

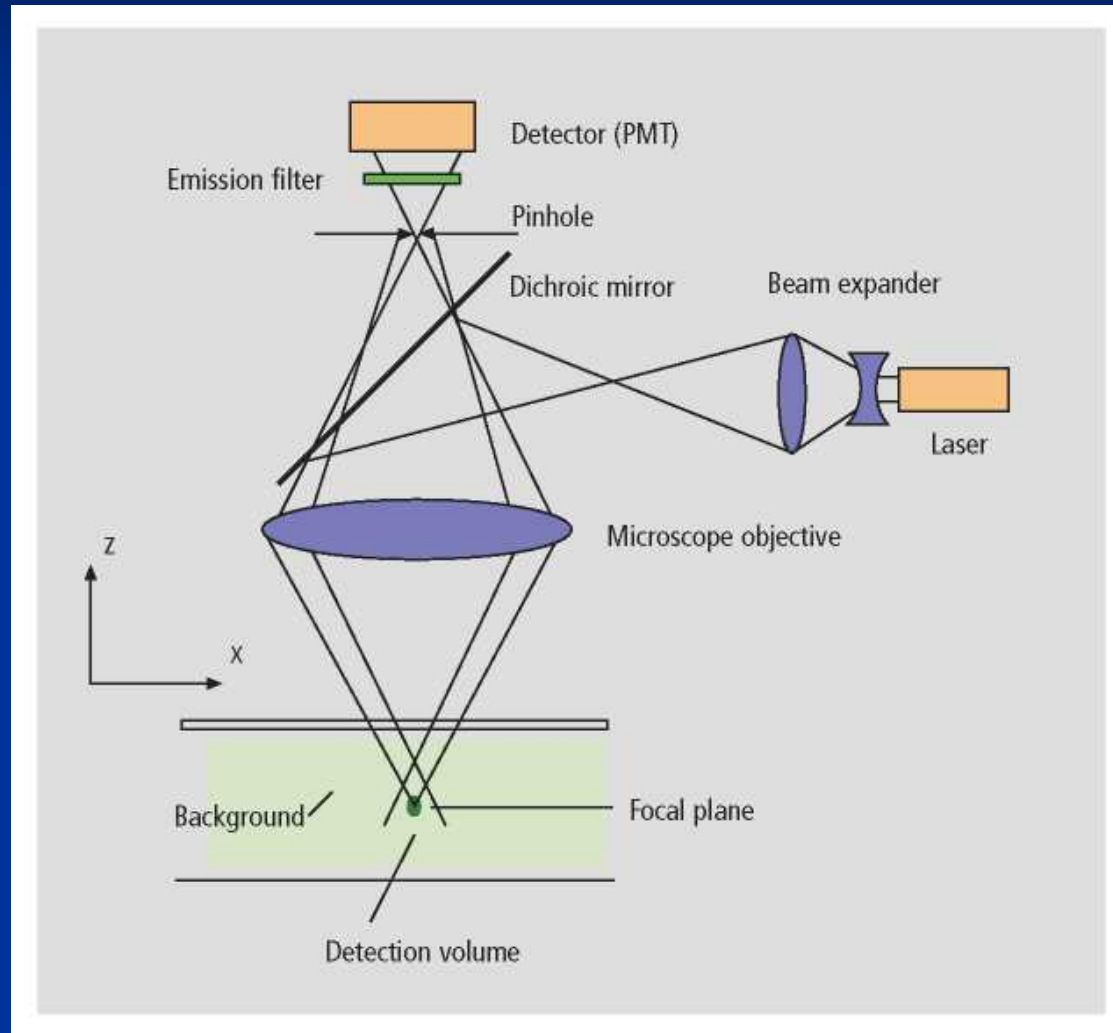
# Двухфотонная время-разрешенная лазерная сканирующая микроскопия в биологии и медицине

Бушук С.Б., Казак Н.С., Бушук Б.А.

# Laser scanning microscopy facility



# Принцип конфокальной лазерной микроскопии



# Роль конфокальной диафрагмы

- Повышение разрешения (около 2 раз)
- Подавление рассеянного света
- Дискриминация по глубине

## Обычная микроскопия

- Подсветка белым светом галогеновой лампы
- Изображение широкого поля получается сразу
- Детектор большой площади
- Наличие набора методик улучшения контраста
- Плохое качество изображения под поверхностью образца
- Методика цифровой деконволюции для получения оптической диссекции

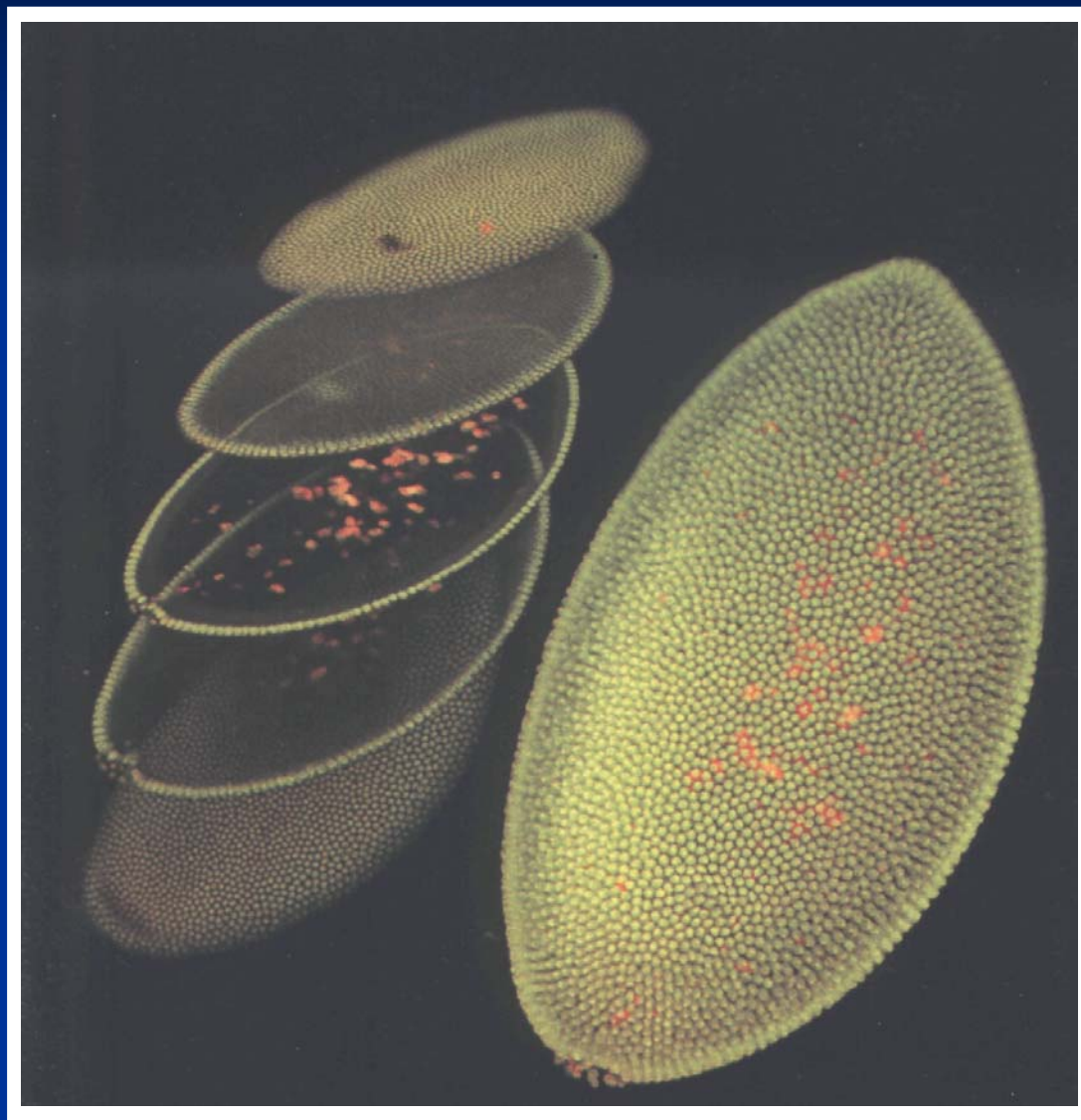
## Конфокальная лазерная микроскопия

- Подсветка лазером
- 3-х мерное сканирование объекта точка за точкой
- Получение изображения в цифровом виде
- Конфокальный точечный детектор
- Высокий контраст и разрешение
- Высокое качество 3-х мерного изображения
- Высокая универсальность метода

# Варианты получения изображения в лазерном сканирующем микроскопе

- Отражение
- Флуоресценция
- Генерация гармоник
- Комбинационное рассеяние
- С использованием неоптического отклика

# 3-х мерная оптическая диссекция



# ЛСМ как оптический зонд

- Точный субмикронный контроль положения точки фокуса в пространстве
- Разнообразные системы детектирования оптического отклика
- Быстрое сканирование



# АКТИВНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ НА ОБЪЕКТ

- Фотовозбуждение
- Фотоэлектрический эффект
- Фотохимия
- Фоторазрушение
- Оптические градиентные силы

# Биологические применения ЛСМ

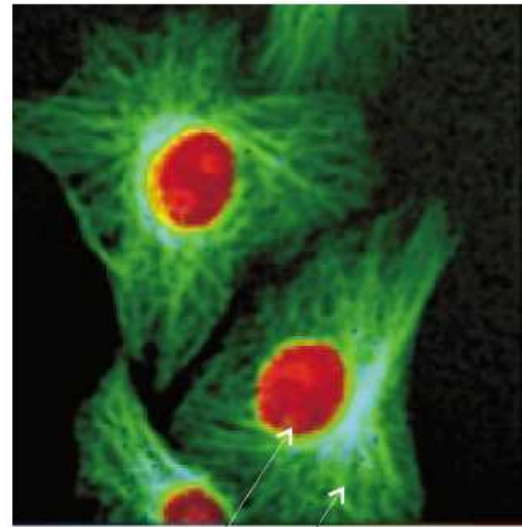
- Флуоресцентная микроскопия
- Fluorescence lifetime imaging
- Fluorescence recovery after photobleaching
- Fluorescence resonance energy transfer
- Fluorescence *in situ* hybridization
- Микродиссекция
- Лазерный пинцет

# FLIM - Fluorescence Lifetime IMaging

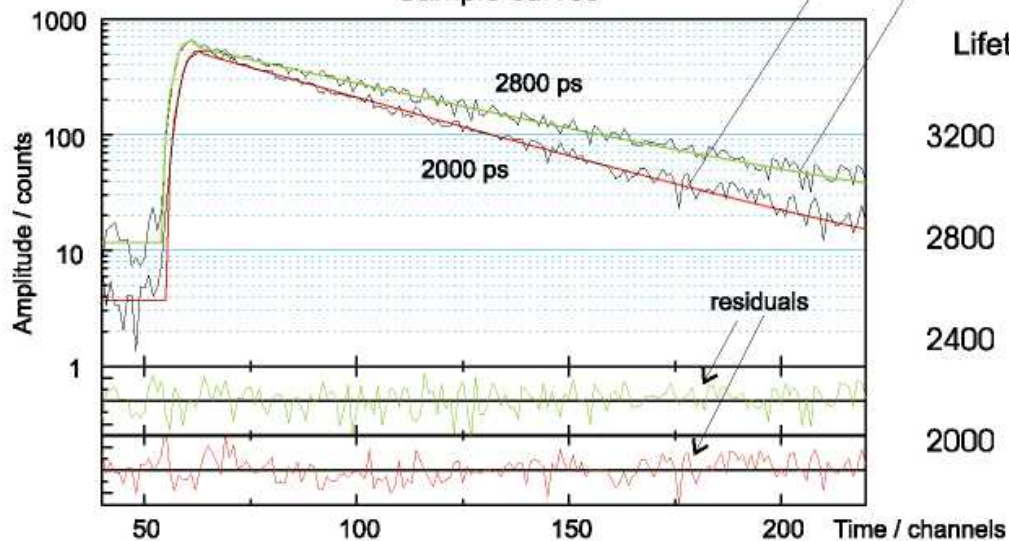
Steady state intensity image



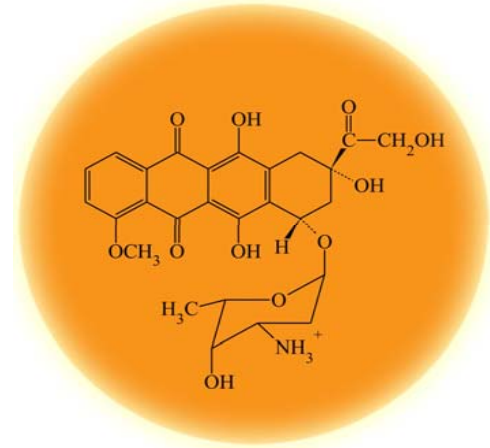
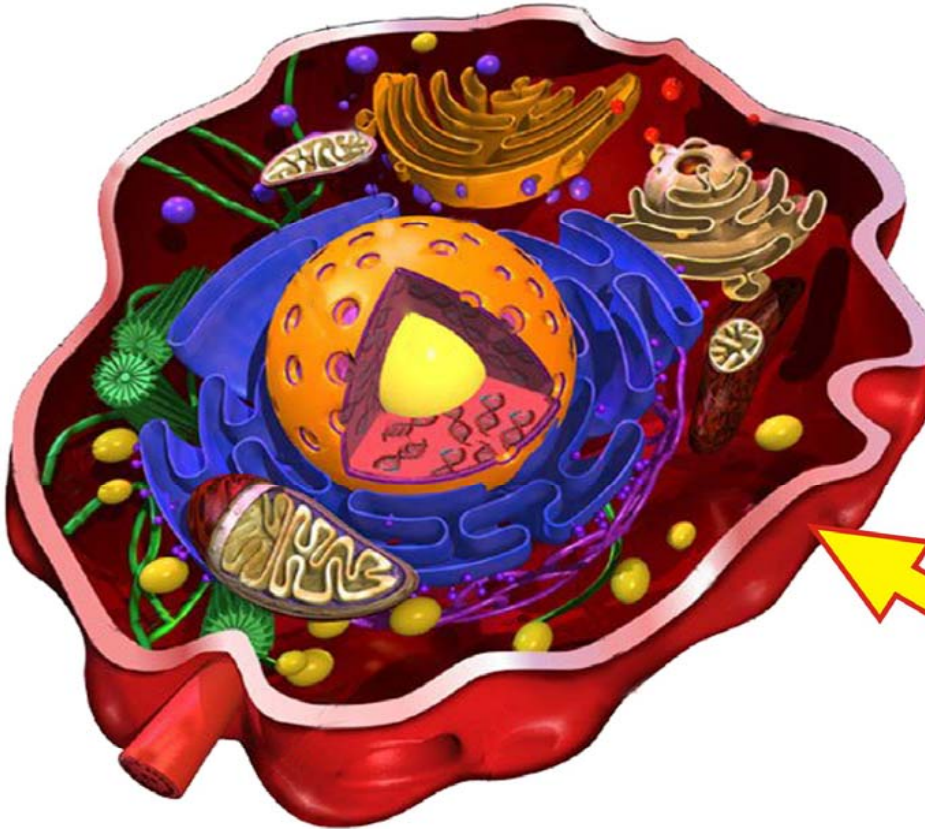
Time resolved intensity image



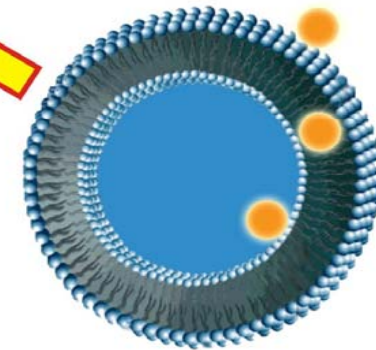
Sample curves



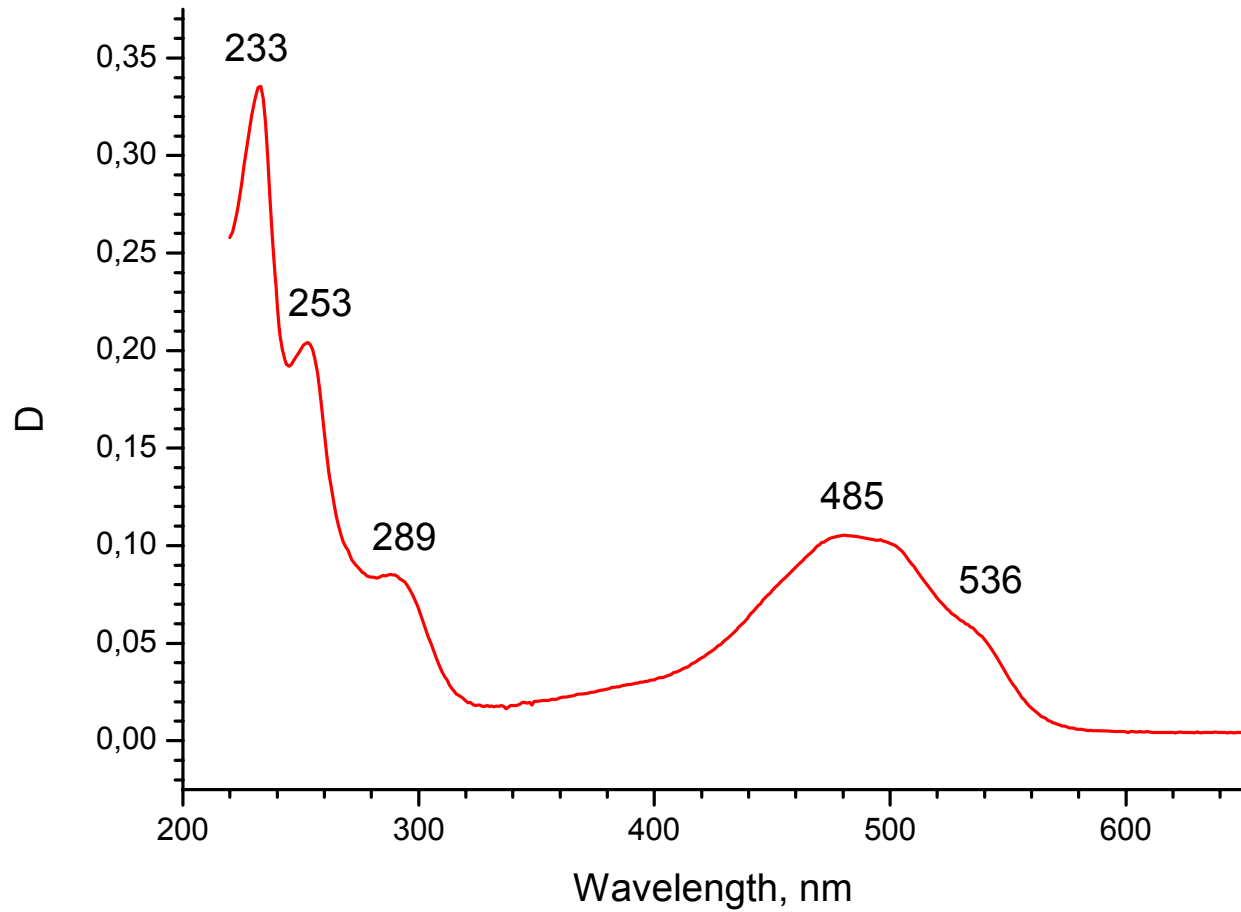
# Drug delivery by liposomes



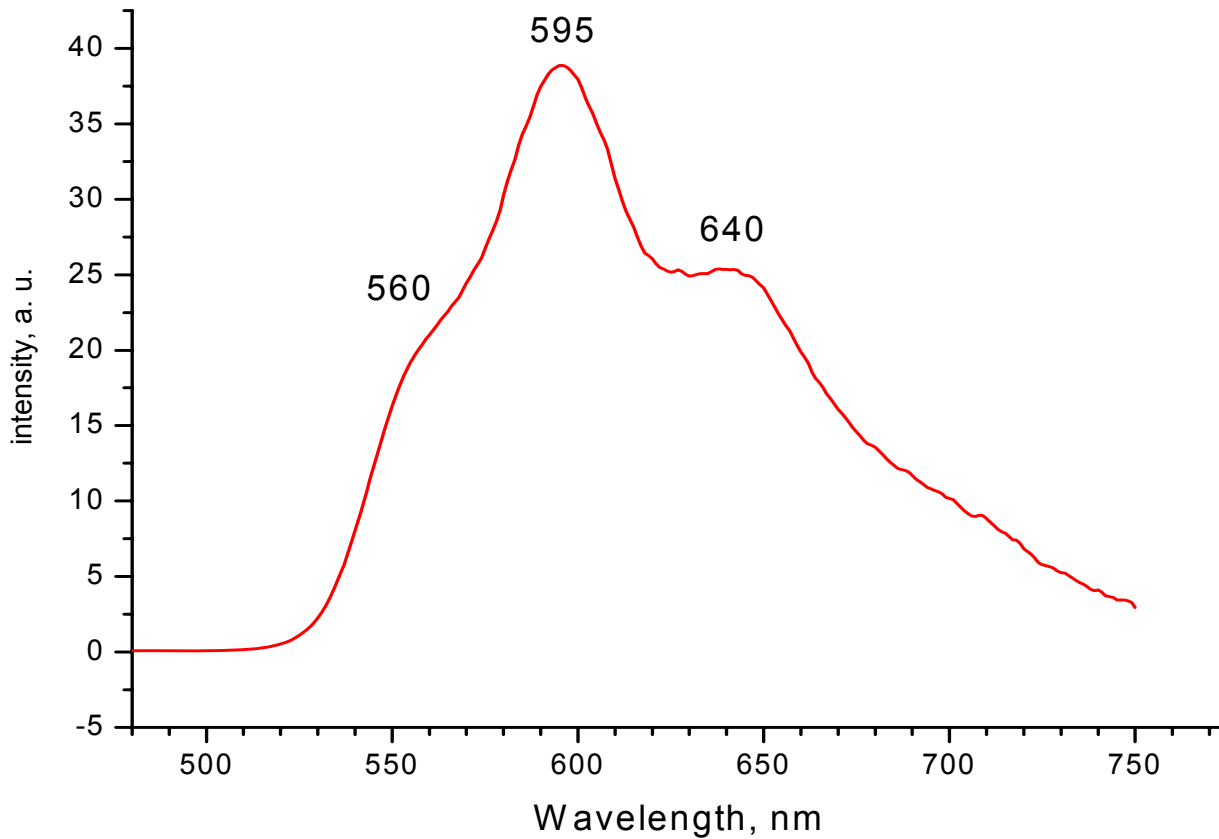
Doxorubicin



Liposome



Absorption spectrum of doxorubicin in water solution.

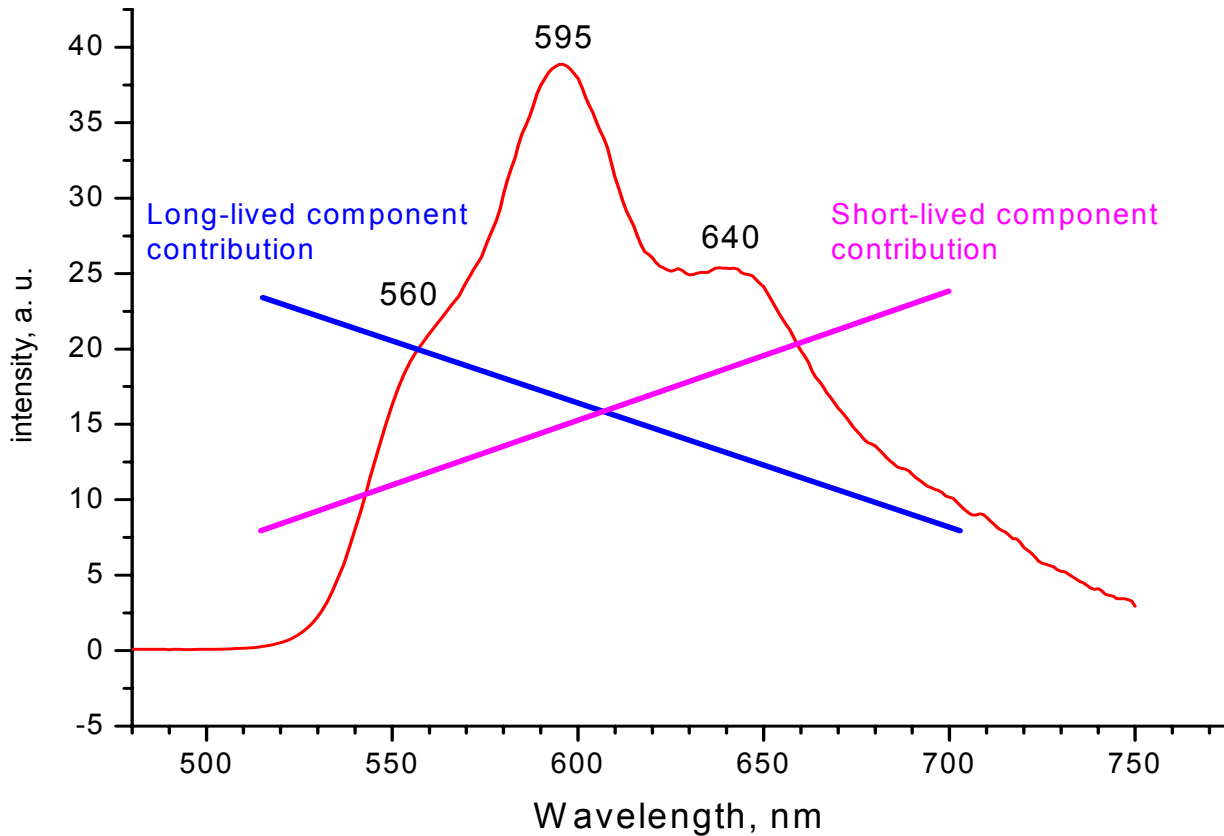


Fluorescence spectrum of doxorubicin ( $C=57 \cdot 10^{-6}$  m/l) in water with liposomes (100% phosphatidylcholine,  $C=440 \cdot 10^{-6}$  m/l). Excitation at 450 nm.

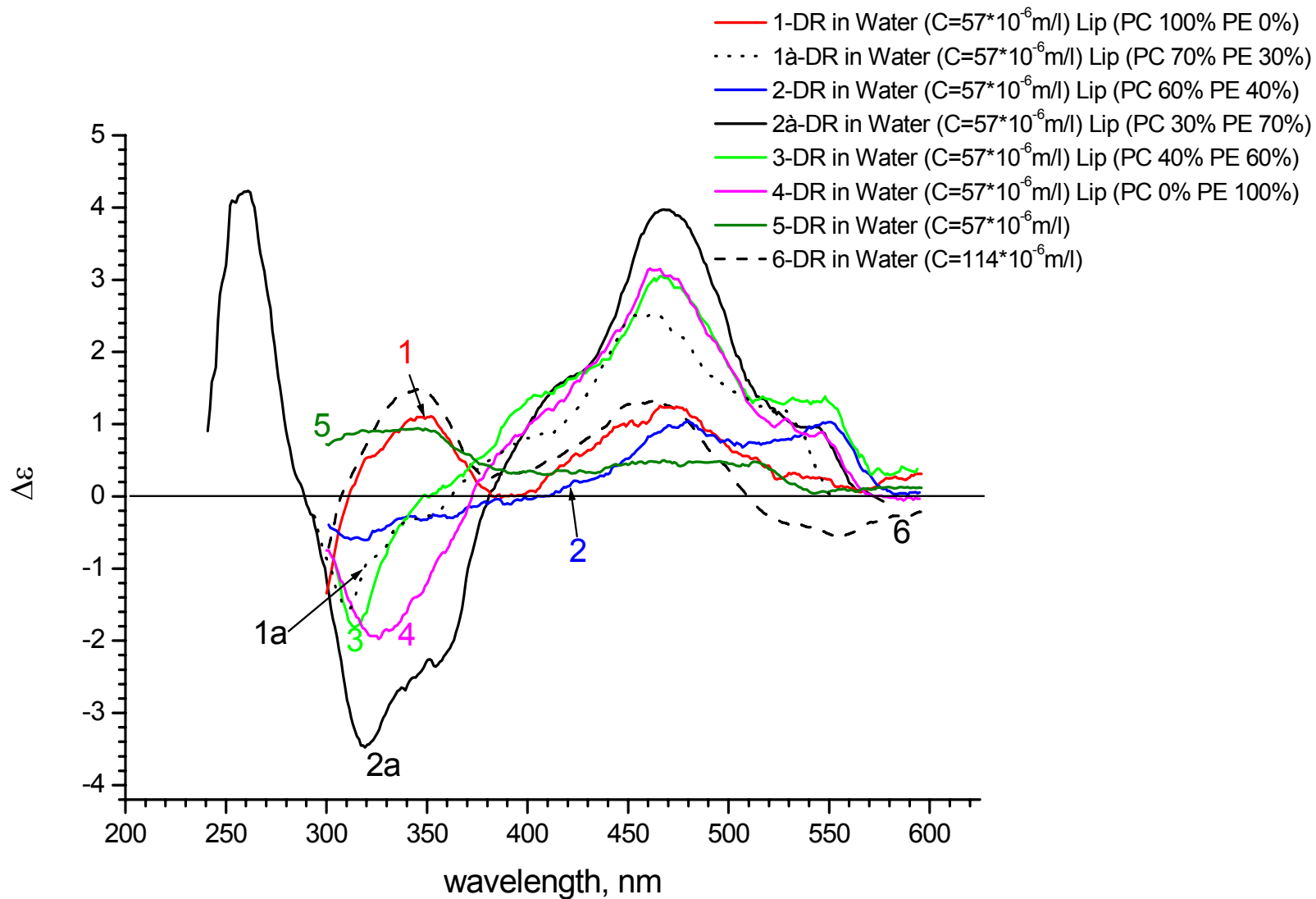
Solvent	Registration wavelength, nm	Fluorescence lifetime, ns
<b>H<sub>2</sub>O</b> pH = 4,0	560	1,03
	595	1,04
	640	1,04
<b>H<sub>2</sub>O</b> pH = 7,0	560	1,06
	595	1,07
	640	1,07
<b>H<sub>2</sub>O</b> pH = 8,0	560	1,09
	595	1,07
	640	1,06
<b>DMSO</b>	550	1,39
	595	1,39
	640	1,40
<b>DMFA</b>	550	1,49
	595	1,45
	640	1,44
<b>MeOH</b>	550	1,37
	595	1,38
	640	1,37
<b>EtOH</b>	550	1,53
	595	1,49
	640	1,48

Liposome composition	Doxorubicin concentration, M	Registration wavelength		
		560 nm	595 nm	640 nm
		$\tau$ , ns (weight, %)	$\tau$ , ns (weight, %)	$\tau$ , ns (weight, %)
100 % PC	$57 \times 10^{-6}$	—	$\tau_1 = 0,16$ (40) $\tau_2 = 1,17$ (60)	$\tau_1 = 0,28$ (38) $\tau_2 = 1,21$ (62)
60 % PC + 40 % PE	$57 \times 10^{-6}$	$\tau_1 = 0,56$ (42) $\tau_2 = 1,19$ (58)	$\tau_1 = 0,43$ (40) $\tau_2 = 1,17$ (60)	$\tau_1 = 0,44$ (51) $\tau_2 = 1,23$ (49)
60 % PC + 40 % PE	$28,5 \times 10^{-6}$	$\tau_1 = 0,88$ (70) $\tau_2 = 2,14$ (30)	$\tau_1 = 0,73$ (54) $\tau_2 = 1,85$ (46)	$\tau_1 = 0,77$ (66) $\tau_2 = 2,09$ (34)
40 % PC + 60 % PE	$57 \times 10^{-6}$	$\tau_1 = 0,36$ (45) $\tau_2 = 1,31$ (55)	$\tau_1 = 0,37$ (53) $\tau_2 = 1,31$ (47)	$\tau_1 = 0,29$ (63) $\tau_2 = 1,29$ (37)
100 % PE	$57 \times 10^{-6}$	$\tau_1 = 0,34$ (66) $\tau_2 = 1,31$ (34)	$\tau_1 = 0,39$ (77) $\tau_2 = 1,42$ (23)	$\tau_1 = 0,26$ (77) $\tau_2 = 1,09$ (23)

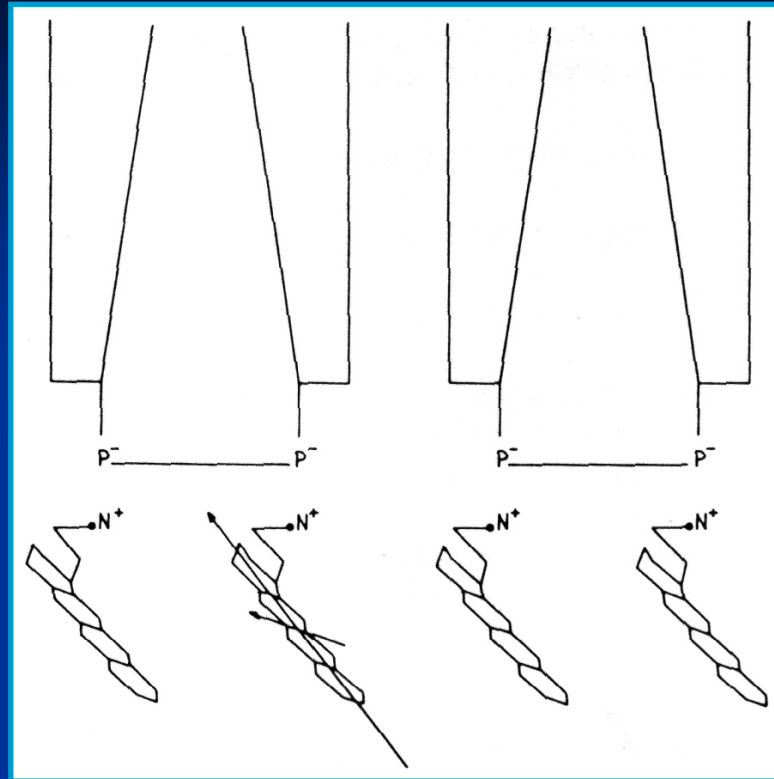
Spectral dependence of doxorubicin fluorescence lifetimes in water-liposome solution at various liposome compositions (PC - phosphotidylcholine, PE – phosphotidylethanol).



Fluorescence spectrum of doxorubicin ( $C=57 \cdot 10^{-6}$  m/l) in water with liposomes (100% phosphatidylcholine,  $C=440 \cdot 10^{-6}$  m/l). Excitation at 450 nm.

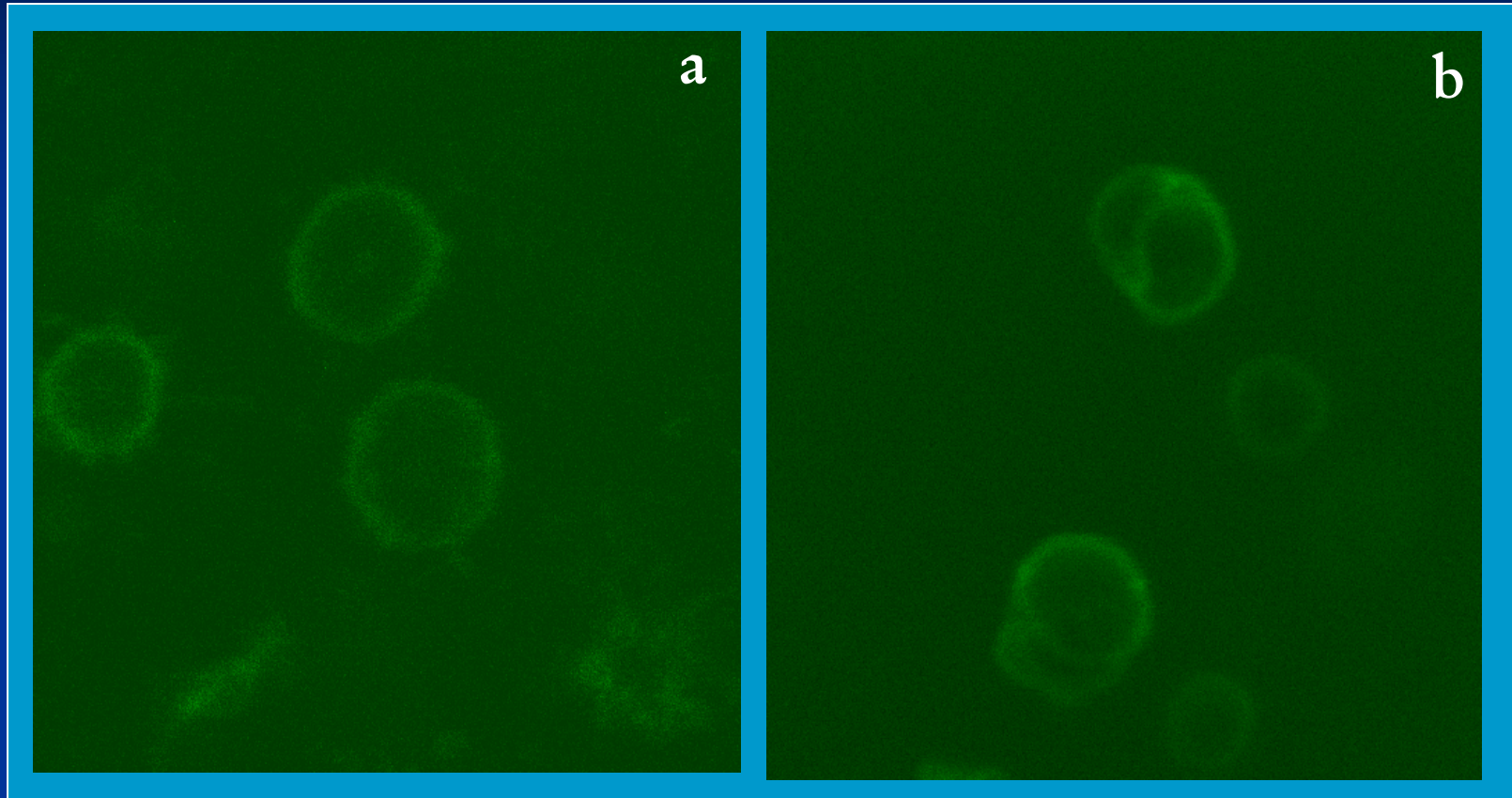


Circular dichroism spectra of doxorubicin in water-liposome solution at various liposome compositions.

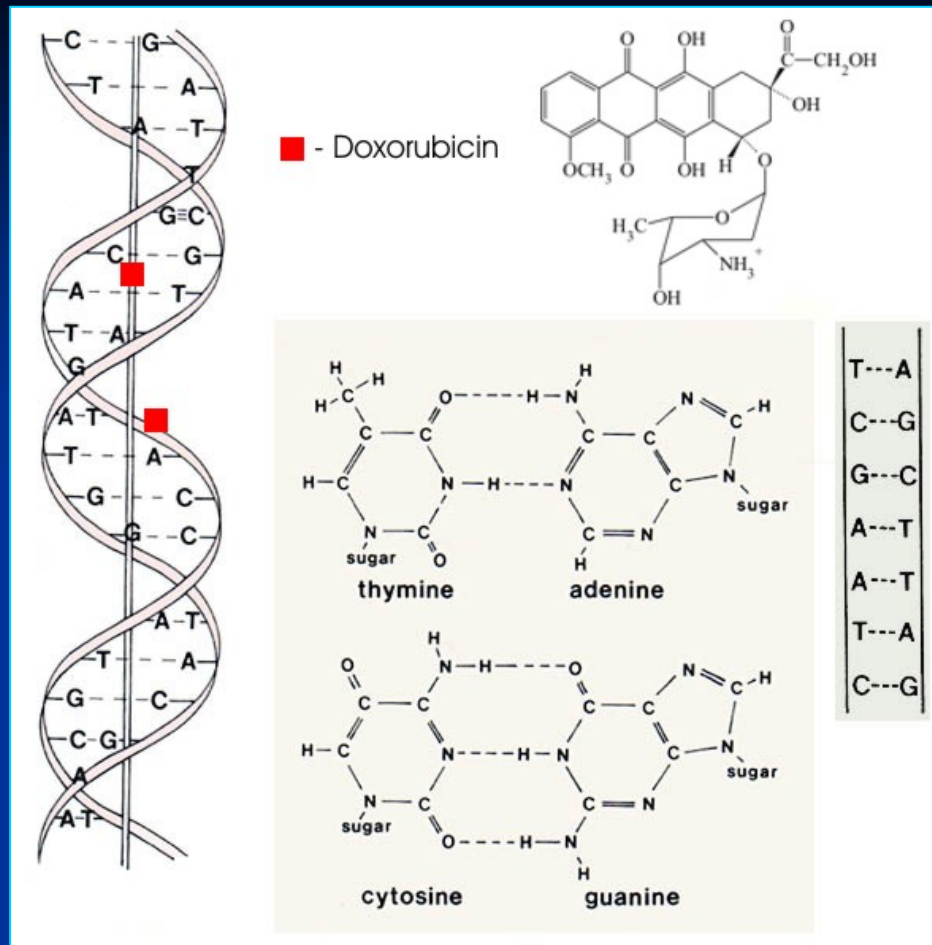


Doxorubicin molecule distribution on the surface of a liposome

# Investigation of drug interaction with cellular membranes



Human erythrocyte ghosts (a) and inverted ghosts (b) loaded with doxorubicin

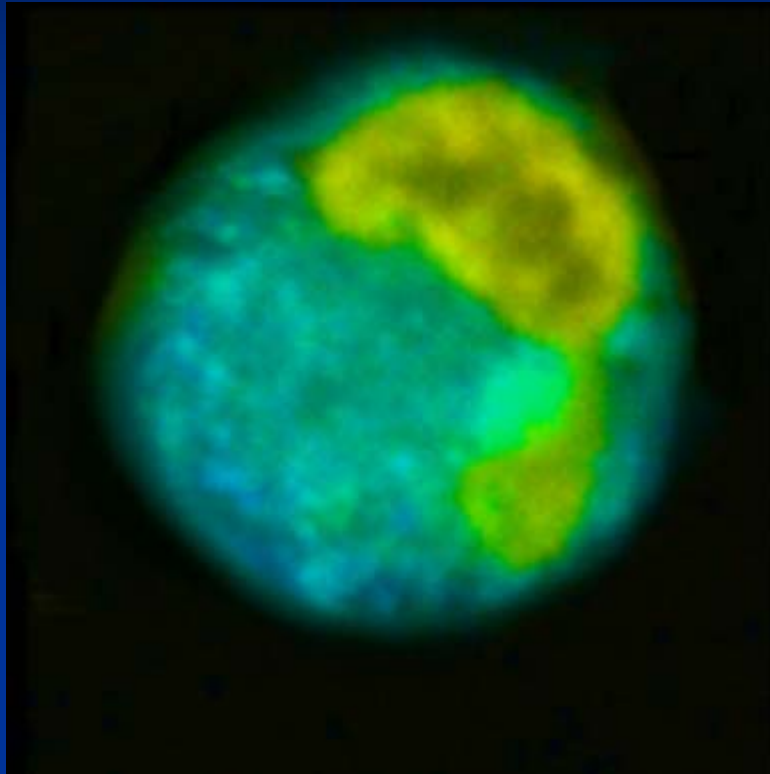


By means of the steady-state, kinetic and polarization spectroscopy the interaction of doxorubicin with RNA has been investigated. Two basic binding sites have been established: 1) electrostatic binding to the external groove of the polynucleotide; 2) drug molecule intercalation between nucleotide pairs. It has been shown that in the latter case the electron transfer from excited doxorubicin molecule to guanine takes place which may be used for photodynamic therapy purposes.

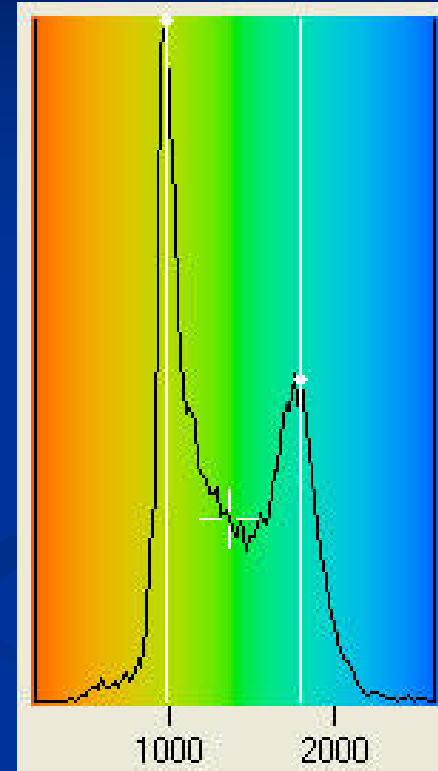
# Fluorescence lifetime imaging applications

- Measurement of local environment parameters inside living cells
- Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET)
- Autofluorescence microscopy of tissues
- Fluorescence Correlation Spectroscopy (FCS) and Scanning FCS
- Nanostructure characterization

# Monitoring of anti-cancer drug binding efficiency by means of FLIM



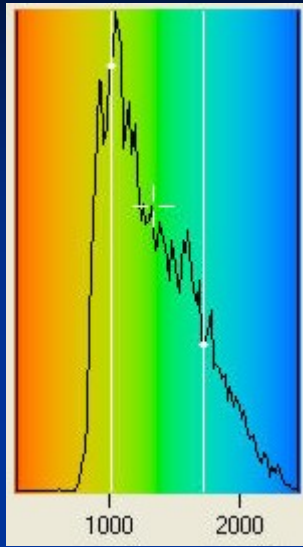
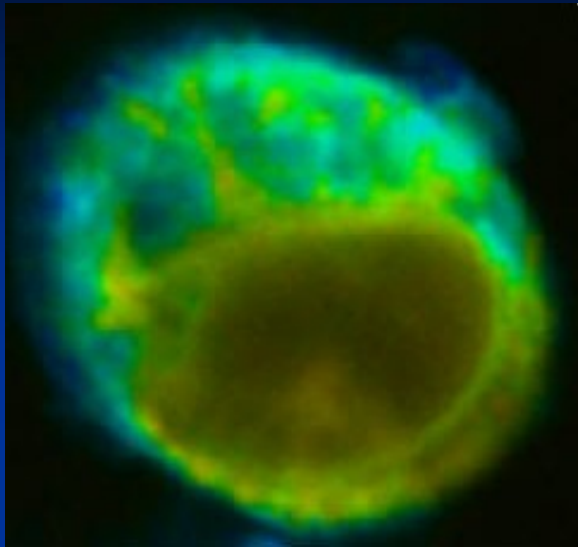
FLIM image of the cell



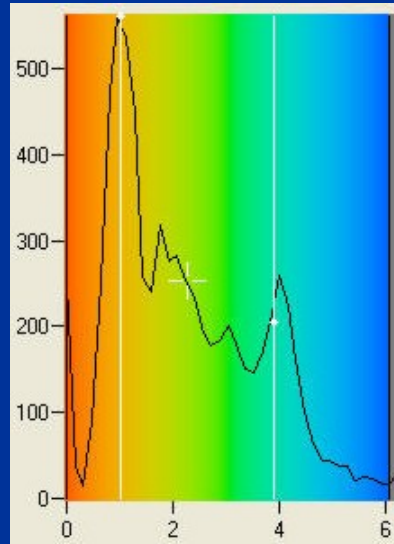
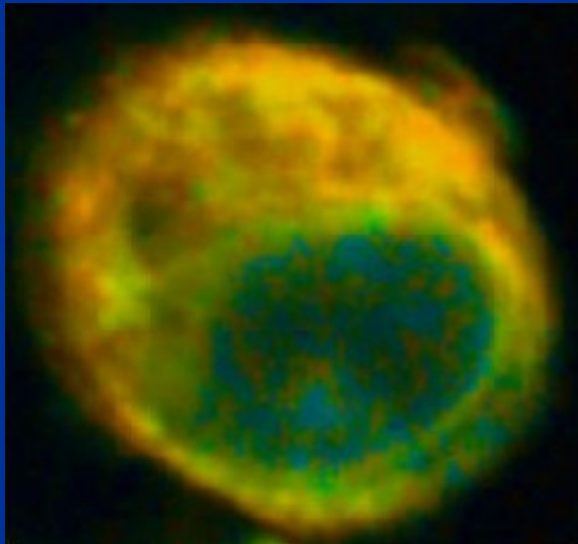
Fluorescence lifetime distribution (ps)

FLIM image of anti-cancer drug fluorescence lifetime distribution in cancer cell (epithelial kidney cell of green monkey)

# FLIM of green monkey kidney cells incubated with 20 mkM of Doxorubicin

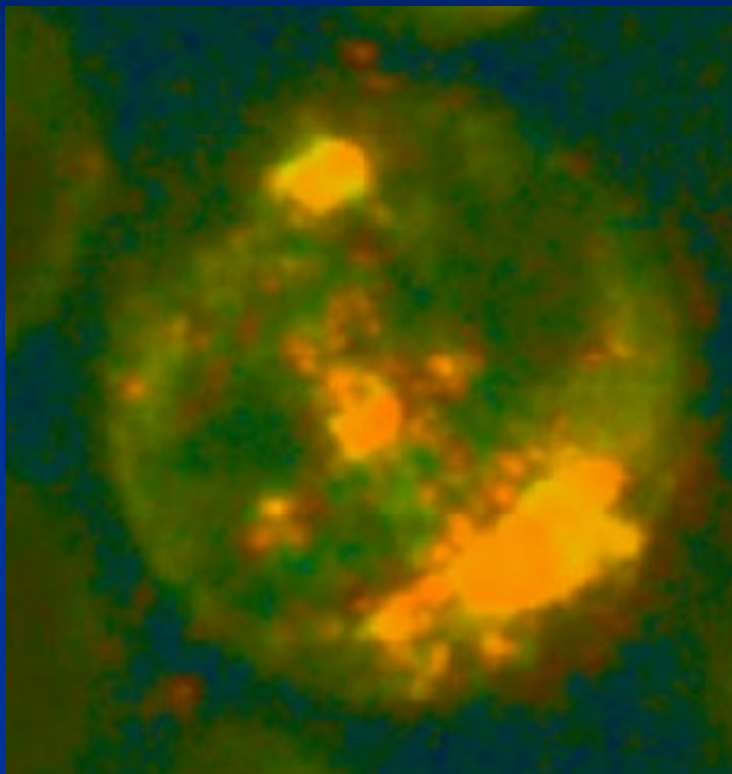


◀ Fluorescence lifetime distribution in the cell for double-exponential model of fluorescence decay

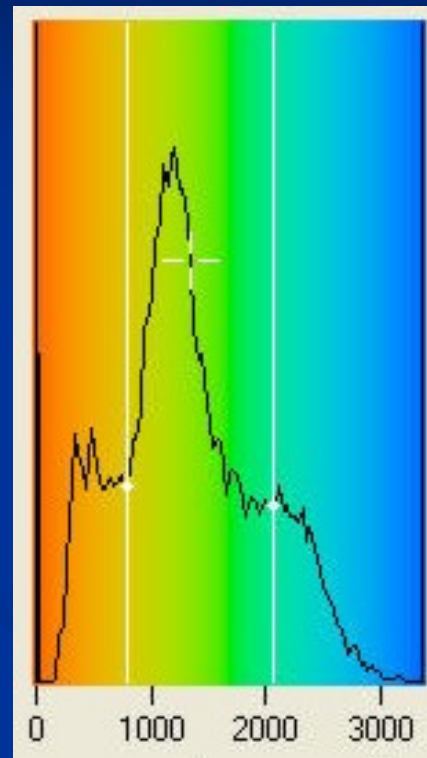


◀ The ratio of short- and long-lived fluorescence amplitude contribution

# FLIM of green monkey kidney cell autofluorescence



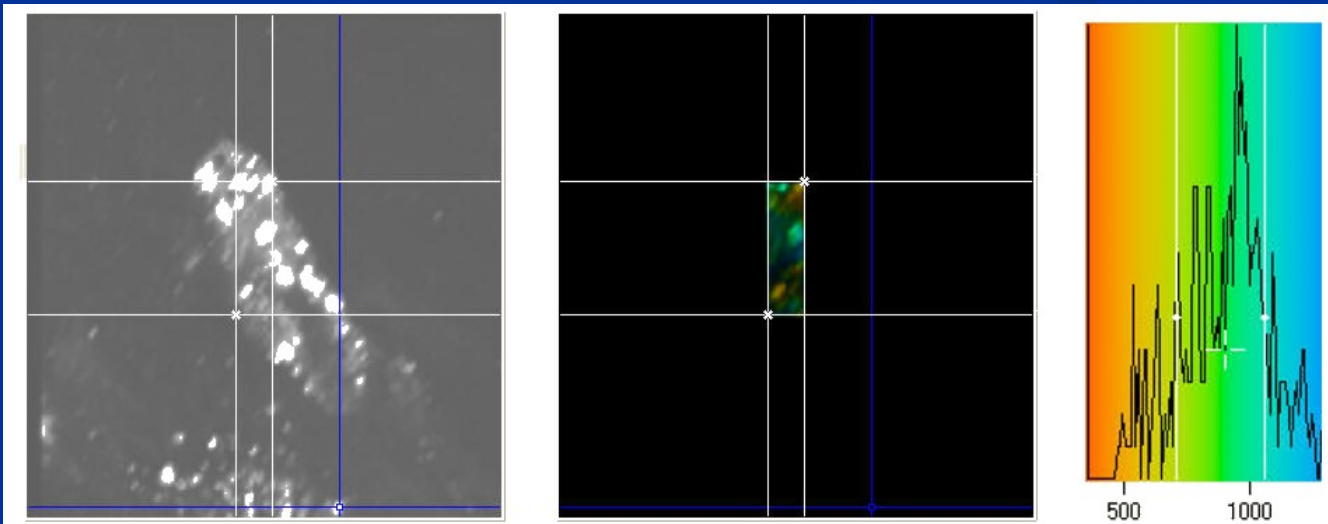
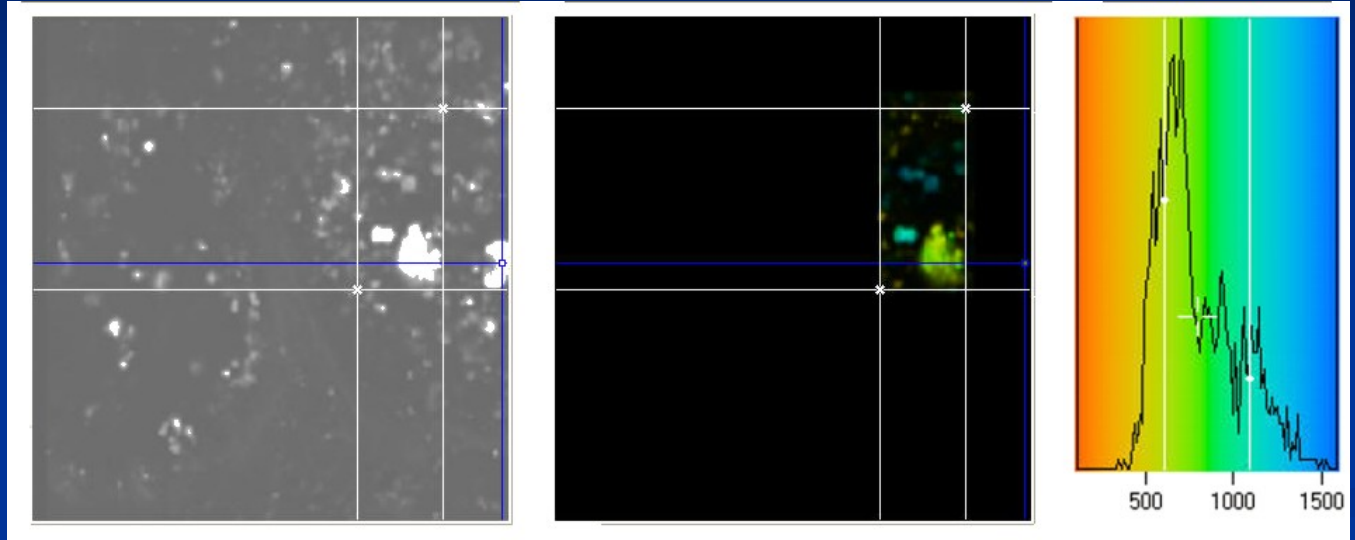
FLIM image of the cell



Fluorescence lifetime distribution (ps)

# FLIM-based diagnostics of healthy and cancer thyroid gland tissue (two-photon excited tissue autofluorescence)

Healthy tissue sample ▶



◀ Cancer tissue sample

Спасибо за внимание!