



ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВРЕМЕНИ ЖИЗНИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ С ПОМОЩЬЮ МНОГОМЕРНОГО TCSPC-МЕТОДА: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В БИМЕДИЦИНЕ*

В.Беккер, А.Желзов, В. Чеславский

При визуализации времени жизни флуоресценции (Fluorescence Lifetime Imaging – FLIM) регистрируемые изображения отображают полную функцию времени затухания флуоресценции в каждом пикселе. Параметры затухания являются показателями молекулярной окружающей среды флуорофоров. Поэтому FLIM позволяет получить непосредственную информацию о концентрации ионов, рН-факторе, белках и конфигурации белковых взаимодействий, а также метаболического состояния клеток и тканей.

Метод FLIM, использующий счет одиночных фотонов с корреляцией по времени (Time Correlated Single Photon Counting – TCSPC), основан на сканировании исследуемого образца импульсным лазерным излучением высокой частоты, регистрации единичных фотонов флуоресцирующего сигнала, формировании распределения фотонов по времени жизни в течение облучающего лазерного импульса и знании координат лазерного луча в области сканируемого объекта в момент регистрации фотонов. Метод превосходно сочетает в себе преимущества счета фотонов с корреляцией по времени и лазерной сканирующей микроскопии: это обеспечивает почти идеальную эффективность регистрации фотонов, минимальное время облучения образца, высокое временное разрешение, многоэкспоненциальное разложение профилей, а также подавление внефокусного и бокового рассеянного света.

ВВЕДЕНИЕ

Методы визуализации, основанные на флуоресценции, нашли широкое применение в исследо-

FLUORESCENCE LIFETIME IMAGING BY MULTI- DIMENSIONAL TCSPC ADDS NEW DIMENSIONS TO BIOMEDICAL IMAGING

W.Becker, A.Jelzow, V.Shcheslavskiy

Fluorescence Lifetime Imaging (FLIM) records images that contain a full fluorescence decay function in every pixel. The decay parameters are indicators of the molecular environment of the fluorophores. FLIM therefore delivers direct information on ion concentrations, pH, protein configuration and protein interaction, and the metabolic state of cells and tissue.

F LIM by time-correlated single-photon counting (TCSPC) is based on scanning the sample with a high-repetition-rate pulsed laser beam, detecting single photons of the fluorescence signal, and building up a photon distribution over the times of the photons in the laser pulse period and the coordinates of the laser beam in the scanning area in the moment of the photon detection. The technique favourably combines the advantages of time-correlated photon counting and laser scanning microscopy: It delivers a near-ideal photon efficiency, minimum sample exposure, high time resolution, resolution of multi-exponential decay profiles, and suppression of out-of focus and laterally scattered light.

Imaging techniques based on fluorescence detection have found broad application in life sciences because they are extremely sensitive and able to deliver information about biochemical interactions on the molecular scale. The intensity of the fluorescence depends on the fluorescence quantum efficiency and the concentration of the fluorophore. Images of the fluorescence intensity thus show where in a sample the fluorophore is located, i.e. show the spatial structure of the specimen. The fluorescence spectrum is characteristic of the fluorophore. Images containing spectral information thus allow the fluorophores in the individual pixels of an image to be identified. The fluorescence lifetime or, more exactly, the fluorescence decay function, depends on the type of the fluorophore but

* Статья и перевод на английский язык предоставлены компанией ЗАО "НТК"АЗИМУТ ФОТОНИКС"

ваниях клеток и живых организмов, потому что они чрезвычайно чувствительны и способны предоставлять информацию о биохимических взаимодействиях на молекулярном уровне. Интенсивность флуоресценции зависит от квантовой эффективности флуоресценции и концентрации флуорофора. Изображения интенсивности флуоресценции показывают, где в образце находятся флуорофоры, т.е. показывают пространственное строение исследуемого образца. Спектр флуоресценции является характерным для флуорофора. Изображения содержат спектральную информацию, позволяя определить флуорофоры в отдельных пикселах изображения. Время жизни флуоресценции или, точнее, функция затухания флуоресценции зависит от типа флуорофоров, а не от их концентрации. Также она зависит и от молекулярной среды флуорофора. Функция флуоресцентного затухания и, следовательно, флуоресцентные изображения содержат информацию о молекулярном окружении молекул флуорофора или флуоресцентномеченых биомолекул [1-3].

Существует ряд различных методов для обнаружения флуоресценции и совместимости обнаруженной флуоресценции с визуализацией. Разные принципы различаются эффективностью регистрации фотонов, т.е. числом фотонов, необходимых для получения заданной точности времени жизни [4, 5], времени регистрации необходимого для записи этих фотонов, потока фотонов при котором их можно использовать, временным разрешением, их способностью в разложении параметров нескольких экспоненциальных функций распада, многоволновых возможностях, возможностью оптических срезов и совместимостью с различными методами визуализации и микроскопии [1]. В данной статье основной упор сделан на FLIM со счетом одиночных фотонов с корреляцией по времени и на методе лазерного сканирования, который обеспечивает выдающееся сочетание эффективности регистрации фотонов, временное и пространственное разрешение [6].

TCSPC-FLIM

Принцип TCSPC FLIM

Классический метод TCSPC возбуждает образец с помощью импульсного лазера, обнаруживает единичные фотоны флуоресцирующего света и строит распределение фотонов (т.е. гистограммы) плотности фотонов, возбужденных лазерным импульсом от эффективности регистрации фотонов. Этот метод известен с 1961 года [7], полный обзор можно найти в [8]. Ограничением классического метода

not on its concentration. It depends, however, also on the molecular environment of the fluorophore. Fluorescence decay functions and, consequently, fluorescence lifetime images, therefore contain information on the molecular environment of the fluorophore molecules or fluorescently labelled biomolecules [1-3].

There is a number of different techniques to detect the fluorescence lifetime, and to combine fluorescence lifetime detection with imaging. Different principles differ in their photon efficiency, i.e. in the number of photons required for a given lifetime accuracy [4, 5], the acquisition time required to record these photons, the photon flux they can be used at, their time resolution, their ability to resolve the parameters of multi-exponential decay functions, their multi-wavelength capability, optical sectioning capability, and compatibility with different imaging and microscopy techniques [1]. Here, we will focus on FLIM by time-correlated single-photon counting and laser scanning, a technique that delivers an outstanding combination of photon efficiency, temporal resolution, and spatial resolution [6].

TCSPC-FLIM

Principle of TCSPC FLIM

Classic TCSPC excites a sample with a pulsed laser, detects single photons of the fluorescence light, and builds up a photon distribution (or a histogram) of the photon density over the time from the laser pulse to the photon detection. The technique is known since 1961 [7], a comprehensive overview can be found in [8]. The limitation of the classic technique is that it is intrinsically one-dimensional. It does not directly deliver images, and it cannot be combined with fast scanning, as it is used in modern laser scanning microscopes [9].

The problem of classic TCSPC has been solved by a multi-dimensional TCSPC introduced by Becker & Hickl in 1993. Here, the recording process builds up a photon distribution not only over the time after the excitation pulse but also over other parameters, such as the position of the laser beam in a scan area in the moment of the photon detection, the wavelength of the photons, or the time from the start of an experiment [6, 10, 11]. The application of multi-dimensional TCSPC to laser scanning microscopy is illustrated in Fig. 1.

The scan head of the microscope scans the sample with the focused beam of a high-frequency pulsed laser. For every detected photon, the TCSPC device determines the time, t , in the laser pulse period, and the location of the laser spot, x, y , in the scan

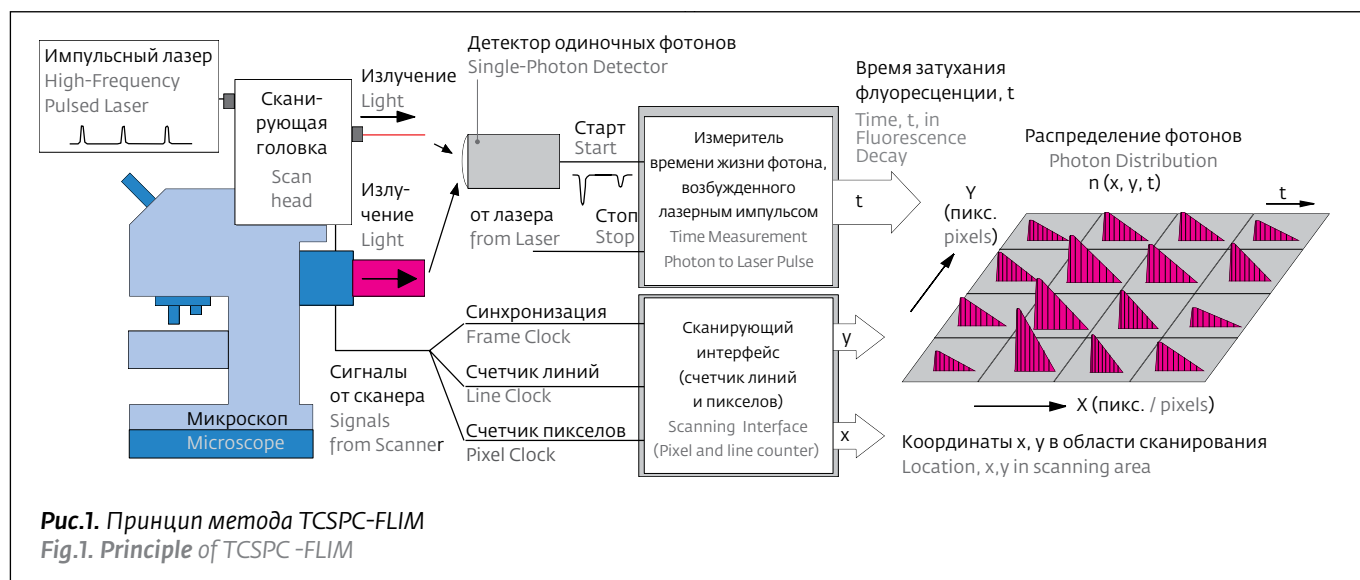


Рис.1. Принцип метода TCSPC-FLIM
Fig.1. Principle of TCSPC-FLIM

является то, что он одномерный. Он не передаёт изображения напрямую, и он не может использоваться в сочетании с быстрым сканированием, применяющимся в современных лазерных сканирующих микроскопах [9].

Проблема классического TCSPC-метода была решена с помощью многомерного TCSPC, представленного компанией Becker & Hickl в 1993 году. В данном случае процесс записи формирует распределение фотонов не только с течением времени после импульса возбуждения, но и по другим параметрам, таким как положение лазерного луча в области сканирования в момент регистрации фотона, длина волны фотонов или время от начала эксперимента [6, 10, 11]. Применение многомерного TCSPC-метода в лазерной сканирующей микроскопии показано на рис. 1.

Сканирующая головка микроскопа сканирует исследуемый образец сфокусированным пучком импульсного лазера высокой частоты. Для каждого обнаруженного фотона в TCSPC-приборе определяется время t , период лазерного импульса, местоположение лазерного пятна x, y в области сканирования. Из этих параметров строится распределение фотонов по пространственным координатам x, y и времени фотонов t . Процесс записи продолжается в течение большого числа периодов до тех пор, пока полезный уровень сигнал-шум фотонного распределения не будет достигнут. Более подробная техническая информация приведена в работе [11].

Из всех электронных FLIM-методов многомерный TCSPC-метод обеспечивает наиболее высокое временное разрешение. Он также позволяет получить лучшую точность времени жизни, или эффективность регистрации фотонов, при заданным

area. From these parameters, a photon distribution over the spatial coordinates, x, y , and the times of the photons, t , after the laser pulses is built up. The recording process is continued over a large number of frames, until the desired signal-to-noise ratio of the photon distribution has been achieved. Please see [11] for more technical details.

Among all electronic FLIM techniques, multidimensional TCSPC delivers the highest time resolution. It also delivers the best lifetime accuracy, or photon efficiency, for a given number of photons detected from the sample [4, 5]. TCSPC FLIM has a number of other features important to lifetime imaging of biological systems: It is able to resolve complex decay profiles, and it is tolerant to dynamic changes in the fluorescence decay parameters during the acquisition [5, 11]. Moreover, TCSPC FLIM is perfectly compatible with confocal and multiphoton [9, 12] laser scanning microscopes. It has no problems with the fast scan rate used in these systems: The recording process is just continued over as many frames of the scan as necessary to obtain the desired signal-to-noise ratio. Moreover, TCSPC FLIM takes advantage of the optical sectioning capability of confocal or multiphoton scanning: The data are obtained from accurately defined lateral positions and from an accurately defined plane within the sample, without contamination by lateral scattering and out-of focus fluorescence [11].

Fig. 2 gives an example of the data quality that can be reached by TCSPC FLIM. The image has 2048 x 2048 spatial pixels, and the fluorescence decay functions in the individual pixels are resolved into 256 time channels.

числе фотонов зарегистрированных от образца [4, 5]. Метод TCSPC-FLIM имеет ряд других особенностей, важных для визуализации времени жизни биологических систем: он способен решать сложные профили кинетики затухания и устойчив к динамическим изменениям параметров затухания флуоресценции [5, 11]. Кроме того, метод TCSPC-FLIM прекрасно совместим с конфокальной и многофотонной [9, 12] лазерной сканирующей микроскопией. Он не имеет никаких проблем совместимости с высокой скоростью сканирования используемой в этих системах: процесс записи продолжается в течение всего времени сканирования для получения необходимого соотношения сигнал-шум. Кроме того метод TCSPC FLIM использует оптические срезы конфокального или многофотонного сканирования: данные получены из точно определённой боковой позиции и с точно определённой плоскостью в образце, без загрязнения боковым рассеянием и внефокусной флуоресценцией [6].

На рис. 2 приведен пример данных высокого качества, которые могут быть получены с помощью метода TCSPC-FLIM. Изображение размером 2048×2048 пикселей и функцией флуоресцентного

FLIM APPLICATIONS IN BIOLOGY

Measurement of molecular environment parameters

There is a wide range of fluorophores, also called "sensors" or "probes", that change their fluorescence lifetime depending on the local molecular environment [3]. Commonly known ones are sensors for ion concentrations, such as Oregon Green Bapta for Ca^{2+} or MQAE for Cl^- . Other sensors change their lifetimes with the pH, or on binding to RND and DNA. There are also effects of local viscosity, aggregation of the fluorophore, and electron transfer [1-3, 6, 14]. An example for Ca^{2+} measurement is shown in Fig. 3.

The advantage of FLIM over intensity-based techniques in all these cases is that the results are independent of the (variable) concentration of the fluorophore and of absorption variations within the sample.

FRET Experiments

The most widespread application of TCSPC FLIM is the measurement of protein interaction and protein folding by Förster resonance energy transfer (FRET) [15, 16]. The proteins are labelled with two dyes

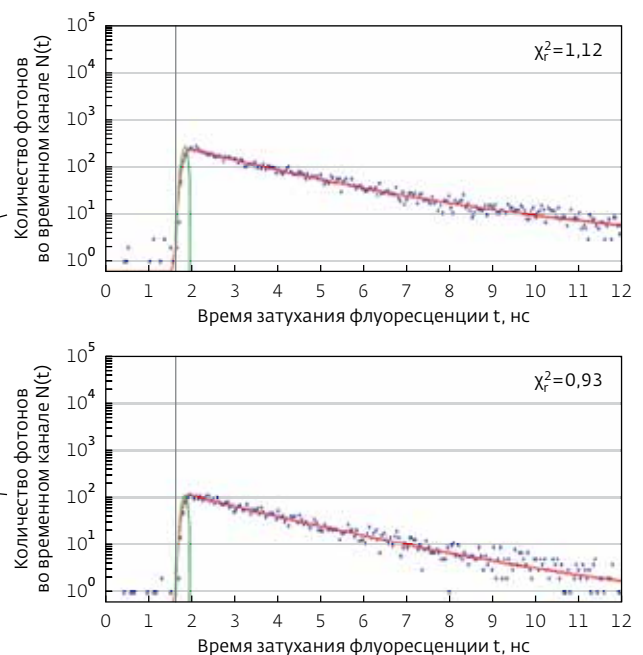
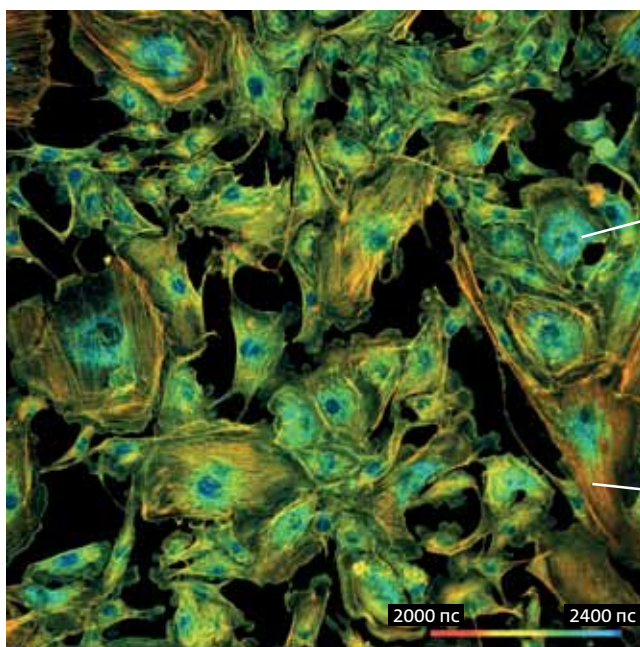


Рис.2. Эндотелиальные клетки коровьей легочной артерии (BPAE): слева изображение, просканированное с разрешением 2048×2048 пикселей и 256 временных каналов на пиксель (использована система DCS-120 производства компании Becker & Hickl, микроскоп Axio-Observer компании Zeiss с объективом 20x NA = 0.5; справа кинетика затухания флуоресценции в двух избранных пикселях. Адаптировано из [13]

Fig. 2. BPAE cells scanned with 2048 × 2048 pixels, 256 time channels per pixel. Left: FLIM image. Right: Decay curves in two selected pixels. Becker & Hickl DCS-120 system, Zeiss Axio-Observer version, microscope lens 20x NA = 0.5, adapted from [13]

затухания в отдельных пикселах 256 временных каналов.

ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА FLIM В БИОЛОГИИ Измерение параметров молекулярного окружения

Существует широкий спектр флуорофоров, также называемых "датчики" или "пробники", изменение времени жизни которых зависит от локального молекулярного окружения [3]. Широко известными являются датчики концентрации ионов, такие как Oregon Green Bapta для Ca^{2+} или MQAE для Cl^- . Другие датчики изменяют свое время жизни в зависимости от значения pH или при привязке к ДНК и РНК. Есть также эффекты локальной вязкости, агрегации флуорофора и переноса электронов [1-3, 6, 14]. Пример для измерения Ca^{2+} показан на рис. 3.

Преимущество FLIM-метода над методами, основанными на измерениях интенсивности, проявляется в том, что его результаты не зависят от вариаций концентрации флуорофора и поглощения в исследуемом образце.

FRET-эксперименты

Одним из наиболее широких применений метода TCSPC FLIM является измерение белковых взаимо-

of different absorption and emission spectra. The emission band of the first dye, the donor, overlaps the absorption band of a second one, the acceptor. If the distance between donor and acceptor is smaller than a few nanometers energy can transfer directly from the donor to the acceptor. The result is a decrease in the fluorescence decay time of the donor. The intensity of the energy transfer, i.e. the decrease in the decay time, is an indicator of the distance between the donor and the acceptor.

The use of FLIM for FRET experiments has the obvious benefit that the FRET intensity is obtained from a single lifetime image of the donor. Acceptor images are not needed, thus donor bleedthrough into the acceptor channel and directly excited acceptor fluorescence have no influence on FLIM-FRET measurements. The only reference value needed is the donor lifetime in absence of the acceptor [17-20]. Even this can often be derived from a double-exponential analysis of the donor decay function [11].

An example of a FLIM FRET result is shown in Fig. 4. The data were obtained from a cell expressing a GFP fusion protein. A Cy3-labelled antibody was used as an acceptor for FRET.

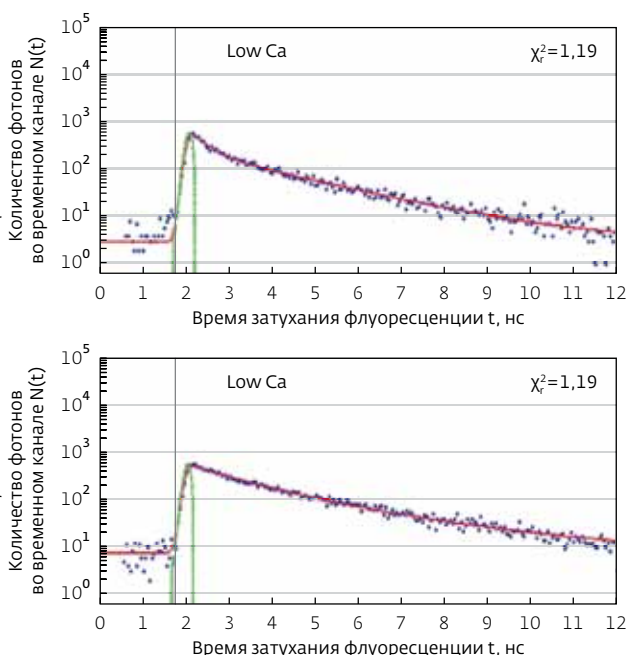
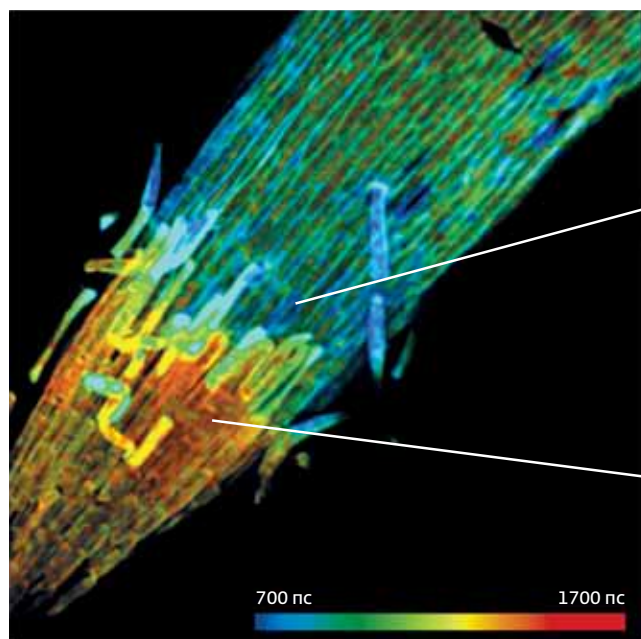


Рис.3. Кончик корня ячменя, покрытый флуорофором Oregon Green Bapta (источник: Feifei Wang, Zhonghua Chen & Anya Salih, University of Confocal Bioimaging Facility, University of Western Sydney, Australia. Использован микроскоп Leica SP5 MP с FLIM-модулем SPC-150 компании Becker&Hickl [11])

Fig. 3. Barley root tip, stained with Oregon Green Bapta. Courtesy of Feifei Wang, Zhonghua Chen & Anya Salih, University of Confocal Bioimaging Facility, University of Western Sydney, Australia. Leica SP5 MP with bh SPC-150 FLIM module [11]

действий и сворачивания белков путём Ферстеровского резонансного переноса энергии (Förster resonance energy transfer – FRET) [15, 16]. Белки помечаются двумя красителями с различными спектрами поглощения и излучения. Полосы излучения первого красителя (донора) перекрывают полосы поглощения второго (акцептора). Если расстояние между донором и акцептором меньше нескольких нанометров, то энергия может передаваться непосредственно от донора к акцептору. В результате происходит уменьшение времени затухания флуоресценции донора. Интенсивность передачи энергии, т.е. уменьшение времени затухания, является показателем расстояния между донором и акцептором.

Использование FLIM-метода для FRET-экспериментов имеет очевидное преимущество – интенсивность FRET получается из единичного времени жизни донора. Акцепторное изображение не требуется, и утечки донора в акцепторный канал и напрямую возбужденная флуоресценция акцептора не имеет никакого влияния на результат измерения метода FLIM-FRET. Единственное значение, которое требуется для вычисления FRET – это время затухания донора в отсутствие акцептора

An enormous amount of FLIM-FRET papers has been published in the last few years, most of them using TCSPC FLIM. Please see [11] for a review of the literature and for further details.

AUTOFLUORESCENCE FLIM

Biological tissue contains a wide range of endogenous fluorophores. The lifetimes depend on local environment parameters, such oxygen saturation, binding to proteins, and importantly, on the metabolic state of the tissue [14, 21-23]. The FLIM data therefore contain direct biological information [6]. Additional information about the constitution of the tissue can be obtained from second-harmonic generation (SHG) signals [24, 25]. An important point is that autofluorescence imaging does not use exogenous labels. It can therefore be directly used in clinical applications.

Autofluorescence images of biological tissue can be surprisingly rich in detail, see Fig. 5. The images show a pig skin sample excited by two-photon excitation at 800 nm. The left image shows the wavelength channel below 480 nm. This channel contains both fluorescence and SHG signals. The SHG fraction of the signal has been extracted from

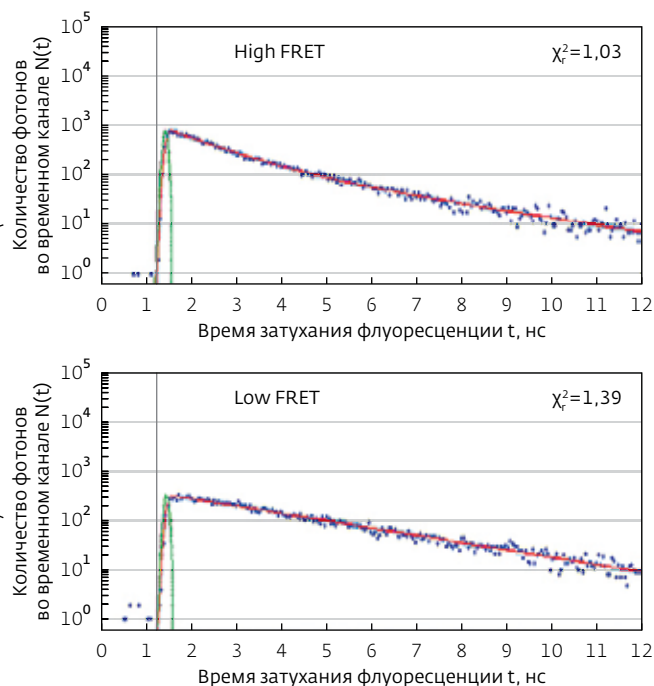
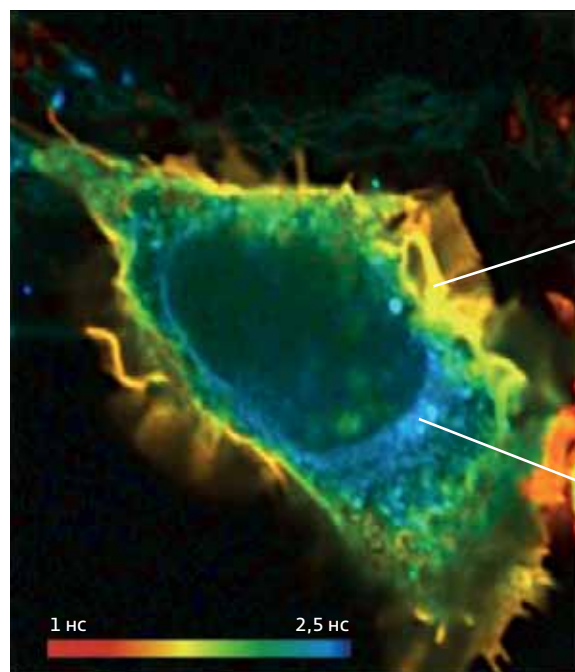


Рис.4. Клетки, содержащие синтез зеленого флуоресцентного белка (донора) и Cy3-меченные антитела (акцептор). Изображение донора, анализ с помощью двойного экспоненциального распада, амплитудно-взвешенное время жизни (оборудование: микроскоп Zeiss LSM 710 с FLIM-системой Simple-Tau 152 компании Becker & Hickl)

Fig.4. Cell containing a expressing a GFP fusion protein (donor) and Cy3-labelled antibody (acceptor). Donor image, analysis by double-exponential decay mode, amplitude-weighted lifetime. Zeiss LSM 710 microscope with Becker & Hickl Simple-Tau 152 FLIM system

[17–20]. Зачастую это значение можно получить при помощи анализа кинетики затухания донора двойной экспоненциальной функцией [11].

Пример результата использования метода FLIM-FRET показан на рис. 4. Данные были получены из клеток, экспрессирующих синтез зеленого флуоресцентного белка. Cy3-меченое антитело использовали в качестве акцептора для FRET.

Огромное количество FLIM-FRET работ были опубликованы в последние несколько лет, большинство из них с помощью TCSPC FLIM [11].

FLIM АВТОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

Биологическая ткань содержит широкий спектр эндогенных флуорофоров, время жизни которых зависит от локальных параметров окружающей среды, таких как насыщенность кислородом, связь с белками, а главное – состояние метаболизма ткани [14, 21–23]. Данные FLIM содержат прямую биологическую информацию [6]. Дополнительная информация о строении ткани может быть получена при помощи генерации сигналов второй гармоники [24, 25]. Важным аспектом является то, что автофлуоресцентная визуализация

the FLIM data and displayed by colour. The right image is from the channel >480 nm. It contains only fluorescence, the colour corresponds to the amplitude-weighted mean lifetime of a double-exponential decay model.

CLINICAL FLIM APPLICATIONS

Multiphoton tomography of human skin uses laser scanning by a focused femtosecond laser beam, two-photon excitation, and non-descanned detection of the fluorescence signals [14, 26]. The technique goes back to the work of Gratton, König, Masters, So and Tromberg who showed that in-vivo two-photon autofluorescence imaging of cells and, especially, human skin, is possible without impairing the viability [25, 27–29]. Instruments for clinical application of the technique have been developed by Jenlab GmbH, Jena, Germany [30]. Because the technique is based on fast scanning and pulsed excitation it favourably combines with TCSPC FLIM. Fig. 6 shows the stratum granulosum of a human patient recorded with a Jenlab "Dermainspect" system and a Becker & Hickl SPC-152 TCSPC FLIM system.

не использует экзогенные метки. Поэтому метод может напрямую быть использован в клинических исследованиях.

Автофлуоресцентное изображение биологической ткани может содержать на удивление много деталей (рис.5). На изображениях показан образец кожи свиньи при двухфотонном возбуждении на длине волны 800 нм. На рисунке слева показан канал детекции на длине волны менее 480 нм. Этот канал содержит как флуоресценцию, так и генерацию сигналов второй гармоники. Часть сигнала генерации второй гармоники была получена из данных FLIM и отображается цветом. На правом рисунке показан канал на длине волны больше 480 нм. Он содержит только флуоресценцию, цвет соответствует амплитудно-взвешенному среднему времени затухания полученного из модели двойного экспоненциального распада.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ FLIM В КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

При многофотонной томографии человеческой кожи используется лазерное сканирование с помощью сфокусированного фемтосекундного лазерного луча, двухфотонного возбуждения и регистрации сигналов флуоресценции, не требующих десканирования [14, 26]. Методика берет свое начало в работах Граттона, Кенига, Мастерса, Со и Тромберга, которые показали, что в живых организмах двухфотонная визуализация автофлуоресценции клеток и, в особенности, человеческой кожи, может производиться без ущерба для их жизнедеятельности [25, 27-29]. Инструменты для клинического применения методики были разработаны компанией Jenlab GmbH (Йена, Германия) [30]. Поскольку методика основана на быстром сканировании и импульсном возбуждении, то она хорошо сочетается с методом TCSPC-FLIM. На рис. 6 показан зернистый слой человеческой кожи (stratum granulosum), записанный системой Jenlab "Dermainspect" и FLIM-TCSPC системой SPC-152 компании Becker & Hickl.

Для применений, связанных с офтальмологией, в FLIM-методе используется сочетание офтальмологического сканера с одним или двумя пикосекундными диодными лазерами и TCSPC FLIM системой. Подробная техническая информация в работах [6, 11]. Офтальмологический FLIM в настоящее время проходит клинические испытания [31, 32]. Два типовых полученных результата показаны на рис. 7. Изображения были отсканированы с помощью метода FLIO (Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscopy) для съёмки времени жизни лазерным офтальмоскопом фирмы

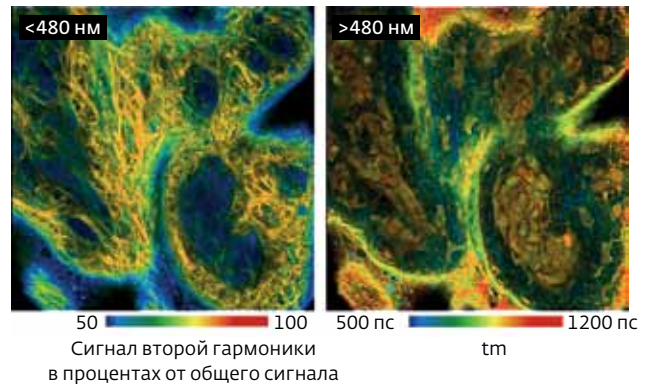


Рис. 5. FLIM-изображение образца кожи свиньи при двухфотонном возбуждении: слева – длина волны канала меньше 480 нм, цвета показывают процент от генерации второй гармоники в записанном сигнале; справа – длина волны канала больше 480 нм, цвета показывают амплитудно-взвешенное среднее время жизни (оборудование: микроскоп Zeiss LSM 710 NLO с FLIM-системой Simple-Tau 152 компании Becker&Hickl [1])

Fig. 5. Two-photon FLIM of pig skin. Two-photon excitation, non-descanned detection. Left: Wavelength channel <480nm, colour shows percentage of SHG in the recorded signal. Right: Wavelength channel >480nm, colour shows amplitude-weighted mean lifetime. Microscope Zeiss LSM 710 NLO, with bh Simple-Tau 152 FLIM system [1]

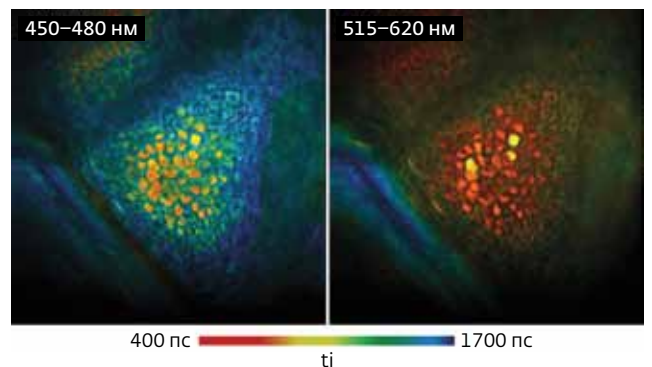


Рис. 6. FLIM-изображения живой человеческой кожи, полученные на мультифотонном томографе Jenlab Dermainspect и TCSPC-FLIM системе SPC-152 компании Becker & Hickl. Двухфотонное возбуждение на длине волны 750 нм [11] (источник: М. Робертс и В. Санчес, Университет Квинсленда, Брисбен, Австралия)

Fig. 6. In vivo FLIM image of human skin recorded by a Jenlab Dermainspect Multiphoton Tomograph and a Becker & Hickl SPC-150 TCSPC FLIM system. Two-photon excitation at 750 nm [11]. (Data courtesy of Michael Roberts and Washington Sanchez, University of Queensland, Brisbane, Australia)

Heidelberg Engineering (Германия). Детекторная часть системы имеет два спектральных канала от 490 нм до 560 нм и от 560 нм до 700 нм. Сигналы регистрировались с помощью гибридных детекторов HPM-100 фирмы Becker&Hickl [33] и записывались TCSPC-FLIM модулями для счета фотонов SPC-150. Представлены изображения с длинами волн канала от 560 нм до 700 нм.

Изображения TCSPC-FLIM других органов, могут быть получены путем сканирования через эндоскопы. Оптический принцип был продемонстрирован с хорошими результатами [11]. В настоящее время проблемой является отсутствие клинических испытаний эндоскопов с высокой числовой апертурой и низкой собственной флуоресценцией.

ПОСЛЕДНИЕ РАЗРАБОТКИ

За последние 10 лет методы FLIM добились впечатляющего прогресса. Обычные фотоэлектронные умножители (ФЭУ) были заменены однофотонными лавинными фотодиодами и гибридными детекторами. Эти детекторы имеют значительно более высокую эффективность регистрации фотонов, чем традиционные ФЭУ. Гибридные детекторы обеспечивают получение более чистых сигналов [33]. Таким образом, они не только регистрируют большее число фотонов, но и позволяют FLIM-системам достигать более высокой точности измерения времени жизни для заданного числа фотонов на пиксел. В последние несколько лет скорость и объем памяти компьютеров увеличились более чем на порядок. 64-разрядные операционные системы и 64-битное программное обеспечение прибора увеличили доступный объем памяти. В результате данные FLIM могут быть записаны с мегапиксельным разрешением [11, 34], как показано на рис.8.

Повышение эффективности помогает избежать искажения результатов исследования, связанных с фотоотбеливанием, фотоповреждением или фотоиндуцированием метаболических изменений в исследуемых образцах. В сочетании с большим объемом памяти для 64-разрядных систем основанных на Windows, метод TCSPC-FLIM может быть расширен с помощью дополнительных параметров фотонов или эксперимента. Одним из таких параметров является спектрально-разрешенный FLIM [5, 12]. Спектр флуоресцирующего света распределяется на матрицу из детекторных каналов. Для каждого фотона определяется время возбуждения лазерным импульсом, номер регистрирующего канала в детекторе, положение x и y лазерного пятна в области сканирования. Эти сведения

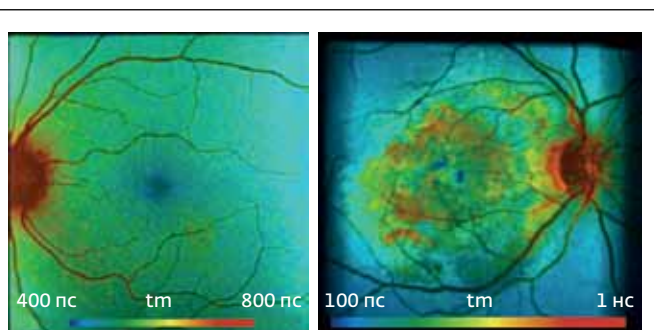


Рис.7. Времена жизни глазного дна человека: слева – изображение левого глаза автора (WB); справа – изображение времени жизни глазного дна пациента с возрастной дегенерацией желтого пятна [11], (источник: Д. Швейцер., Ф. Шиллер, Университет Йены, Германия)

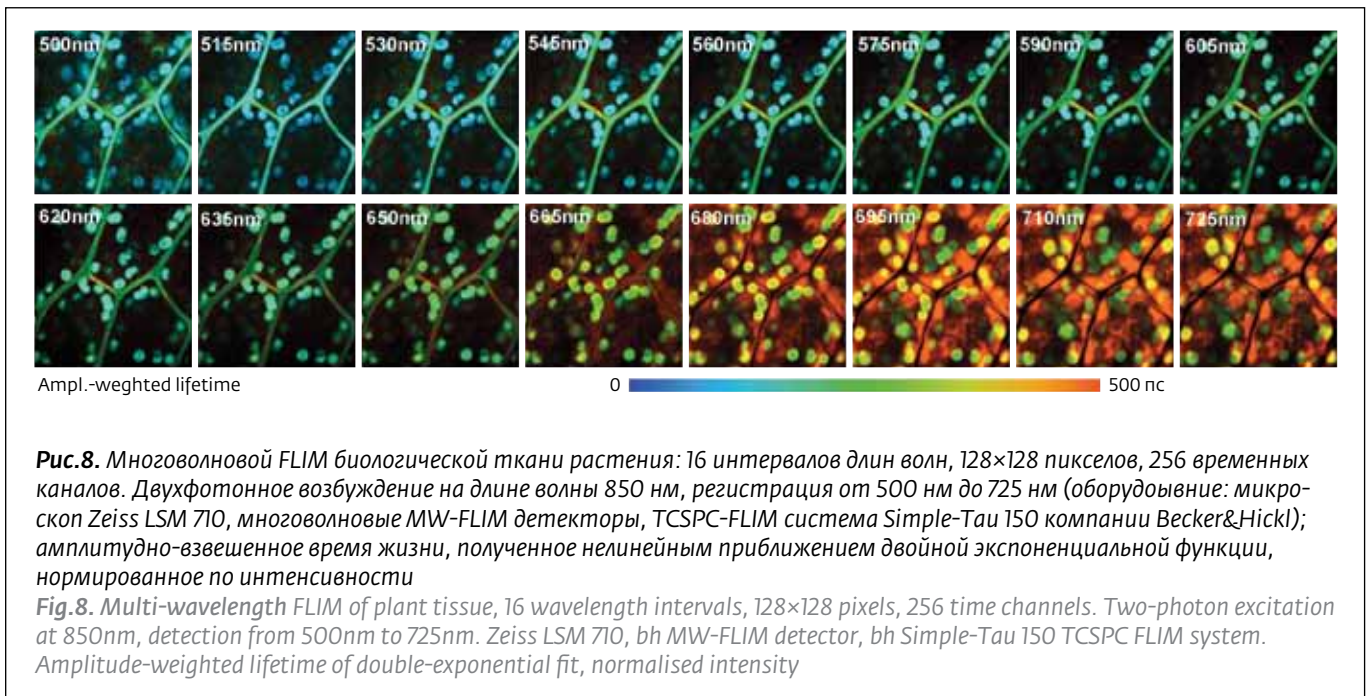
Fig. 7. Left: Lifetime image of the fundus of the author's left eye. Right: Lifetime image of the fundus of the eye of an AMD patient. From [11], data courtesy of Dietrich Schweitzer, Friedrich Schiller University Jena, Germany

Ophthalmic FLIM uses a combination of an ophthalmic scanner with one or two ps diode lasers and a TCSPC FLIM system. For technical details please see [6, 11]. Ophthalmic FLIM is currently in the state of clinical trials [31, 32]. Two typical results are shown in Fig. 7. The images were scanned by a FLIO lifetime imaging laser ophthalmoscope of Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany. The detection part has two spectral channels detecting from 490 nm to 560 nm and 560 to 700 nm. The signals are detected by Becker & Hickl HPM-100 hybrid detectors [33], and recorded by Becker & Hickl SPC-150 TCSPC FLIM modules. The images shown are from the wavelength channel from 560 nm to 700 nm.

TCSPC-FLIM of other organs can certainly be obtained by scanning through endoscopes. The optical principle has been demonstrated with good results [11]. The problem is currently the lack of clinically approved endoscopes with high numerical aperture and low intrinsic fluorescence.

RECENT DEVELOPMENTS

In the last 10 years, FLIM techniques have made impressive progress. Conventional PMTs have been replaced with single-photon avalanche photodiodes and hybrid detectors. These detectors have considerably higher detection efficiency than conventional PMTs. Hybrid detectors also deliver cleaner signals [33]. Thus, they not only detect more photons, they allow the FLIM system to achieve



используются для построения распределения фотонов по времени распада фотонов флуоресценции, по длине волны и координатам изображения. В результате несколько изображений (обычно 16) различной длины волны одновременно записываются в одном TCSPC-канале. Результат показан на рис. 8. Более подробно – в работах [22, 35, 36].

Другой способ добавления дополнительных параметров для построения распределения фотонов в методе FLIM – это "мозаика". Мозаичный FLIM записывает данные последующих записей FLIM в следующие элементы FLIM большего массива данных. Этот метод первоначально был разработан для записи пространственных мозаичных данных при пошаговом перемещении образца [34]. Он может быть также использован для записи Z стеков FLIM данных и для записи быстрых временных рядов [6, 11]. Пример показан на рис.9. Образец – листок мха. Мозаика имеет 64 элемента, каждый записан в течение 1 секунды. В работе использовался микроскоп с конфокальной FLIM-системой DCS-120 компании Becker&Hickl, время проходит от нижнего левого до верхнего правого угла. Отчетливо видно снижение времени жизни флуоресценции, вызванного нефотохимическим переходом хлорофилла.

С помощью периодической стимуляции образца данная методика способна устранить изменения концентрации Ca^{2+} в живых нейронах при временном разрешении 40 мс [6, 11]. Еще более быстрый метод называется флуоресцентным вре-

a higher lifetime accuracy for a given number of photons per pixel. In the last few years, speed and memory size of computers has increased by more than an order of magnitude. 64-bit operating systems and 64-bit instrument software have increased the available memory size. As a result, FLIM data can be recorded at mega-pixel resolution [11, 34], as shown in Fig. 8.

Increased efficiency helps avoid artefacts induced by photobleaching, photodamage or photo-induced metabolic changes in the samples. In combination with the large memory space of 64-bit Windows systems, TCSPC FLIM can be extended with additional parameters of the photons or the experiment. One example is multi-wavelength FLIM [5, 12]. A spectrum of the fluorescence light is spread over an array of detector channels. For every photon, the time in the laser pulse period, the channel number in the detector array, and the position, x, and y, of the laser spot in the scan area are determined. These pieces of information are used to build up a photon distribution over the arrival times of the photons in the fluorescence decay, the wavelength, and the coordinates of the image. The result is that several images (usually 16) of different wavelength are recorded simultaneously in a single TCSPC channel. A result is shown in Fig. 8. Please see also [22, 35, 36].

Another way to add additional dimensions to the FLIM photon distribution is "Mosaic FLIM". Mosaic FLIM records the data of subsequent FLIM recordings

менем жизни переходных процессов сканирования (Fluorescence Lifetime-Transient Scanning – FLITS). Этот метод основан на TCSPC-методике и сканировании отдельных линий. Метод FLITS был представлен для записи динамических эффектов времени жизни флуоресценции при временном разрешении около 1 мс [6, 11, 38].

В настоящее время все больший интерес представляет FLIM-метод в ближней ИК-области спектра. В этой области эмиссия экзогенных флуорофоров может быть обнаружена без загрязнения от автофлуоресценции. Кроме того, разложение флуоресценции флуорофоров ближней ИК-области спектра является актуальным для диффузных оптических методов визуализации [5, 6, 11]. Пример ближнего ИК- FLIM-метода с помощью лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM 710 NLO показан на рис.10. Технические детали ближнего ИК FLIM описаны в [11] и [37].

Метод TCSPC-FLIM может быть объединен со STED-микроскопией на основе подавления спонтанного испускания (Stimulated Emission Depletion (STED) Microscopy) [39, 40] и со сканирующей оптической микроскопией ближнего поля (Near-field Scanning Optical Microscopy – NSOM) [11, 40] для получения времени жизни флуоресценции изображения с оптическим суперразрешением. Пример записи STED-FLIM показан на рис. 11.

Метод TCSPC-FLIM способен одновременно записывать визуализацию флуоресценции (FLIM) и изображения фосфоресценции времени жизни (PLIM). Методика основана на модулирующем включении-выключении высокочастотного импульсного лазера, и записи двух времен для каждого детектированного фотона. Одно время – от предыдущего возбуждения импульса, другое – от модуляции импульсов [11, 42].

Пример показан на рис.12: дрожжевые клетки, окрашенные флуоресцентным веществом (2,2'-bipyridyl) dichlororuthenium (II) hexahydrate. На временной шкале пикосекундного масштаба обнаружена автофлуоресценция NADH и FAD. Фосфоресценция красителя рутения зафиксирована в микросекундном масштабе. Изображение времени жизни флуоресценции показано на рисунке слева, изображение справа – время жизни фосфоресценции.

Методы, основанные на комбинации конфокальной или двухфотонной лазерной сканирующей микроскопии с TCSPC, в принципе, также способны записывать данные флуоресцентной корреляционной спектроскопии (FCS-следы) и FRET

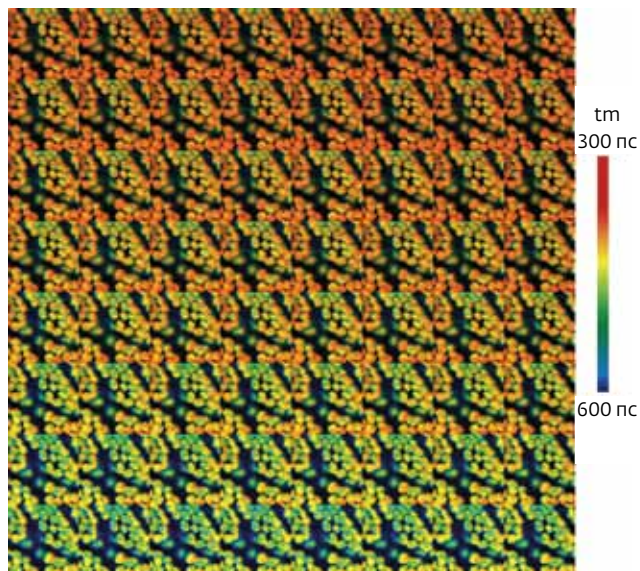


Рис.9. Временной ряд, записанный мозаичным изображением; 64 элемента мозаики для последовательных временных рядов после включения возбуждения светом (время сбора одного элемента 1 с, общее время 64 с, размер изображения каждого элемента 128×128 пикселей, 256 временных каналов)

Fig. 9. Time series recorded by mosaic imaging. 64 mosaic elements for consecutive times after the turn-on of the excitation light. Acquisition time per element 1 second, total time of sequence 64 seconds, image size of each element 128×128 pixels, 256 time channels

into subsequent elements of a large data array. The technique has originally been developed to record spatial mosaic data by sample stepping [34]. It can, however, be used also to record Z stacks of FLIM data and to record fast time series [6, 11]. An example is shown in Fig. 9. The mosaic has 64 elements, each recorded with an acquisition time of one second. The sample was a moss leaf, the microscope a bh DCS-120 confocal FLIM system. The time runs from lower left to upper right. The decrease in the fluorescence lifetime by the non-photochemical chlorophyll transient is clearly visible.

By using periodic stimulation of the sample, the technique is able to resolve changes in the Ca^{2+} concentration in live neurons at a resolution of 40ms [6, 11]. An even faster technique, called Fluorescence Lifetime-Transient Scanning (FLITS), is based on TCSPC and line scanning. FLITS has been shown to record dynamic fluorescence-lifetime effects at a resolution of about 1 ms [6, 11, 38].

There is currently an increasing interest in performing FLIM at near-infrared wavelengths. In

единичных молекул [6, 11]. Пример FCS записи представлен на рис. 13.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сочетание многомерного TCSPC-метода и лазерного сканирующего микроскопа позволяет записать визуализацию время жизни флуоресценции почти с идеальной эффективностью регистрации фотонов и превосходным временным и пространственным разрешением. Этот метод может быть расширен, чтобы записывать изображения на нескольких длинах волн, пространственные мозаики и Z-стеки FLIM-изображений, а также быстрые временные серии, показывающие динамическое изменение в поведении флуоресценции исследуемого образца. Кроме того, флуоресцентное изображение времени жизни может быть записано одновременно с фосфоресцентным изображением времени жизни. Метод TCSPC-FLIM может быть объединен со STED, в результате чего FLIM-изображения будут записаны с оптическим суперразрешением. Типовым применением FLIM-метода является отображение локальных молекулярных параметров окружающей среды, белковых взаимодействий по FRET-методу и визуализация автофлуоресценции. Клиническое применение находится на стадии клинических испытаний.

ЛИТЕРАТУРА

1. **W. Becker.** Fluorescence Lifetime Imaging - Techniques and Applications. - J. Microsc., 247, 119-136 (2012).
2. **M.Y. Berezin, S. Achilefu.** Fluorescence lifetime measurement and biological imaging. - Chem. Rev., 110, 2641-2684 (2010).
3. **J.R. Lakowicz.** Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd edn.: Springer (2006).
4. **M. Köllner, J. Wolfrum,** How many photons are necessary for fluorescence-lifetime measurements? - Phys. Chem. Lett., 200, 199-204 (1992).
5. **J.P. Philip and K. Carlsson.** Theoretical investigation of the signal-to-noise ratio in fluorescence lifetime imaging, - J. Opt. Soc. Am., A20, 368-379 (2003).
6. **W. Becker (ed.).** Advanced time-correlated single photon counting applications: Springer, Berlin, Heidelberg, New York (2015).
7. **L. M. Bollinger, G. E. Thomas.** Measurement of the time dependence of scintillation intensity by a delayed coincidence method. - Rev.Sci. Instrum., 32, 1044-1050 (1961).
8. **D.V. O'Connor, D. Phillips.** Time-correlated single

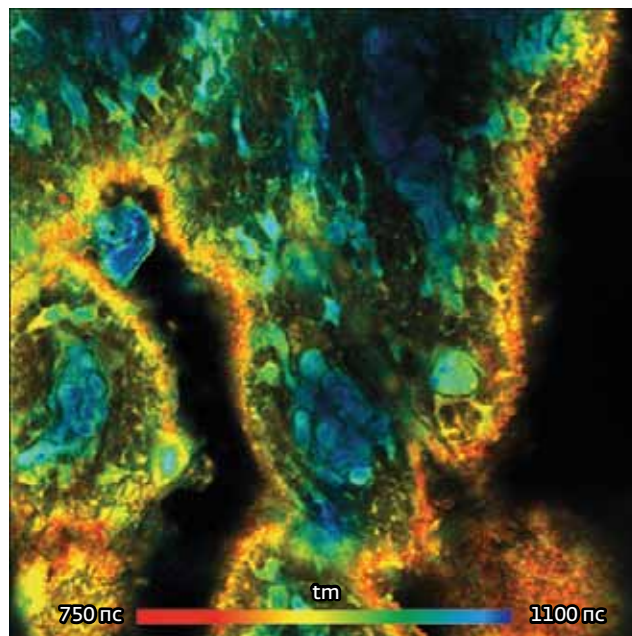


Рис.10. Образец свиной кожи, окрашенный с диэтилтрикарбоцианином (оборудование: микроскоп Zeiss LSM 710 NLO, Ti: Sa-лазер для однофотонного возбуждения, длина волны возбуждения 780 нм, регистрируемая длина волны от 800 до 900 нм, FLIM-система Simple-Tau 152 с гибридным детектором HPM-100-50 компании Becker&Hickl; поперечный размер изображения 212×212 мкм, глубина около 30 мкм от поверхности). Отчетливо заметна высокая контрастность изображения

Fig. 10. Pig skin sample stained with DTTCC. Zeiss LSM 710 NLO, Ti: Sa laser used for one-photon excitation. Excitation wavelength 780 nm, detection wavelength 800 nm to 900 nm. Becker & Hickl Simple-Tau 152 FLIM system with HPM-100-50 hybrid detector. Lateral size of the images 212×212 μm, depth about 30 μm from surface. Note the high contrast of the image

the NIR, the emission of exogenous fluorophores can be detected without contamination from autofluorescence. Moreover, the fluorescence decay signature of NIR fluorophores is important to diffuse optical imaging techniques [5, 6, 11]. An example of NIR FLIM with a Zeiss LSM 710 NLO laser scanning microscope is shown in Fig. 10. Technical details of NIR FLIM are described in [11] and [37].

TCSPC FLIM can be combined with STED (stimulated emission-depletion) microscopy [16, 32] and with NSOM (near-field scanning optical microscopy) [8, 35] to obtain fluorescence lifetime images with optical super-resolution. An example of a STED-FLIM recording is shown in Fig. 11.

- photon counting: Academic Press, London (1984).
9. J. Pawley (ed.). Handbook of biological confocal microscopy, 3rd edn.: Springer (2006).
 10. W. Becker. Advanced time-correlated single-photon counting techniques: – Springer, Berlin, Heidelberg, New York, 2005.
 11. W. Becker. The bh TCSPC handbook. 6th edition: Becker & Hickl GmbH (2015), available on www.becker-hickl.com.
 12. Diaspro A. (ed.). Confocal and two-photon microscopy: Foundations, applications and advances: Wiley-Liss (2001).
 13. Becker & Hickl GmbH, DCS-120 Confocal Scanning FLIM Systems, user handbook, 6th ed. (2015), available on www.becker-hickl.com.
 14. Roberts M. S., Dancik Y., Prow T.W., Thorling C.A., Li L., Grice J.E., Robertson T.A., König K., Becker W. Non-invasive imaging of skin physiology and percutaneous penetration using fluorescence spectral and lifetime imaging with multiphoton and confocal microscopy. – European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 77, 469–488 (2011).
 15. Th. Förster, Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz. – Ann. Phys. (Serie 6) 2, 55–75 (1948).
 16. Th. Förster. Energy migration and fluorescence. Translated by Klaus Suhling. – J. Biomed. Opt. 17 011002–1 to –10.
 17. C. Biskup, L. Kelbauskas, T. Zimmer, K. Benndorf, A. Bergmann, W. Becker, J.P. Ruppertsberg, C. Stockklausner, N. Klöcker. Interaction of PSD-95 with potassium channels visualized by fluorescence lifetime-based resonance energy transfer imaging. – J. Biomed., Opt. 9, 735–759 (2004).
 18. Y. Chen, A. Periasamy, Characterization of two-photon excitation fluorescence lifetime imaging microscopy for protein localization. – Microsc. Res. Tech., 63, 72–80 (2004).
 19. R.R. Duncan, A. Bergmann, M.A. Cousin, D.K. Apps, M.J. Shipston. Multi-dimensional time-correlated single-photon counting (TCSPC) fluorescence lifetime imaging microscopy (FLIM) to detect FRET in cells. – J. Microsc., 215, 1–12 (2004).
 20. Periasamy, R.M. Clegg, eds. FLIM Microscopy in Biology and Medicine: CRC Press, 2009.
 21. D.K. Bird, L. Yan, K. M. Vrotsos, K. E. Eliceiri, E. M. Vaughan. Metabolic mapping of MCF10A human breast cells via multiphoton fluorescence lifetime imaging of coenzyme NADH: Cancer Res. 65:8766–8773 (2005).
 22. D. Chorvat, A. Chorvatova. Multi-wavelength

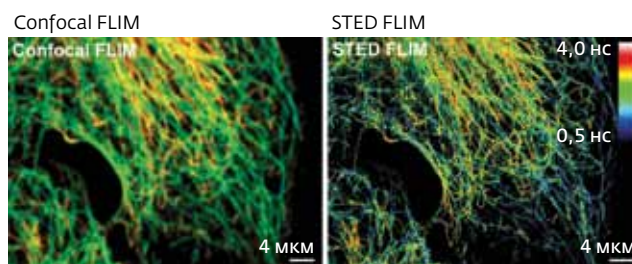


Рис. 11. Метод STED-FLIM. Слева: конфокальное изображение. Справа: STED-изображение. Клетки млекопитающих меченные тубулином/Atto647N и виментином/Abberior STAR 635P (источник: А. Шёнле, А. Systems, Гёттинген, Германия)

Fig. 11. STED FLIM. Left: Confocal image. Right: STED-image. Mammalian cells labelled with tubulin/Atto647N and vimentin/ Abberior STAR 635P. Images courtesy of Andreas Schönle, Abberior Systems, Göttingen, Germany

TCSPC FLIM is able to simultaneously record fluorescence (FLIM) and phosphorescence lifetime images (PLIM). The technique is based on on-off modulating a high-frequency pulsed laser, and assigning two times to the individual photons. One is the time from the previous excitation pulse, the other a time from the modulation pulse [11, 42].

An example is shown in Fig. 12. It shows yeast cells stained with tris (2,2'-bipyridyl) dichlororuthenium (II) hexahydrate. On the ps

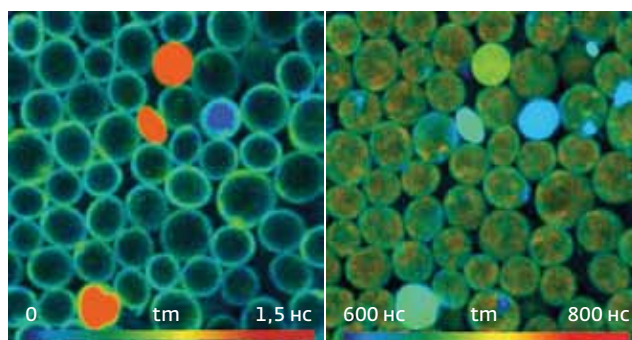


Рис. 12. Слева – флуоресценция времени жизни; справа – фосфоресценция времени жизни дрожжевых клеток, окрашенных флуоресцентным веществом (амплитудно-взвешенное среднее время жизни двойной экспоненциальной подстройки данных кривой затухания [11])

Fig. 12. Fluorescence lifetime image (left) and phosphorescence lifetime image (right) of yeast cells stained with tris (2,2'-bipyridyl) dichlororuthenium (II) hexahydrate. Amplitude-weighted mean lifetime of double exponential fit to decay data [11]

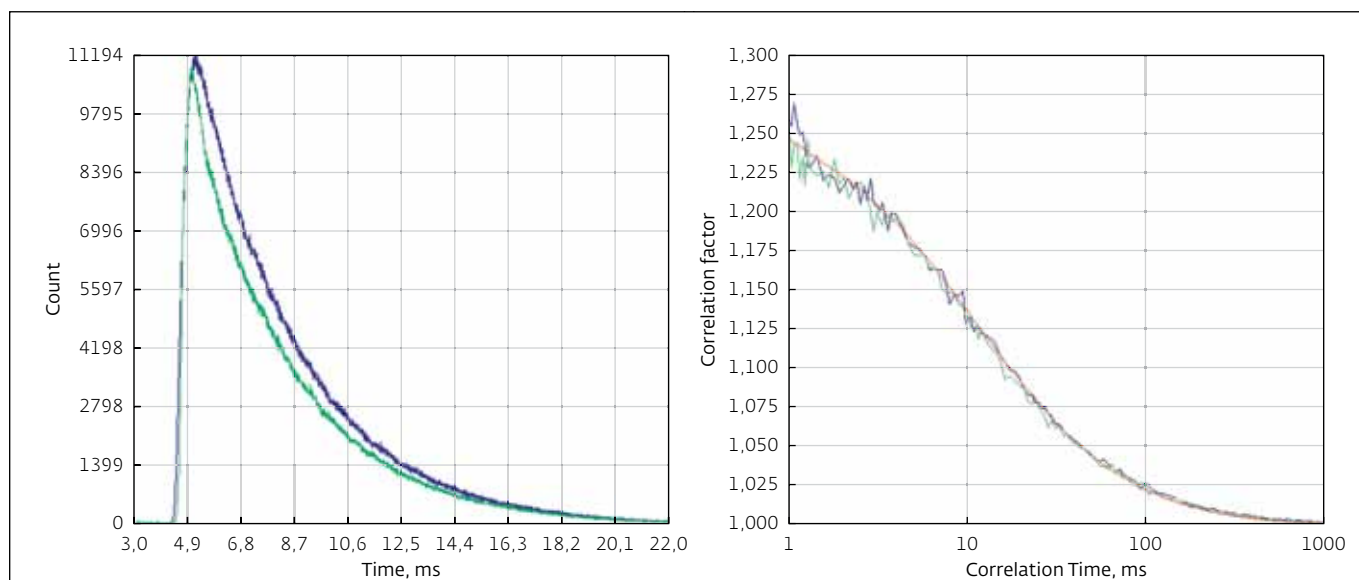


Рис. 13. FCS-следы, полученные с помощью лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM 880 (возбуждение пикосекундным диодным лазером Zeiss, $\lambda=405$ нм, регистрация детектором Zeiss BIG-2, запись TCSPC-FLIM системой Simple-Tau 152 в режиме FCS-следов; два канала регистрации, кривые затухания показаны слева, кривые FCS следов – справа)
Fig.13. FCS with Zeiss LSM 880 laser scanning microscope. Excitation by Zeiss 405 nm ps diode laser, detection by Zeiss BIG-2 detector, recording by bh Simple-Tau 152 TCSPC-FLIM system in FCS mode. Two detection channels, decay curves shown left, FCS curves right. The red curve is a fit with two diffusion and a triplet term

fluorescence lifetime spectroscopy: a new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues. - Laser Phys. Lett., 6 175-193 (2009).

23. **M. C. Skala, K. M. Riching, D. K. Bird, A. Dendron-Fitzpatrick, J. Eickhoff, K. W. Eliceiri, P. J. Keely, N. Ramanujam.** In vivo multiphoton fluorescence lifetime imaging of protein-bound and free nicotinamide adenine dinucleotide in normal and precancerous epithelia. - J. Biomed., Opt. 12 02401-1 to 10 (2007).
24. **M. J. Koehler, K. König, P. Elsner, R. Bückle, M. Kaatz.** In vivo assessment of human skin aging by multiphoton laser scanning tomography. - Opt. Lett., 31, 2879-2881 (2006).
25. **B.R. Masters, P.T.C. So,** eds. Handbook of Biomedical Nonlinear Optical Microscopy: Oxford University Press, 2008.
26. **K. König,** Clinical multiphoton tomography. - J. Biophoton., 1, 13-23 (2008).
27. **K. König, P.T.C. So, W.W. Mantulin, B.J. Tromberg, E. Gratton,** Two-Photon excited lifetime imaging of autofluorescence in cells during UVA and NIR photostress. - J. Microsc. 183, 197-204 (1996).
28. **K. König,** Multiphoton microscopy in life sciences. - J. Microsc., 200, 83-104 (2000).
29. **B. R. Masters, P.T.C. So.** Multi-photon excitation

time scale, autofluorescence from NADH and FAD is detected. The phosphorescence of the ruthenium dye is detected on the microsecond time scale. The fluorescence lifetime image is shown on the left, the phosphorescence lifetime image on the right.

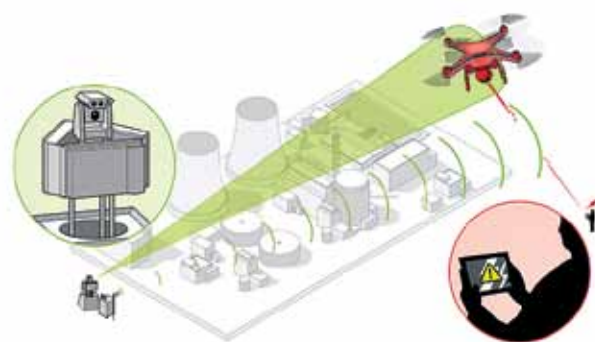
Instruments based on a combination of confocal or two-photon laser-scanning microscopes with TCSPC are, in principle, able to record also fluorescence correlation (FCS) data and single-molecule FRET data [6, 11]. An example of FCS recording is shown in Fig. 13.

SUMMARY

The combination of multi-dimensional TCSPC and laser scanning microscopy records fluorescence lifetime images at near-ideal photon efficiency and excellent temporal and spatial resolution. The technique can be extended to record multi-wavelength images, lateral mosaics and Z-stacks of FLIM images, and fast time series showing dynamic changes in the fluorescence behaviour of a sample. Moreover, fluorescence lifetime images can be recorded simultaneously with phosphorescence lifetime images. TCSPC FLIM can also be combined with STED, resulting in FLIM images with optical super-resolution. Typical FLIM applications are mapping of local molecular environment parameters, protein interaction experiments by FRET techniques, and autofluorescence imaging. Clinical applications are at the stage of clinical trials.

- microscopy and confocal microscopy imaging of in vivo human skin: A comparison. – *Microscopy and Microanalysis*, 5, 282–289 (1999).
30. Jenlab GmbH, MPT Flex Multiphoton Laser Tomography. www.jenlab.de/MPTflex.114.0.html.
 31. **C. Dysli, G. Quellec, M Abegg, M. N. Menke, U. Wolf-Schnurrbusch, J. Kowal, J. Blatz, O. La Schiazza, A. B. Leichtle, S. Wolf, M. S. Zinkernagel.** Quantitative Analysis of Fluorescence Lifetime Measurements of the Macula Using the Fluorescence Lifetime Imaging Ophthalmoscope in Healthy Subjects: *IOVS* 55, 2107–2113 (2014).
 32. **D. Schweitzer.** Metabolic Mapping. In: F.G. Holz, R.F. Spaide (eds), *Medical retina, Essential in Ophthalmology*: Springer (2010).
 33. **W. Becker, B. Su, K. Weisshart, O. Holub.** FLIM and FCS Detection in Laser-Scanning Microscopes: Increased Efficiency by GaAsP Hybrid Detectors. – *Micr. Res. Tech.*, 74, 804–811 (2011).
 34. **H. Studier, W. Becker.** Megapixel FLIM. – *Proc. SPIE*, 8948 (2014).
 35. **W. Becker, A. Bergmann, C. Biskup.** Multi-Spectral Fluorescence Lifetime Imaging by TCSPC. – *Micr. Res. Tech.*, 70, 403–409 (2007).
 36. **Rück, Ch.Hülshoff, I.Kinzler, W.Becker, R. Steiner.** SLIM: A New Method for Molecular Imaging. – *Micr. Res. Tech.*, 70, 403–409 (2007).
 37. **W. Becker, V. Shcheslavskiy.** Fluorescence lifetime imaging with near-infrared dyes. – *Photon Lasers Med.*, 4, 73–83, 2015.
 38. **W. Becker, V. Shcheslavskiy, S. Frere, I. Slutsky.** Spatially Resolved Recording of Transient Fluorescence-Lifetime Effects by Line-Scanning TCSPC. – *Microsc. Res. Techn.*, 77, 216–224 (2014).
 39. **J. Bückers, D. Wildanger, G. Vicidomini, L. Kastrup, S.W. Hell.** Simultaneous multi-lifetime multi-colour STED imaging for colocalization analysis. – *Opt. Expr.*, 19, 3130–3143 (2011).
 40. **M. D. Lesoine, S. Bose, J. W. Petrich, E. A. Smith.** Supercontinuum Stimulated Emission Depletion Fluorescence Lifetime Imaging. – *J. Phy. Chem. B*, 116, 7821–7826 (2012).
 41. **M. Micic, D. Hu, Y.D. Suh, G. Newton, M. Romine, H.P. Lu,** Correlated atomic force microscopy and fluorescence lifetime imaging of live bacterial cells. – *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 34, 205–212 (2004).
 42. **W. Becker, B. Su, A. Bergmann, K. Weisshart, O. Holub.** Simultaneous Fluorescence and Phosphorescence Lifetime Imaging. – *Proc. SPIE*, 7903 (2011).

DSEI 2015 – МЕЖДУНАРОДНАЯ ВЫСТАВКА ОБОРОННОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ, ТЕХНОЛОГИЙ И СИСТЕМ БЕЗОПАСНОСТИ



Международная выставка оборонных технологий DSEI (Defence Systems and Equipment International Exhibition and Conference) проходит один раз в два года. DSEI включает все направления оборонной промышленности: защита на суше, на море, в воздухе. Выставка DSEI 2015 проходила в Лондоне с 15 по 18 сентября 2015 года.

Посетителям DSEI 2015 была представлена система, которая использует информацию от датчиков, полученную из разных источников, которые она компонует с помощью новейшей технологии слияния данных, анализа сигналов и технологий подавления для определения и ликвидации БПЛА, вторгшихся в закрытое пространство, на расстоянии от 5 до 10 километров.

Система использует радары, камеры ИК-диапазона и радиопеленгаторы из ассортимента Airbus DS для обнаружения БПЛА и оценки их потенциальной угрозы. Если конкретизировать, то система включает радар с активной фазированной антенной решеткой Airbus DS SPEXER 500 (ранее – Cassidian Electronics и EADS Defence Electronics) и инфракрасную камеру Z:NightOwl (ранее – Carl Zeiss Optronics).

SPEXER 500 разработан для защиты военных лагерей, безопасности периметра и для защиты критически важной инфраструктуры. Он разработан для отслеживания и обнаружения наземных и низколетящих целей в районах с ограниченным обзором (например, в холмистой местности). Камера ИК-диапазона дальнего радиуса действия Z:NightOwl предназначена для наблюдения за государственными границами, береговыми линиями и критически важными объектами инфраструктуры.

Система от Airbus DS блокирует только частоты, используемые для управления БПЛА, в то время как остальные частоты в соседних диапазонах остаются рабочими.

technowars.ru