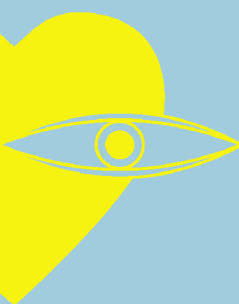




## ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ИЗОБРАЖЕНИЙ ПРИ ВОЗБУЖДЕНИИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ С ПОМОЩЬЮ СВЕРХБЫСТРОДЕЙСТВУЮЩИХ ЛАЗЕРОВ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ



**С**верхбыстродействующие (СБД) лазерные технологии широко применяются для визуализации изображений, возникающих при возбуждении флуоресценции (FLIM) с помощью СБД-лазеров при биологических исследованиях, изучении лекарственных препаратов, а также при диагностике в клинической медицине.

Разработка сверхбыстродействующих (СБД) лазеров побудила многих физиков к постановке и проведению серии элегантных исследовательских экспериментов и к разработке новых инструментов для фундаментальных научных исследований. До недавнего времени, однако, фактическое применение СБД-лазеров было не столь очевидно, частично из-за стоимости и сложности этой технологии, частично из-за ограниченного спроса со стороны хорошо оснащенных физических и спектроскопических лабораторий. Основная задача представленной нами работы – сделать СБД-лазеры более востребованными, в частности для биомедицинских приложений, расширив их применение в целом, а такие лазерные технологии более дешевыми.

### ОСНОВЫ ТЕХНОЛОГИИ СБД-ЛАЗЕРОВ

В первую очередь мы старались расширить спектральные возможности и пропагандировать фемтосекундные СБД-лазеры на красителях [1] и твердотельные лазеры [2], в том числе и первые фемтосекундные Ti:сапфировые лазеры [3] и первые непрерывные Cr:YAG-лазеры с синхронизацией мод [4]. Пытаясь решить проблемы стоимости и сложности, мы разработали первый фемтосекундный Cr:LiSAF-лазер с диодной накачкой [5].

Благодаря прогрессу в области СБД-лазеров с GaN-диодами и волоконных лазеров, вышедших вперед и потеснивших в ряде приложений твердотельные лазеры с синхронизацией мод, новые робастные и дешевые СБД-инструменты стано-

вятся практически доступными для использования за пределами специальных лабораторий.

На сегодня одним из наиболее успешных приложений СБД-лазеров в области биомедицинских исследований является многофотонная микроскопия [6], которая включает использование интенсивных ИК-импульсов для возбуждения тех участков ткани, которые обычно требуют применения источников видимого спектра. Уменьшенное поглощение и рассеяние, имеющее место при использовании длинных ИК-волн в биологических тканях, позволяет получать изображения участков, скрытых под толстым слоем ткани, что делает такие возможности особенно востребованными в нейрохирургии и диагностике. Многофотонная микроскопия часто удобно реализуется с помощью широко перестраиваемых Ti:сапфировых СБД-лазеров, способных возбуждать флуоресценцию на многих длинах волн, а также обеспечивающих возможность получать изображение с временным разрешением.

Относительно просто получить *изображение при наличии флуоресценции* (FLIM – fluorescence lifetime imaging) на многофотонном микроскопе, используя коммерчески доступную технологию *коррелированного во времени подсчета одиночных фотонов* (TCSPC – time-correlated single photon counting). Приведенные факты говорят о том, что многофотонные микроскопы – это те инструменты, которые нужны не только для визуализации глубоко скрытых изображений, но и для широкого круга приложений в молекулярной биологии.

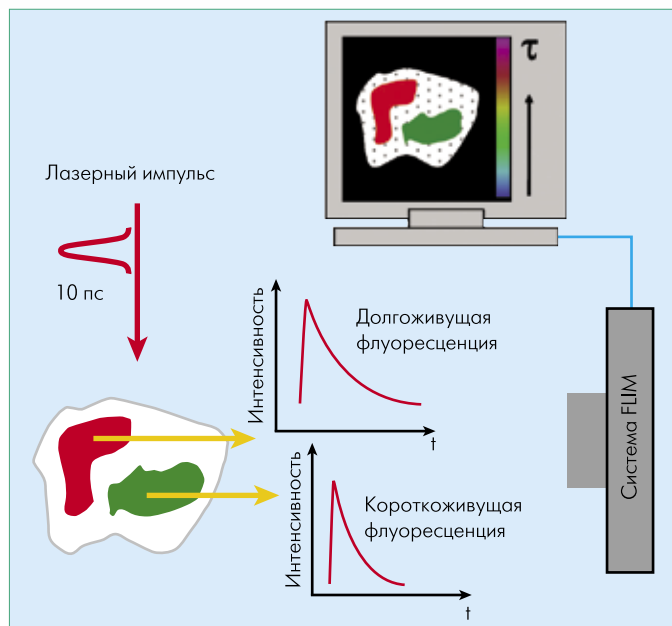


Рис.1 Контраст изображений при использовании FLIM

Существует большой интерес в развитии технологии FLIM, используя как однофотонное, так и многофотонное возбуждение для молекулярной биологии, получения изображений при клинической диагностике и при исследовании лекарств. Все более широко используются достижения технологии СБД-лазеров для создания более практичных инструментов для FLIM и других приложений, требующих получения флуоресцентных изображений.

### ОСНОВЫ РЕАЛИЗАЦИИ FLIM

Получение изображения при наличии флуоресценции (FLIM), часто неинвазивное, – результат расширения флуоресцентной микроскопии, который дает новые возможности для увеличения оптического контраста различных видов молекул или различных молекулярных сред. Флуоресценция широко используется для создания молекулярного контраста на фоне изображения определенных молекул или протеина в клетке биологической ткани. Обычно такие "молекулярные объекты" помечаются специальными флуорофорными молекулами, которые излучают свет определенной длины волны при их возбуждении. Для визуализации более одного вида молекул часто используются различные флуорофорные метки, излучающие свет различной длины волны, для того чтобы пометить различные типы молекул. На практике, однако, эмиссионные спектры многих флуорофорных молекул достаточно близки, что затрудняет спектральное различение больше двух-трех меток.

FLIM дает возможность различать отдельные флуорофоры на интервале, соответствующем времени жизни флуоресценции. Оно сопоставимо со средним временем, в течение которого молекула остается в возбужденном состоянии после поглощения фотона. Эта временная характеристика

может быть измерена путем возбуждения образца ультракоротким импульсом и наблюдения за тем, сколько времени будет затухать флуоресцентный сигнал. Это время затухания (или время жизни) во флуоресцентных системах визуализации изображения становится еще одной размерностью (для изображаемого участка или набора данных), которая и обеспечивает контраст, как показано на рис.1. Сегодня сложность требуемого инструментального обеспечения существенно ограничивает понимание роли FLIM, но растущая доступность СБД-лазеров и детекторов, наряду с коммерчески доступными FLIM-инструментами, способствует быстрому распространению этой технологии.

### ВЫСОКОСКОРОСТНОЙ FLIM С ЗАТВОРОМ

В нашей лаборатории было сконцентрировано внимание на технологии FLIM с широким полем зрения и управляемым стробированием [7], использующей СБД-систему изображения с модулированным оптическим усилителем изображения, разработанным компанией Kentech Instruments. Особенность системы в том, что она снабжалась камерой с СБД-фото-затвором (<100 пс), закрытие и открытие которого можно осуществлять с различной задержкой по отношению к тому моменту, когда конкретный образец был возбужден ультракоротким импульсом. Путем получения серии флуоресцентных изображений с различными задержками после возбуждения, можно получить профиль затухания флуоресценции для каждого пикселя в поле зрения и вычертить его, используя шкалу в ложном свете, для создания карты времени жизни флуоресценции, как показано на рис.2.

### АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ: FLIM БЕЗ МЕТОК

FLIM-автофлуоресценция тканей создает внутренний контраст с флуоресцентными изображениями, полученными при действии естественно возникающих (эндогенных) флуорофоров в биологических тканях [8]. На рис.3 показаны изображения участка ткани (взятой из уха крысы, которая проходила лечение с помощью обычной химической терапии) при

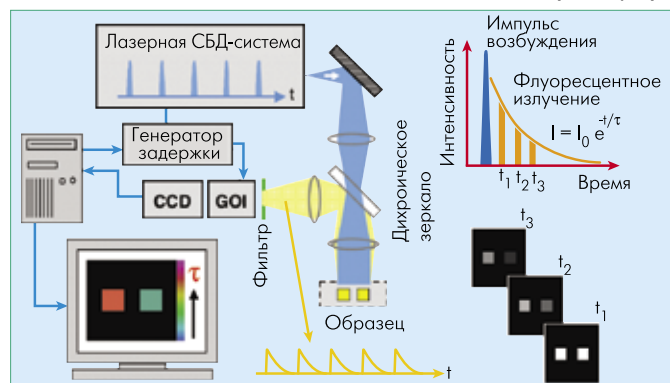
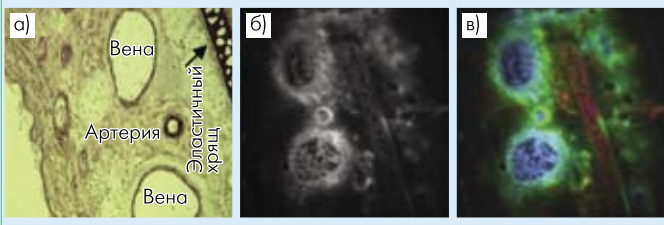


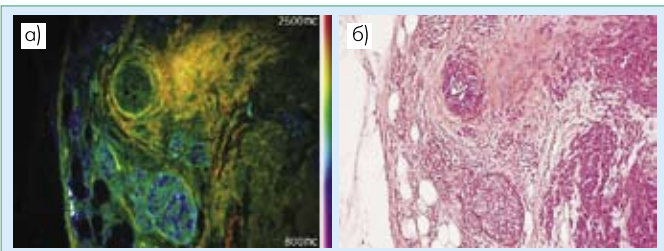
Рис.2 Схема FLIM с широким полем зрения и управляемым стробированием



**Рис.3** Участок ткани уха крысы: (а) окрашенный (с помощью орцеина) участок, (б) интенсивность флуоресцентного и (в) FLIM-изображений в параллельной неокрашенной части [длина волны возбуждения 410 нм; время жизни шкалы цветности: от 200 пс (голубой) до 1800 пс (красный)]

использовании техники окрашивания (слева) и без нее, но при наличии обычной флуоресценции и флуоресценции FLIM (рис.3б и 3в). Прекрасный внутренний контраст наблюдается в варианте FLIM между фоновым коллагеном, эластичными хрящами и кровеносными сосудами, что указывает на потенциальные возможности использования FLIM для приложений, требующих неинвазивной визуализации изображения тканей. Другой пример приведен на рис.4, который показывает автофлуоресцентное FLIM-изображение части панкреатической ткани человека с нейроэндокринной опухолью и цветное изображение того же участка при использовании стандартного гистопатологического окрашивания.

Эти FLIM-изображения тканевых автофлуоресценций были получены всего за несколько секунд, используя обычный микроскоп с широким полем зрения. Для практических клинических приложений (и для многих других приложений, включая изображения живых клеток и быстрый просмотр изображений) это качество желаемо или необходимо для получения и отображения FLIM-изображений в режиме реального времени. Была достигнута скорость регенерации 29 Гц при отображении FLIM-изображений в режиме реального времени. Мы применили этот вариант для параллельного отображения массива образцов для эндоскопии [9]. Если этот метод применяется для слабо флуоресцирующих молекул – таких, которые ответственны за автофлуоресценцию тканей, высокоскоростной FLIM должен быть очень чувствителен (т.е. эффективен в отдаче на один фотон). После экспериментальной и машинной оптимизации [10] были получены FLIM-изображения реального времени для неокрашенной



**Рис.4** а) FLIM-изображение неокрашенной части панкреатической ткани человека с нейроэндокринной опухолью и б) цветное изображение того же участка при использовании стандартного гистопатологического окрашивания

ex vivo-ткани (как через жесткий, так и через гибкий эндоскопы), что демонстрирует потенциальные возможности получения *in vivo*-изображений с помощью FLIM. На рис.5 показан пример кадра, взятого из последовательности FLIM-изображений реального времени свежей бараньей почки, которые были получены и отображены с частотой 7,2 Гц.

## ПЕРСПЕКТИВЫ

### FLIM со спектральным разрешением

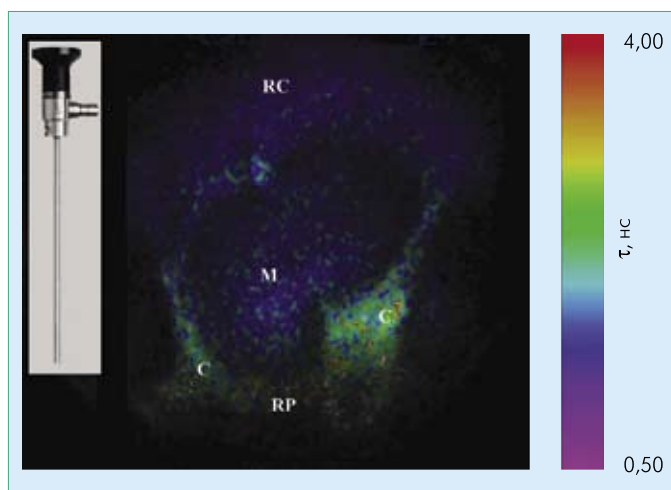
Эти предварительные результаты подтолкнули нас начать исследование возможности неинвазивного обнаружения молекулярных изменений, вызванных такими болезнями, как остеоартрит, диабет и рак. На сегодня число работ в этой области ограничено, но возможности получения полезных клинических результатов огромны. Путем комбинации FLIM с флуоресцентными изображениями, полученными со спектральным разрешением, и исследуя различные длины волн современных перестраиваемых СБД-лазеров для возбуждения, можно увеличить возможность получения клинически полезных контрастных изображений.

Учитывая, что такие лабораторные исследования, проведенные с помощью микроскопов, показали многообещающие медицинские возможности, можно заняться разработкой необходимых практических инструментов, которые можно было бы использовать докторам для прямого наблюдения за подозрительными тканями пациентов. Это, возможно, потребует использования новых эндоскопов и новых практических технологий с применением СБД-лазеров.

Мы также считаем, что нужно разработать FLIM-технологии для быстрой и аккуратной *ex vivo*-оценки неокрашенных тканей и обеспечить, тем самым, условия для более аккуратного и быстрого процесса получения гистопатологического диагноза – в частности для клиницистов в операционной.

### Многомерный FLIM

Конечно, предлагаемые технологией FLIM возможности значительно шире и не ограничиваются только получением клинических изображений. Многие группы исследователей имеют теперь системы FLIM для изучения в области молекулярной биологии. Резонансная передача энергии по Фёрстеру (Förster) (FRET – Förster Resonant Energy Transfer) – метод, основанный на флуоресценции и используемый для определения межмолекулярных расстояний нанометрового диапазона, все больше и больше использует FLIM для получения FRET-данных высокой достоверности [11]. Объединяя FLIM со спектральным разрешением можно обеспечить больше информации для FRET и других приложений. Мы разрабатываем многоспектральную FLIM-систему, используя нашу технологию высокоскоростного изображения с временным стробированием (time-gated imaging) для приложений, требующих изображения живых клеток. Мы также объединяем FLIM и поляризационное разре-



**Рис.5** FLIM-изображение реального времени (*ex vivo*) образца из бараньей почки, которые были получены через жесткий эндоскоп (Smith & Nephew) и отображены с частотой 7,2 Гц

шение, чтобы отобразить время вращательной диффузии (т.е. скорость, с которой флуорофорные молекулы "перекатываются" в окружающей их среде) в клетке [12] и других системах. Это время прямо связано со скоростью. Его можно отобразить в трехмерном пространстве и использовать, например, для изучения динамики микропотоков жидкости при работе с "лабораториями на чипе" (*lab-on-a-chip*).

### FLIM с еще большей скоростью

Современным вызовом технологии СБД-изображений является и реализация FLIM на еще более высоких скоростях, нужных, например, чтобы следовать динамике таких процессов, как ионные ( $\text{Ca}^{2+}$ ) переходные процессы или изображение быстро движущихся или эволюционирующих образцов. Нужны также практические источники возбуждения для FLIM-приложений реального времени. Что касается еще более быстродействующих FLIM, то мы недавно продемонстрировали электронно-управляемую технологию одноразового FLIM с широким полем зрения [10], которую мы намерены совместить с высокоскоростной ПЗС-камерой.

### Новые источники для формирования "универсальных" флуоресцентных изображений

Широко распространенные приложения FLIM потребуют практичных дружественных перестраиваемых лазеров, которые могут возбудить большое разнообразие флуорофоров. Мы недавно разработали электронно-перестраиваемый СБД-лазер (источник возбуждения), перекрывающий диапазон 400–1200 нм для конфокального микроскопа с широким полем зрения и системой FLIM [13]. Этот источник основан на генерации суперконтинуума в микроструктурированном волокне [14] и обеспечивает выходной луч с пространственной когерентностью, который также может быть использован для широкого круга изображений, формируемых интенсивностью излучения и других приложений.

Наиболее интересный вариант – использовать в качестве такого источника волоконный СБД-лазер с диодной накачкой, так чтобы можно было разработать относительно компактную и дешевую систему для формирования многомерного флуоресцентного изображения с требуемым разрешением по времени (учитывая время жизни флуоресценции), нужным уровнем возбуждения и длин волн излучения, а также поляризацией и трехмерными возможностями. Это создаст новые возможности для исследований в области молекулярной биологии и лекарственных средств, а также клинических изображений и многих приложений, выходящих за рамки биомедицины.

### БЛАГОДАРНОСТИ

Спонсорами наших исследований выступили: BBSRC, DTI Beacon Award, EPSRC, the European Union (в рамках VI общего проекта "Интегрированные технологии для получения молекулярных *in vivo*-изображений" – номер контракта LSHG-CT-2003-503259), HEFCE JIF (V) Award, Wellcome Trust Showcase Award, GlaxoSmithKline and Kentech Instruments

*Перевод статьи P.M.W. French. "Fluorescence lifetime imaging with ultrafast lasers for biomedical applications. – Photonic International, 2006, p.38–40. публикуется с разрешения редакции журнала "Photonik" (Germany).*

### ЛИТЕРАТУРА

1. P.French et al. – Revue De Physique Appliquee. 1987, v.22, p.1651.
2. P.French. – Reports on Progress in Physics, 1995, v.58, p.169.
3. P.French et al. – Optics Letters, 1989, v.14, p.686.
4. P.French et al. – Optics Letters, 1993, v.18, p.39.
5. R.Mellish et al. – Electronics Letters, 1994, v.30, p.223.
6. W.Denk et al. – Science, 1990, issue 248, p.73.
7. K.Dowling et al. – Optics Letters, 1998, v.23, p.810.
8. D.Elson et al. – Photochemical & Photobiological Sciences, 2004, v.3, p.795.
9. J.Requejo-Isidro et al. – Optics Letters, 2004, v.29, p.2249.
10. D.Elson et al. – New Journal of Physics, 2004, v.6, art. No.180.
11. P.Bastiaens, A.Squire. – Trends in Cell Biology, 1999, v.9, p.48.
12. K.Suhling et al. – Optics Letters, 2004, v.29(6), p.584.
13. C.Dunsby et al. – J. Phys. D-Appl. Phys., 2004, v.37, p.3296.
14. J.Ranaka et al. – Opt. Lett., 2000, v.25, p.25.