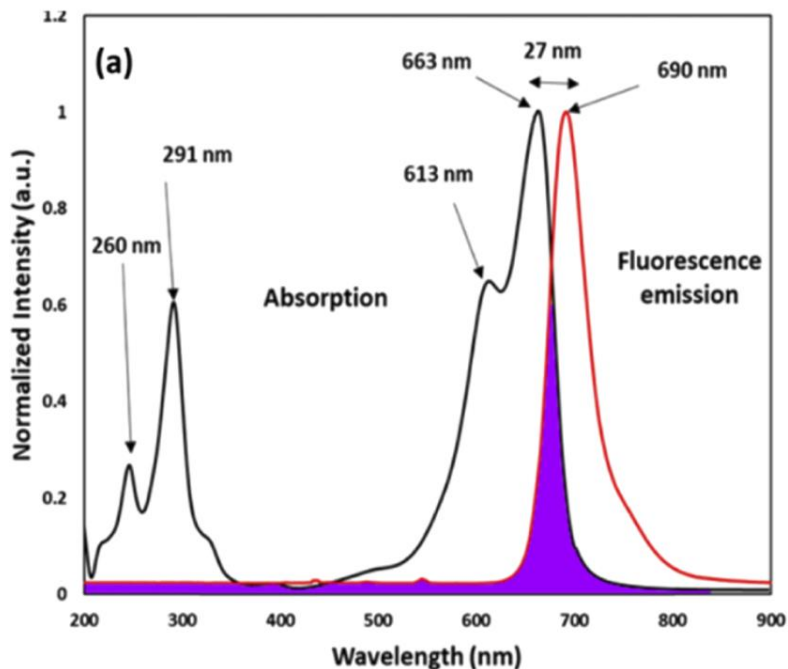


Рис. 9. Спектральная поглощательная способность метиленового синего (МС) в УФ-видимой области и перекрытие нормализованных спектров поглощения-эмиссии при типичной концентрации 50 мкМ [12]

Например, необходимо получить раствор объемом 500 мкл, состоящий из ФС, интралипида и воды: $PS + IL + H_2O = 500$ мкл (может меняться)

В случае, если известно процентное содержание вещества в имеющемся растворе, для расчетов требуемого объема вещества в финальном растворе удобно применить следующую формулу:

$$V_{\text{треб}} = \frac{V_{\text{р-ра}} * \omega_{\text{треб}}}{\omega_{\text{исх}}}, \quad (6)$$

где $\omega_{\text{исх}}$ – массовая доля исходного вещества, $\omega_{\text{треб}}$ – требуемая массовая доля вещества.

Приведем вывод формулы (6).

Составим пропорцию:

$$V_{p-ра} - 1, \quad (7)$$

$$\omega_{исх} * V_{треб} - \omega_{треб}, \quad (8)$$

Отсюда:

$$V_{треб} = \frac{V_{p-ра} * \omega_{треб}}{\omega_{исх}}. \quad (9)$$

Формула (6) выведена.

Разбавление 100 % вещества до x %-го раствора:

$$V_{p-ра} = \frac{V_{вещ-ва} * \omega_{треб, \%}}{100 \%}. \quad (10)$$

При этом объем растворителя

$$V_{раст} = V_{p-ра} - V_{вещ-ва}, \quad (11)$$

где $V_{раст}$ – объем растворителя; $V_{p-ра}$ – объем раствора; $V_{вещ-ва}$ – объем вещества.

Объем растворителя $V_{раст}$ для разбавления вещества в N раз вычисляется по формуле:

$$V_{раст} = V_{вещ-ва} * N - V_{вещ-ва}. \quad (12)$$

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 4

Создание жидкостных флуоресцирующих фантомов и изучение фотообесцвечивания на примере метиленового синего

Цель: научиться изготавливать жидкостные флуоресцирующие фантомы.

Задачи

1. Ознакомиться с применяемым оборудованием.
2. Выполнить работу согласно разделу «Порядок выполнения работы».

Оборудование

1. Пробирки объемом 600 мкл с закрывающимися крышечками.
2. Пробирки объемом 5 мл с закрывающимися крышечками.
3. Дозаторы объемом 0,5–10 мкл, 20–200 мкл, 100–1000 мкл с подходящими носиками.
4. Универсальный диагностический модуль (УДМ).
5. ПК с программным обеспечением для работы с УДМ.

Порядок выполнения работы

1 %-ый препарат метиленовый синий имеет слишком высокую концентрацию для разведения его в биологически адекватных концентрациях в пробирках, поэтому необходимо создать стоковый раствор, который будет добавляться в пробирки. Удобен для применения стоковый раствор с концентрацией 10 мг/л. Для расчета объемов метиленового синего и воды в стоковом растворе примените формулы (11) и (12).

Далее с помощью формулы (4) рассчитайте необходимые объемы стокового раствора для создания фантомов требуемой концентрации метиленового синего.

Рассчитайте необходимый объем 20 %-го интралипида, который необходимо добавить в фантомы, чтобы его содержание составляло 1,4 %.

Выразив объем воды (последнего компонента фантома) из формулы (5), вычислите объем воды, который необходимо добавить к каждому фантому.

Порядок действий:

- 1) ознакомиться с дозаторами;
- 2) создать ряд фантомов с концентрациями 0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,5; 1; 2 мг/л;
- 3) заполните таблицу для разведения итоговых растворов.

[ФС], мг/л	$V_{\text{стока}}$ (10 мг/л), мкл	V_{IL} (1.4%), мкл	$V_{\text{H}_2\text{O}}$, мкл
0			
0.05			
0.1			
0.25			
0.5			
1			
2			
5			

4. Проверить флуоресценцию ряда фантомов на экспериментальной установке, измерить для каждого из фантомов индекс флуоресценции.

5. Провести наблюдение за процессом фотоблисинга (фотообесцвечивание препарата) и убедиться, насколько быстро обесцвечивается метиленовый синий.

6. Измерить индексы флуоресценции какого-либо из рядов фантомов одного типа.

7. Результаты записать в таблицу.

Концентрация, мг/кг	0	0.1	0.25	0.5	1	2	5
Индекс флуоресценции							

8. Согласно полученным результатам, построить графики (на тетрадном листе или в Excel-подобной программе) для обоих фотосенсибилизаторов.

ЭФФЕКТ КАУТСКОГО

Флуоресценция хлорофилла

В зависимости от состояния фотосинтетического аппарата интенсивность флуоресценции хлорофилла *in vivo* может меняться в значительных пределах, что особенно заметно при освещении предварительно адаптированного к темноте листа.

Эффект Каутского (также называемый флуоресценцией переходных процессов, индукцией флуоресценции хлорофилла *a* или затуханием флуоресценции) – явление изменения свечения хлорофилла, которое возникает при освещении предварительно адаптированного к темноте листа растения. Этот феномен был открыт Х. Каутским и А. Хиршем в 1931 году [13].

Когда фотосинтезирующие клетки, которые пробыли в темноте достаточное время для темновой адаптации, выставляют на свет, интенсивность флуоресценции, как правило, претерпевает ряд немонотонных изменений, сопровождаемых индукцией фотосинтетической активности. Интенсивность сигнала флуоресценции сначала резко возрастает, а затем постепенно снижается.

Зависимость интенсивности флуоресценции хлорофилла от времени после начала освещения известна как индукционная кривая или кривая индукции флуоресценции хлорофилла (рис. 10) [13].

Форма этой кривой весьма чувствительна к изменениям, происходящим в фотосинтетическом аппарате при адаптации к различным условиям окружающей среды, что явилось основой широкого использования эффекта Каутского в изучении фотосинтеза.

Каждый квант света, поглощенный молекулой хлорофилла, переводит электроны из основного в возбужденное состояние. В ходе фотосинтеза молекула хлорофилла из возбужденного переходит в основное состояние, а небольшая часть (3–5 % в нормальных условиях) энергии возбуждения рассеивается в виде красной флуоресценции хлорофилла. Флуоресцентное излучение здесь – это альтернативный путь растраты энергии возбужденного электрона, которая в первую очередь идет на фотохимические реакции или рассеивается в виде тепла. Как правило, выход флуоресценции достигает своего пика, когда фотохимия и тепловыделение максимально подавлены. Таким образом, изменения выхода флуоресценции отражают

изменения в фотохимической эффективности и рассеивании тепла [13].

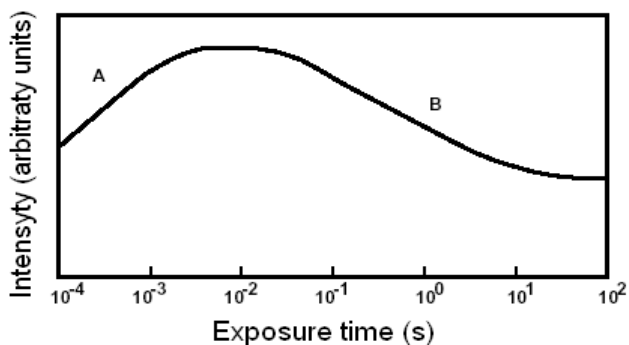


Рис. 10. Изменение характера интенсивности флуоресценции со временем облучения [13]

Когда образец (лист) облучают светом, интенсивность флуоресценции стабильно увеличивается в микро- или миллисекундном диапазоне (рис. 10). Обычно пик приходится на 300–500 мс. Спустя несколько секунд интенсивность снижается и выходит на плато. Начальный подъем флуоресценции обычно объясняют насыщением реакционного центра фотосистемы II (ФСII). Из-за длительной темновой адаптации фотосинтетический аппарат не может справиться с потоком света, и возбужденные электроны специальной пары хлорофиллов П700 вместо того, чтобы транспортироваться на внешние переносчики, возвращаются обратно, избавляясь от энергии возбуждения, которая обычно высвечивается в виде флуоресценции свето собирающих комплексов фотосистемы II. Таким образом, фотохимическое тушение увеличивается с течением времени облучения на начальном периоде облучения вместе с соответствующим увеличением интенсивности флуоресценции. Медленное падение интенсивности флуоресценции на более поздних отрезках времени вызвано, помимо прочих процессов, активацией нефотохимического тушения – защитного механизма фотосинтезирующих организмов, необходимого для снятия вредных эффектов избыточного освещения [13].

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 5

Наблюдение эффекта Каутского

Цель: ознакомиться с эффектом Каутского и пронаблюдать его.

Задачи

1. Ознакомиться с теорией по эффекту Каутского из раздела «Эффект Каутского».
2. Ознакомиться с применяемым оборудованием.
3. Выполнить работу согласно разделу «Порядок выполнения работы».

Оборудование

1. Универсальный диагностический модуль (УДМ).
2. ПК с программным обеспечением для работы с УДМ.
3. Свежесорванный листок дерева (куста) или травинка.

Порядок выполнения работы

Часть свежесорванного листа растения закрыть непрозрачным слоем (материалом) и поместить под фиолетовое излучение экспериментальной установки. Спустя 1–2 минуты убрать слой и пронаблюдать с помощью устройства (камера + фильтры) изменение флуоресценции ранее закрытой части листа.

ЭЛЕКТРОФИЗИОЛОГИЧЕСКИЙ МОНИТОРИНГ ПРИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Электрофизиология – это область медицины и физиологии, которая изучает электрические явления, возникающие в живых организмах. Она охватывает все аспекты биологических процессов, связанные с электрическими потенциалами клеток и тканей, их измерением, а также влиянием электрических сигналов на функционирование органов и систем. Основным интересом в медицине к электрофизиологии связан с пониманием процессов, лежащих в основе работы нервной, мышечной и сердечно-сосудистой системы.

Электрофизиологические методы играют важную роль в оценке функционального состояния тканей и органов. В сочетании с флуоресцентной диагностикой и фотодинамической терапией (ФДТ) они позволяют анализировать влияние лечения на биоэлектрические процессы в организме. Например, электрокардиография (ЭКГ) может использоваться для мониторинга изменений в работе сердца после ФДТ, а электромиография (ЭМГ) – для оценки реакции мышц на терапию [14].

Электрическая активность клеток

Все живые клетки обладают мембранным потенциалом, который возникает из-за неравномерного распределения ионов внутри и снаружи клетки. Мембранный потенциал клетки определяется разницей концентрации ионов (например, калия, натрия, кальция и хлора) через клеточную мембрану. Для поддержания этого потенциала клетки используют активные и пассивные механизмы транспорта ионов.

Рестинговый потенциал – это стабильное состояние мембранного потенциала клетки в покое. Обычно он составляет около -70 мВ в нейронах.

Деполаризация – процесс, при котором мембранный потенциал клетки становится менее отрицательным, что может привести к генерации потенциала действия (например, в нейронах).

Гиперполяризация – увеличение отрицательности мембранного потенциала клетки, что препятствует возбуждению клетки.

Потенциал действия

Потенциал действия – это быстрые, краткосрочные изменения мембранного потенциала, которые распространяются по клетке или ткани. Он является основой передачи нервных импульсов и сокращения мышц. Потенциал действия генерируется, когда мембрана клетки достигает определенного порога деполяризации, что открывает натриевые каналы и вызывает поток натрия внутрь клетки. После этого калиевые каналы открываются, и калий выходит из клетки, восстанавливая первоначальный мембранный потенциал.

Фазы потенциала действия:

подготовительная фаза (покоя) – мембранный потенциал клетки стабилен;

деполяризация – открытие натриевых каналов, быстрый вход натрия в клетку;

реполяризация – выход калия из клетки через калиевые каналы;

гиперполяризация – мембранный потенциал становится более отрицательным, чем в покое.

Электрическая активность нервной ткани

Нервная ткань играет ключевую роль в передаче электрических сигналов между различными частями тела. Нейроны используют потенциал действия для передачи сигналов на дальние расстояния. Эти сигналы могут быть как возбуждающими (деполяризация), так и тормозящими (гиперполяризация).

Синапс – это структура, через которую происходит передача нервных импульсов между нейронами или между нейроном и мышцей. В синапсе электрический сигнал передается через нейромедиаторы, которые высвобождаются в синаптическую щель и связываются с рецепторами на мембране следующей клетки.

Электрическая активность сердечной мышцы

Сердечная мышца имеет уникальные свойства, обеспечивающие ее работу. Синусовый узел, расположенный в правом предсердии, генерирует электрические импульсы, которые передаются по всей сердечной ткани. Эти импульсы регулируют сокращения сердца,

обеспечивая его ритмичную работу. Электрические сигналы сердца можно зарегистрировать с помощью ЭКГ (электрокардиограммы).

Этапы сердечного сокращения:

Синусовый узел генерирует импульсы, которые вызывают деполяризацию предсердий.

Атриовентрикулярный узел пропускает сигнал к желудочкам.

Пучок Гиса и его разветвления передают сигнал на мышцу желудочков, вызывая их сокращение.

Электрические сигналы в мышцах

Мышечные клетки (миоциты) также обладают электрической активностью. Во время сокращения мышцы деполяризация клеточной мембраны приводит к активации мышечных волокон, что позволяет им сокращаться.

Скелетные мышцы: их сокращение зависит от стимуляции мотонейронами. Электрический сигнал передается от нейрона к мышце, вызывая ее сокращение.

Сердечные мышцы: электрическая активность играет ключевую роль в их ритмичном сокращении.

Гладкие мышцы: имеют более сложную электрическую активность, регулируемую гормонами и нейропептидами.

Методы измерения электрической активности

В практике медицины используются различные методы для изучения электрической активности клеток и тканей:

Электрокардиография (ЭКГ) – измерение электрической активности сердца.

Электроэнцефалография (ЭЭГ) – запись электрической активности мозга.

Электромиография (ЭМГ) – регистрация электрической активности мышц.

ФДТ может вызывать локальные изменения в тканях за счет фотохимических реакций, приводящих к образованию активных форм кислорода. Это может влиять на биоэлектрическую активность клеток, что делает электрофизиологический мониторинг важным инструментом для оценки безопасности и эффективности лечения.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 6

Исследование биоэлектрических сигналов при флуоресцентной диагностике и ФДТ с использованием системы ВІОРАС

Цель: изучить электрическую активность скелетных мышц и сердца до и после ФДТ, зарегистрировать ЭМГ и ЭКГ сигналы, а также проанализировать их характеристики с использованием системы ВІОРАС Student Lab [15].

Задачи

1. Ознакомиться с теорией по электрофизиологическим методам.
2. Ознакомиться с применяемым оборудованием ВІОРАС Student Lab.
3. Выполнить работу согласно разделу «Порядок выполнения работы».

Оборудование и материалы

1. Система ВІОРАС Student Lab (модуль МР36/МР36А).
2. Программное обеспечение ВІОРАС Student Lab.
3. Электроды одноразовые Ag/AgCl.
4. Кабели для подключения электродов.
5. Абразивная паста или спиртовые салфетки для подготовки кожи.
6. Лазерная установка или источник флуоресцентного возбуждения.
7. Фотосенсибилизатор (например, хлорин-е6).

Порядок выполнения работы

1. Настройка оборудования:
 - 1) Подключите аппаратный модуль ВІОРАС МР36 к компьютеру.
 - 2) Убедитесь, что программное обеспечение ВІОРАС Student Lab установлено и работает корректно.
2. Подготовка испытуемого:
 - 1) Очистите участки кожи, где будут размещены электроды.
 - 2) Разместите электроды согласно стандартным схемам для регистрации ЭМГ и ЭКГ.

Часть I: Исходная регистрация ЭМГ и ЭКГ

3. Размещение электродов:

1) разместите ЭКГ-электроды на запястьях и лодыжке для стандартного отведения;

2) для ЭМГ закрепите два активных электрода на целевой мышце и один референсный на костной области.

4. Запись сигналов:

1) запустите ВЮРАС и выберите соответствующий протокол;

2) запишите исходные ЭМГ и ЭКГ в состоянии покоя и при легкой физической нагрузке.

Часть II: Воздействие флуоресцентной диагностики и ФДТ

5. Обработка области флуоресцентным красителем:

1) нанесите фотосенсибилизатор на целевую область (например, кожу предплечья);

2) ожидайте время накопления препарата (30-60 мин).

6. Воздействие возбуждающим светом:

1) используйте источник света для активации фотосенсибилизатора;

2) контролируйте параметры воздействия (интенсивность, длительность).

Часть III: Регистрация изменений после ФДТ

7. Повторная запись ЭКГ и ЭМГ:

1) запишите сигналы сразу после воздействия и через 30 минут после процедуры;

2) оцените изменения в амплитуде, частоте и морфологии сигналов.

8. Анализ данных:

1) согласно полученным результатам, построить графики (на тетрадном листе или в Excel-подобной программе), отражающие показатели до и после ФДТ;

2) сравните ЭМГ до и после процедуры, оцените возможное влияние ФДТ на возбудимость мышечной ткани;

3) анализируйте ЭКГ на предмет изменений в частоте сердечных сокращений и возможных отклонений.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ

Флуоресцентная микроскопия представляет собой ключевой метод высокоразрешающей визуализации биологических объектов, основанный на детекции флуоресцентного излучения молекул-меток. Этот подход обеспечивает селективное выявление биомолекул и субклеточных компартментов, позволяя анализировать динамические процессы в живых и фиксированных клетках [16].

Принцип работы флуоресцентных микроскопов основан на использовании возбуждающего источника света (лазеров или газоразрядных ламп), оптических фильтров и чувствительных детекторов (ПЗС-матриц или фотомножителей). Конфокальная и мультифотонная микроскопия позволяют получать изображения с высокой оптической секционирующей способностью, минимизируя фоновую флуоресценцию и увеличивая контраст [17].

Ключевые аспекты метода

1. Высокая чувствительность благодаря использованию специфических флуоресцентных зондов.
2. Возможность одновременного визуального анализа нескольких мишеней благодаря мультиспектральной регистрации.
3. Применение фотостабильных флуорофоров позволяет проводить длительные кинетические исследования.
4. Конфокальная и суперразрешающая микроскопия обеспечивают исследование ультраструктуры клеток с разрешением ниже дифракционного предела.

Типы флуоресцентных микроскопов

1. Эпифлуоресцентный микроскоп – базовый метод, использующий мощные источники света и фильтры для селективного выделения сигналов.
2. Конфокальный лазерный микроскоп – позволяет проводить оптическую секционирующую визуализацию за счет пространственного фильтра Пинхоула.
3. Мультифотонная микроскопия – снижает фототоксичность и увеличивает глубину проникновения излучения в биологические ткани.
4. Суперразрешающая микроскопия – включает методы STED, PALM и STORM, обеспечивая визуализацию объектов с разрешением порядка 20–50 нм [18, 19].

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 7

Исследование клеточных структур методом флуоресцентной микроскопии

Цель: овладение методологией подготовки биологических образцов для флуоресцентной микроскопии и анализ пространственного распределения флуоресцентно меченых молекул.

Задачи

1. Ознакомиться с теорией по принципам работы флуоресцентных микроскопов из соответствующего раздела данного пособия.
2. Ознакомиться с применяемым оборудованием.
3. Выполнить задание согласно разделу «Порядок выполнения работы».

Оборудование и материалы

1. Лазерный конфокальный микроскоп;
2. Флуорофор (DAPI, FITC);
3. Культивированные клетки (HeLa);
4. Фиксаторы (4 % параформальдегид);
5. Буферные растворы (PBS, Triton X-100);
6. Покровные и предметные стекла

Порядок выполнения работы

1. Фиксация клеток:

- 1) промыть клетки PBS для удаления культуральной среды;
- 2) добавить 4 % параформальдегид, инкубировать 10–15 мин;
- 3) промыть клетки PBS для удаления избытка фиксатора.

2. Пермеабиллизация и иммуномаркирование:

- 1) инкубировать клетки в 0,1 % Triton X-100 (5–10 минут) для повышения проницаемости мембран;
- 2) добавить первичные антитела против α -тубулина и инкубировать 1 час;
- 3) промыть PBS, добавить вторичные флуоресцентно-меченые антитела FITC и инкубировать 30 минут в темноте;
- 4) промыть и накрыть покровным стеклом.

3. Запись изображения:

- 1) оптимизировать параметры микроскопа;

- DAPI: возбуждение 358 нм, эмиссия 461 нм;
 - FITC: возбуждение 488 нм, эмиссия 520 нм;
 - установить лазерную мощность, детекцию сигнала и экспозицию,
- 2) для визуализации образцов
- определить плоскость фокусировки, используя режим Live View;
 - захватить изображения в соответствующих спектральных каналах;
 - применить алгоритмы подавления фонового сигнала и увеличения контраста;
- 3) для количественного анализа
- использовать программное обеспечение (например, ImageJ, Imaris) для измерения интенсивности флуоресценции;
 - сравнить пространственное распределение мишеней между образцами.

УЛЬТРАЗВУКОВАЯ АППАРАТУРА В ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Современные методы фотодинамической терапии (ФДТ) требуют интеграции с передовыми технологиями медицинской визуализации, среди которых ультразвуковая диагностика (УЗД) занимает ключевую позицию. УЗД предоставляет возможность неинвазивного мониторинга изменений в биологических тканях под воздействием фотосенсибилизаторов и лазерного излучения, позволяя детализировать динамику фотохимических процессов в реальном времени.

Физическая основа метода заключается в распространении ультразвуковых волн через биологические среды, где различия в акустическом импедансе тканей обуславливают частичное отражение и рассеяние сигнала. Регистрация этих отраженных сигналов с последующей обработкой позволяет реконструировать анатомические и функциональные характеристики исследуемых структур.

Важным фактором эффективности работы ультразвукового оборудования является правильно подобранные ультразвуковые датчики.

Перечислим несколько типов ультразвуковых датчиков и область их применения.

1. Линейные датчики (10–15 МГц) – используются для исследования поверхностных тканей, обеспечивают высокое разрешение и детекцию сосудистых изменений.

2. Конвексные датчики (3–8 МГц) – применяются для глубинной визуализации, позволяют оценивать объемные опухолевые образования.

3. Допплеровские датчики – необходимы для изучения кровотока и сосудистых изменений в зоне ФДТ.

4. Эластографические датчики – применяются для оценки механических свойств тканей, выявления зон некроза и изменений жесткости после ФДТ.

В контексте ФДТ ультразвуковая аппаратура используется для:

1) определения локального распределения фотосенсибилизаторов с применением контрастных агентов на основе микропузырьков;

2) анализа динамики васкуляризации опухолевых тканей с использованием доплерографии, позволяя выявлять сосудистые изменения после ФДТ;

3) контроля структурных изменений ткани посредством эластографии, оценивая степень повреждения и ремоделирования после терапевтического воздействия.

Изменяемые параметры и анализ данных:

1) эхогенность тканей – изменения яркости изображения, указывающие на структурные модификации после ФДТ;

2) скорость и направление кровотока – доплерографическое измерение позволяет определить степень васкулярных изменений;

3) коэффициент жесткости тканей – получаемый с помощью эластографии, отражает деструктивные процессы в опухоли;

4) контрастное усиление – анализ времени накопления и выведения контрастных агентов для оценки сосудистой проницаемости.

Дополнительное использование контрастных ультразвуковых агентов, таких как липидные микропузырьки или перфторуглероды, позволяет повысить чувствительность метода при визуализации васкуляризированных опухолей и контроле фотосенсибилизаторов в микроциркуляторном русле.

ЛАБОРАТОРНАЯ РАБОТА № 8

Ультразвуковая диагностика структурных и сосудистых изменений при ФДТ

Цель: овладение методами ультразвуковой визуализации для оценки морфологических и функциональных изменений тканей под воздействием ФДТ.

Задачи

1. Ознакомиться с принципами работы ультразвуковой диагностики.

2. Ознакомиться с применяемым оборудованием.

3. Выполнить задание согласно разделу «Порядок выполнения работы».

Оборудование и материалы

1. Ультразвуковой аппарат с поддержкой В-режима, доплерографии и эластографии (GE Vivid).

2. Высокочастотные линейные и конвексные датчики (3–15 МГц).
3. Фотосенсибилизатор (хлорин-еб, фотодитазин).
4. Лазерный источник возбуждения (635 нм).
5. Биологические модели (тканевые фантомы или опухолевые культуры).
6. Контрастные агенты для УЗИ (микропузырьки, перфторуглероды).

Порядок выполнения работы

1. Предварительное сканирование образцов:
 - 1) провести исходное ультразвуковое исследование тканей в В-режиме, зафиксировать параметры эхогенности;
 - 2) выполнить доплерографию сосудистого русла для оценки кровотока;
 - 3) провести эластографию для оценки жесткости тканей.
 2. Фотосенсибилизация и фотодинамическое воздействие:
 - 1) нанести фотосенсибилизатор на модельную систему и выдержать время накопления (30–60 мин);
 - 2) провести ФДТ с применением лазера (635 нм), контролируя параметры мощности и экспозиции;
 - 3) провести ультразвуковую регистрацию изменений.
- До ФДТ:
- 1) записать ультразвуковые изображения в В-режиме;
 - 2) выполнить доплерографию для оценки кровотока в исследуемой зоне;
 - 3) провести эластографию для определения исходной жесткости тканей.
- После ФДТ:
- 1) повторно провести сканирование и сравнить изменения эхогенности тканей;
 - 2) оценить вариации кровоснабжения по данным цветовой и энергетической доплерографии;
 - 3) проанализировать изменения механических свойств тканей методом эластографии.

Тестовые вопросы для контроля знаний

1. Определите, что такое тераностика:
 - а) лечение опухолевых заболеваний;
 - б) диагностика различных заболеваний;
 - в) лечение и диагностика заболеваний в рамках одной процедуры.

2. Назовите, какие медицинские манипуляции позволяет совершить фотосенсибилизатор под воздействием излучения с определенными длинами волн:
 - а) флуоресцентная диагностика;
 - б) магниторезонансная томография;
 - в) фотодинамическая терапия;
 - г) ультразвуковое исследование;
 - д) резекция под флуоресцентным контролем.

3. К основным составляющим фотодинамической терапии относятся:
 - а) свет;
 - б) вода;
 - в) кислород;
 - г) фотосенсибилизатор;
 - д) катализатор;
 - е) углерод.

4. Назовите, какой из препаратов не является фотосенсибилизатором сам по себе:
 - а) фталоцианин алюминия;
 - б) 5-аминолевулиновая кислота;
 - в) хлорин-еб;
 - г) фталоцианин цинка;
 - д) метиленовый синий.

5. Укажите, какая форма кислорода является активной:
 - а) триплетный;
 - б) синглетный.

6. Назовите преимущества возбуждения флуоресценции Себ и РrIX фиолетовым светом:

- а) более глубокое проникновение в ткани, чем при возбуждении красным светом;
- б) высокий квантовый выход;
- в) возможность возбудить флуоресценцию как фотосенсибилизатора, так и эндогенных флуорофоров;
- г) низкий квантовый выход;
- д) низкая эффективность возбуждения эндогенных флуорофоров.

7. Назовите преимущества возбуждения флуоресценции Себ и РrIX красным светом:

- а) высокий квантовый выход;
- б) низкий квантовый выход;
- в) более глубокое проникновение в ткани, чем при возбуждении фиолетовым светом;
- г) низкая глубина проникновения;
- д) низкая эффективность возбуждения эндогенных флуорофоров.

8. Определите времяразрешенный метод подавления фонового сигнала:

- а) захват двух кадров (с флуоресценцией и без нее), вычитание фонового кадра из кадра с флуоресценцией, попиксельное суммирование кадра-разности с зеленым каналом фонового кадра;
- б) захват двух кадров (с флуоресценцией и без нее), вычитание кадра с флуоресценцией из фонового кадра;
- в) захват двух кадров (с флуоресценцией и без нее), попиксельное деление фонового кадра на кадр с флуоресценцией;
- г) захват двух кадров (с флуоресценцией и без нее), попиксельное деление кадра с флуоресценцией на фоновый кадр.

9. Определите, как работает метод повышения контраста флуоресцентных изображений R/G :

- а) красный канал кадра-разности попиксельно делится на зеленый канал;
- б) кадр с возбуждением красным светодиодом попиксельно делится на кадр с возбуждением зеленым светодиодом.

10. Определите, как работает метод повышения контраста флуоресцентных изображений $R-G$:

а) зеленый канал кадра-разности попиксельно вычитается из красного;

б) из кадра с возбуждением красным светодиодом попиксельно вычитается кадр с возбуждением зеленым светодиодом.

11. Укажите способ количественной оценки накопления фотосенсибилизатора применяется в экспериментальной установке:

а) внутри области центрального прицела – сумма яркостей пикселей фонового кадра вычитается из суммы яркостей пикселей кадра с флуоресценцией. Разность делится на сумму яркостей пикселей кадра-фона;

б) по всему кадру – сумма яркостей пикселей фонового кадра вычитается из суммы яркостей пикселей кадра с флуоресценцией. Разность делится на сумму яркостей пикселей кадра-фона;

в) вычисляется сумма яркостей пикселей кадра-разности;

г) вычисляется сумма пикселей кадра-разности внутри центрального прицела.

12. Назовите цель, с которой в экспериментальной установке флуоресценция подсвечивается на дисплее зеленым цветом:

а) потому что зеленый цвет легче воспринимается глазом;

б) чтобы не спутать с другими цветами веществ в организме;

в) из-за полос пропускания примененных фильтров.

13. Выберите флуорофор, который возбуждается светом с длиной волны 780 нм:

а) индоцианин зеленый;

б) хлорин-еб;

в) протопорфирин-9;

г) метиленовый синий;

д) фталоцианин цинка.

14. Назовите фотосенсибилизаторы, которые возбуждаются светом с длиной волны 405 нм:

а) фталоцианин цинка;

б) фталоцианин алюминия;

- в) хлорин-еб;
- г) протопорфирин-9;
- д) метиленовый синий.

15. Назовите фотосенсибилизаторы, которые возбуждаются светом с длиной волны 635 нм:

- а) фталоцианин алюминия;
- б) фталоцианин цинка;
- в) хлорин-еб;
- г) протопорфирин-9;
- д) метиленовый синий.

16. В жидкостные фантомы добавляют интралипид, чтобы:

- а) имитировать поглощение фотонов в коже;
- б) имитировать рассеяние фотонов в коже;
- в) усилить флуоресценцию;
- г) ослабить флуоресценцию;
- д) изменить коэффициент преломления.

17. Буква «М» в обозначении концентрации 50 мкМ – это:

- а) моль/см³;
- б) мг/кг;
- в) мг/л;
- г) моль/л.

18. Формула для требуемого объема растворителя для разведения известного объема вещества в N имеет вид:

$$а) V_{р-ра} = \frac{\omega_{\text{треб, \%}}}{V_{в-ва} * 100 \%};$$

$$б) V_{р-ра} = \frac{V_{в-ва} * \omega_{\text{треб, \%}}}{100 \%};$$

$$в) V_{\text{раст}} = \frac{V_{в-ва}}{N} * V_{в-ва};$$

$$г) V_{\text{раст}} = V_{в-ва} * N - V_{в-ва}.$$

19. Формула для объема вещества, необходимого для получения требуемой массовой концентрации вещества при известной массовой концентрации стокового раствора имеет вид:

$$\text{а) } V_i = \frac{V_{\text{р-ра}} * \rho_i}{\rho_{\text{треб}}};$$

$$\text{б) } V_i = \frac{\rho_i}{V_{\text{р-ра}} * \rho_{\text{треб}}};$$

$$\text{в) } V_i = \frac{V_{\text{р-ра}} * \rho_{\text{треб}}}{\rho_i}.$$

20. Формула для объема вещества, необходимого для получения требуемой массовой концентрации вещества при известной массовой концентрации и массовой доле вещества в исходном растворе имеет вид:

$$\text{а) } V_i = \frac{V_{\text{р-ра}} * \omega_i, \%}{\rho_{\text{треб}, \%}};$$

$$\text{б) } V_i = \frac{V_{\text{р-ра}} * \rho_{\text{треб}, \%}}{\omega_i, \%};$$

$$\text{в) } V_i = \frac{V_{\text{р-ра}}}{\rho_{\text{треб}, \%} * \omega_i, \%}.$$

21. Определите, флуоресценцию какого вещества описывает эффект Каутского:

- а) хлорофилла;
- б) протопорфирина;
- в) хлорина;
- г) копропорфирина.

22. Выберите, какой из перечисленных цветов НЕ поглощает хлорофилл:

- а) фиолетовый;
- б) зеленый;
- в) красный.

23. Значение времени, которое обычно уходит на достижение максимума флуоресценции хлорофилла:

- а) 300–500 фс;
- б) 300–500 пс;
- в) 300–500 нс;
- г) 300–500 мкс;
- д) 300–500 мс.

24. Определите, для чего фотосинтезирующим организмам нефотохимическое тушение флуоресценции:

- а) для снятия вредных эффектов избыточного освещения;
- б) для улучшения теплообмена;
- в) для снижения заметности для вредителей.

25. Укажите, возможен ли эффект Каутского на высушенных листьях:

- а) да;
- б) нет;
- в) только при резком затемнении;
- г) только при резком освещении.

26. Принцип работы ультразвукового исследования (УЗИ) основан на:

- а) использовании рентгеновского излучения для создания изображения;
- б) принципе взаимодействия магнитных полей с тканями;
- в) использовании высокочастотных звуковых волн для отображения структур внутренних органов;
- г) регистрации электрических сигналов, возникающих в тканях.

27. Выберите метод, который используется для наблюдения за распределением молекул, содержащих флуоресцентные группы, в клетках или тканях:

- а) световая микроскопия;
- б) электронная микроскопия;
- в) флуоресцентная микроскопия;
- г) магнитно-резонансная томография (МРТ).

28. Назовите метод, который используется для записи электрической активности клеток и тканей, таких как нейроны или мышцы:

- а) рентгеновская томография;
- б) электрокардиография (ЭКГ);
- в) оптомеханическая диагностика;
- г) ультразвуковая томография.

29. Дайте определение принципа флуоресцентной микроскопии:

- а) использование лазерного излучения для нагрева образца;
- б) применение флуоресцентных меток, которые возбуждаются светом и излучают свет другого цвета;
- в) применение магнитных полей для создания изображения;
- г) использование инфракрасного излучения для наблюдения за живыми клетками.

30. Принцип, который лежит в основе работы электрофизиологических методов, таких как ЭЭГ или ЭКГ:

- а) применение низкочастотных магнитных волн для анализа ткани;
- б) регистрация электрических сигналов, возникающих в клетках при их возбуждении;
- в) применение ультразвуковых волн для создания изображения;
- г) анализ распределения электрических зарядов в тканях с помощью микроскопа.

Список литературы

1. Ochsner M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours // *J Photochem Photobiol B* 1997; 39:1–18. [10.1016/S1011-1344\(96\)07428-3](https://doi.org/10.1016/S1011-1344(96)07428-3).
2. Luksiene Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment // *Medicina (Kaunas)* 2003; 39:1137–50.
3. Abrahamse H., Hamblin M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy // *Biochem J*. 2016 Feb 15;473(4):347–64. DOI: 10.1042/BJ20150942.
4. Kashef N., Y-Y. Huang and M.R. Hamblin. «Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale» // *Nanophotonics*. Vol. 6. No. 5, 2017. Pp. 853–879. <https://doi.org/10.1515/nanoph-2016-0189>.
5. Wagnieres G.A., W.M. Star, Wilson B.C. In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for Oncological Applications // *Photochemistry and Photobiology* 1998; 68:603–32. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1998.tb02521.x>.
6. Karges J. Clinical Development of Metal Complexes as Photosensitizers for Photodynamic Therapy of Cancer // *Angew Chem Int Ed* 2022; 61:e202112236. <https://doi.org/10.1002/anie.202112236>.
7. Blanco K.C., Moriyama L.T., Inada N.M., Sálvio A.G., Menezes P.F.C., Leite E.J.S. et al. Fluorescence guided PDT for optimization of the outcome of skin cancer treatment // *Front Phys* 2015; 3. <https://doi.org/10.3389/fphy.2015.00030>.
8. Minamikawa T., Matsuo H., Kato Y., Harada Y., Otsuji E., Yanagisawa A. et al. Simplified and optimized multispectral imaging for 5-ALA-based fluorescence diagnosis of malignant lesions // *Sci Rep* 2016;6:25530. <https://doi.org/10.1038/srep25530>.
9. Blackfly S BFS-U3-16S2C-BD Spectral Response Curve. Available online: <http://Softwareservices.Flir.Com/BFS-U3-16S2-BD2/Latest/EMVA/EMVA.Html>.
10. Efendiev K.T., Alekseeva P.M., Shiryaev A.A., Skobeltsin A.S., Solonina I.L., Fatyanova A.S. et al. Pre liminary low-dose photodynamic exposure to skin cancer with chlorin e6 photosensitizer // *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2022;38:102894. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102894>.
11. Wagnieres G.A., Star W.M., Wilson B.C. In Vivo Fluorescence Spectroscopy and Imaging for Oncological Applications // *Photochemistry and Photobiology* 1998;68:603–32. <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1998.tb02521.x>.
12. Pahang F., Parvin P., Ghafoori-Fard H., Bavali A., Moafi A. Fluorescence properties of methylene blue molecules coupled with metal oxide nanoparticles // *OSA Continuum* 2020;3:688. <https://doi.org/10.1364/OSAC.387577>.
13. https://ru.wikipedia.org/wiki/Эффе́кт_Кау́тского.

14. Заварзина Н.Ю. Основы электрофизиологии: учебное пособие 2021. – 72 с. – ISBN 978-5-907443-05-1.

15. <https://biopac.ru/>

16. Saifitdinova Alsu. (2014). Двумерная флуоресцентная микроскопия для анализа биологических образцов. Учебно-методическое пособие. 2014, ISBN: 978-5-4386-0577-5.

17. Колосов М.С. Основы применения широкопольной и лазерной сканирующей микроскопии в биомедицинских исследованиях: учебное пособие / Ростов-на-Дону. Южный федеральный университет, 2013. – 47 с.

18. Ведяйкин, А & Ходорковский, М & Vishnyakov, Innokentii. (2019). Методы флуоресцентной микроскопии сверхвысокого разрешения и их использование для визуализации различных клеточных структур. Tsitologiya. 61. 343-356. 10.1134/S0041377119050067.

19. Балалаева И.В., Сергеева Е.А., Катичев А.Р. Оптическая микроскопия в исследовании структуры и функций биологических объектов. Часть 1. Широкопольная оптическая микроскопия: Учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород: Нижегородский госуниверситет, 2012. – 58 с.

Ответы на тестовые вопросы

- | | |
|------------------------|--------|
| 1. в) | 16. б) |
| 2. а), в), д) | 17. г) |
| 3. а), в), г) | 18. г) |
| 4. б) | 19. в) |
| 5. б) | 20. б) |
| 6. а), б), в) | 21. а) |
| 7. в), д) | 22. б) |
| 8. а) | 23. д) |
| 9. а) | 24. а) |
| 10. а) | 25. б) |
| 11. а) | 26. в) |
| 12. б) | 27. в) |
| 13. а) | 28. б) |
| 14. в), г) | 29. б) |
| 15. а), б), в), г), д) | 30. б) |

